

Carolina Marques Ferreira Figueiredo

**Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Sob orientação de: Professora Doutora Gabriela Silva e Doutora Cristiana Canha.

Estágio decorrido entre 4 de janeiro e 1 de julho de 2016;

Áreas: Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia.

AGRADECIMENTOS

Porque este trabalho não é apenas fruto meu, mas de várias pessoas, quero deixar o meu agradecimento.

À Professora Doutora Leonor Almeida, por dar o seu melhor no acompanhamento de todos os alunos e por se mostrar sempre disponível.

À Professora Doutora Gabriela Silva e à Dra. Cristiana, por toda a valiosa ajuda prestada.

À Doutora Luísa Frazão e ao Doutor João Pêgo por, mesmo sem essa responsabilidade, me ajudarem com o relatório.

A todos os profissionais do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço pelo imenso conhecimento transmitido.

Nádia, obrigada pela tua ajuda fundamental ao longo de todo o mestrado.

Adriana, por seres a minha grande companheira dos últimos tempos e por seres uma terapia anti-stress para mim nesta fase.

Aos amigos feitos em Coimbra... Obrigada por todos os momentos, todas as histórias que fizeram da minha vida académica a melhor que poderia ter tido. Um agradecimento especial à Prima, Diana, Bananas, Joana e Nirvana, por estarem sempre presentes, mesmo quando longe.

Ricardo, um obrigada gigante por todo o apoio, por acreditares tanto em mim, pela confiança transmitida e, principalmente, pela alegria que dás aos meus dias.

Um grande obrigada à minha família e, o meu maior obrigada, aos meus pais. O meu crescimento profissional e, principalmente, pessoal só é possível graças a vocês. Obrigada por nunca terem duvidado das minhas escolhas e pela confiança e orgulho que demonstram sempre. Por tudo o que fizeram, fazem e farão, obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO	1
II. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	2
III. MICROBIOLOGIA	4
A. Bacteriologia	4
1. Exame microscópico	4
2. Exame cultural.....	5
3. Produtos biológicos	9
a) Urina	9
b) Fezes.....	10
c) Produtos do Trato respiratório	11
d) Zaragatoa de inserção de cateter e Ponta de cateter	13
e) Sangue.....	13
f) Líquido Cefalorraquidiano.....	14
g) Líquido pleural, Líquido peritoneal e Líquido sinovial.....	15
h) Exsudado de ferida e Pus de abscesso	15
i) Fragmento de tecido	16
j) Placenta.....	16
k) Exsudado vaginal.....	17
l) Exsudado ocular	17
4. Identificação	18

5.	Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos.....	19
B.	Micobacteriologia.....	21
1.	Digestão / Descontaminação.....	21
2.	Exame microscópico.....	22
3.	Exame cultural.....	23
4.	Identificação.....	24
5.	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.....	25
IV.	HEMATOLOGIA.....	26
A.	Hemograma.....	27
1.	Contadores hematológicos automáticos.....	27
2.	Eritrograma.....	29
a)	Contagem de eritrócitos (RBC).....	29
b)	Hemoglobina (Hb).....	29
c)	Hematócrito (Hct).....	30
d)	Índices eritrocitários.....	30
e)	Reticulócitos (RET).....	31
3.	Leucograma.....	32
a)	Contagem de leucócitos (WBC).....	32
b)	Diferencial leucocitário.....	33
4.	Plaquetograma.....	33
a)	Contagem de plaquetas (PLT).....	33
b)	Volume Plaquetário Médio (VPM).....	34
c)	Coeficiente de variação plaquetar (PDW).....	34
d)	Plaquetócrito (PCT).....	34
B.	Estudo da morfologia.....	34
1.	Eritrócitos.....	35
2.	Leucócitos.....	39
a)	Neutrófilos.....	39

b)	Eosinófilos.....	39
c)	Basófilos.....	40
d)	Monócitos.....	40
e)	Linfócitos.....	41
3.	Plaquetas.....	42
C.	Velocidade de Sedimentação.....	42
D.	Estudo da coagulação.....	43
1.	Tempo de Protrombina (TP)	46
2.	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA).....	46
3.	Quantificação do Fibrinogénio.....	46
4.	D-dímeros (DD)	47
5.	Anticorpos Anti-Fator Plaquetário 4 (Ac anti-FP4).....	47
6.	Anti Xa.....	48
7.	Tempo de Trombina (TT)	48
8.	Teste de Reptilase (TR).....	48
V.	CONCLUSÃO	50
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	ix
VII.	ANEXOS.....	xi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de sementeira por esgotamento do produto.....	8
Figura 2. Técnica de sementeira quantitativa.....	8
Figura 3. Histogramas representativos da distribuição dos volumes dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.....	28
Figura 4. Diferencial leucocitário produzido pela tecnologia VCS.....	33
Figura 5. Esquema da distribuição dos leucócitos num esfregaço sanguíneo.....	35
Figura 6. Alterações na série eritroide. (a): macrócitos; (b): micrócitos; (c): hipercromia; (d): hipocromia; (e): macrócito policromático; (f): esferócitos; (g): eliptócitos e ovalócitos; (h): dacrócitos; (i): equinócitos; (j): acantócitos; (l): queratócitos; (m): esquisócitos; (n): células em alvo; (o): estomatócitos; (p): células em foice; (q): corpúsculos de Howell-Jolly; (r): ponteados basófilos; (s): <i>rouleaux</i>	38
Figura 7. Leucócitos. (a): Neutrófilo; (b): Eosinófilo; (c): Basófilo; (d): Monócito; (e): Linfócito.....	41
Figura 8. Resposta hemostática a uma lesão vascular.....	43
Figura 9. Modelo clássico da Cascata de coagulação.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Meios de cultura utilizados no Laboratório de Bacteriologia do CHUC.....	6, 7
Tabela II. Algumas causas de alterações nas contagens dos leucócitos.....	33
Tabela III. Alterações morfológicas na série eritroide e condições onde podem ser encontradas.....	37, 38

ABREVIATURAS

AT: Antitrombina

ATCC: *American Type Culture Collection*

BCSA: *Burkholderia cepacia* selective agar

BHI: *Brain-heart infusion*

CBGN: Caldo de bacilos Gram negativo

CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média

CHUC: Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CID: Coagulação intravascular disseminada

CLED: *Cystine lactose electrolyte deficient*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CM: *Cooked meat*

CMI: Concentração mínima inibitória

CNA: *Colistin-nalidixic acid*

DD: D-dímeros

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxinogénica

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA: *Fluorescence Enzyme Immunoassay*

FDP: Produtos de degradação do fibrinogénio ou fibrina

FP4: Fator plaquetário 4

FT: Fator tecidual

FVW: Fator de Von Willebrand

GS: Gelose de sangue

HAE2: *Haemophilus*

Hb: Hemoglobina

HCM: Hemoglobina corpuscular média

Hct: Hematócrito

HIT: Trombocitopenia induzida por heparina

HK: Hemina-vitamina K
IgA: Imunoglobulina A
IgE: Imunoglobulina E
INR: *International Normalized Ratio*
ITU: Infecção do trato urinário
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LES: Lúpus eritematoso sistémico
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LLC: Leucemia Linfocítica Crónica
LMA: Leucemia Mielóide Crónica
LMC: Leucemia Mielóide Crónica
MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*
MGIT: *Mycobacteria Growth Indicator Tube*
MH: Mueller-Hinton
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
MTB: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
NK: *Natural Killer*
NRBC: *Nucleated Red Blood Cells*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PCT: Plaquetócrito
PDW: *Platelet distribution width*
PLT: *Platelets*
PVX: PolyViteX
RBC: *Red blood cell*
RDW: *Red cell distribution width*
RET: Reticulócitos
RIA: *Radio immuno assay*
RN: Recém-nascido
SchKV: *Schaedler-kanamicin-vancomycin*
SMAC: Sorbitol-MacConkey
SMD: Síndrome mielodisplásico
SNC: Sistema nervoso central
TEP: Tromboembolismo pulmonar
TFPI: *Tissue factor pathway inhibitor*

TP: Tempo de protrombina
TPA: *Tissue plasminogen activator*
TR: Tempo de reptilase
TSA: Tripticase soja agar
TSS: Tripticase soja com sangue
TT: Tempo de trombina
TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
TVP: Trombose venosa profunda
UFC: Unidades formadoras de colónias
UK NEQAS: *United Kingdom National External Quality Assessment Service*
UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica
VCAT: Vancomicina-colistina-anfotericina-trimetoprim
VCM: Volume corpuscular médio
VCS: Volume-condutividade-scattering
VS: Velocidade de sedimentação
VPM: Volume plaquetar médio
WBC: *White blood cells*
XLD: Xylose-lysine-deoxycholate

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo expor as atividades desenvolvidas no estágio realizado no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, integrado no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Microbiologia e Hematologia são as áreas laboratoriais descritas mais pormenorizadamente, apesar do estágio ter incluído outras áreas - Bioquímica e Imunologia.

Serão abordadas as metodologias utilizadas e a interpretação de resultados, acompanhados de um enquadramento teórico.

ABSTRACT

This report aims to expose the activities developed on the internship performed at the Clinical Patology service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, as part of the Clinical Analysis Master's Degree of the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Microbiology and Hematology are the areas described in more detail, although the internship included other areas - Biochemistry and Immunology.

Used methodologies and result interpretations will be addressed, along with a theoretical framework.

I. INTRODUÇÃO

Este relatório é referente ao estágio integrado no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o qual foi realizado no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e teve a duração de seis meses (janeiro de 2016 a junho de 2016).

Este estágio constituiu uma oportunidade para o mestrando aplicar os conhecimentos adquiridos durante a formação académica e incitou a integração na rotina laboratorial, de maneira a alcançar o principal objetivo, a obtenção de competências necessárias para a entrada no mundo profissional.

As análises laboratoriais são um complemento essencial à avaliação clínica para a obtenção de um diagnóstico. Para que os resultados emitidos sejam fiáveis, é fundamental a consciencialização para a existência das diferentes etapas em que se divide o processo analítico num laboratório de análises clínicas: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica.

Durante o estágio nas áreas da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia, pude acompanhar as atividades desenvolvidas em todas as fases, desde a colheita de amostras sanguíneas, receção de amostras, manuseamento de equipamentos, procedimentos executados nas mais variadas amostras, avaliação e interpretação de resultados até à validação dos mesmos, e pude participar ativamente em muitos destes procedimentos.

Este relatório aborda as áreas da Microbiologia e Hematologia, onde será descrito todo o processamento dado às amostras desde a sua entrada no Laboratório até à emissão dos resultados analíticos.

II. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O serviço de Patologia Clínica pertencente ao CHUC localiza-se no Edifício São Jerónimo. É composto por uma sala de espera e de receção de produtos biológicos, por uma zona de colheita de sangue dividida em várias cabines, gabinetes de secretariado e múltiplas salas de processamento das amostras. Estas estão automatizadas com todos os equipamentos adequados às áreas da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hematologia.

Este serviço conta com uma equipa móvel de transporte e entrega de amostras provenientes dos vários serviços do CHUC. A restante equipa de trabalho é composta por diversos profissionais da área da saúde, como médicos, técnicos superiores de saúde e técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Todo o Laboratório está interligado informaticamente através do sistema Clinidata (Maxdata).

O Laboratório possui o equipamento OLA2500 (Olympus) que tem a capacidade de aliquotar e distribuir as amostras recebidas consoante os seus pedidos, diminuindo assim tempo e erros da fase pré-analítica.

Durante o período de estágio (seis meses) o CHUC realizou um total de 4280393 análises, sendo que a grande maioria é pertencente à Bioquímica, seguida da Hematologia.

O setor da Microbiologia divide-se nas áreas da Bacteriologia, Micobacteriologia, Parasitologia e Micologia e tem uma zona própria de receção de amostras. O papel da Microbiologia é identificar microrganismos presentes nos mais diversos produtos biológicos e testar a respetiva resposta a antimicrobianos.

Na Bioquímica, as amostras analisadas são, principalmente, o soro e a urina. As análises executadas neste setor passam pela determinação de iões, glicose, hemoglobina glicada, colesterol total e as suas frações, triglicerídeos, proteínas, enzimas, hormonas, marcadores tumorais, sedimento urinário. Dentro do setor da Bioquímica, o Laboratório tem o serviço de Urgência que funciona 24 horas por dia. Realiza gasometrias, assim como outras análises incluídas numa cadeia de equipamentos, por onde as amostras são distribuídas.

O setor da Imunologia, que trabalha maioritariamente com soro, é responsável pelo doseamento de imunoglobulinas, cadeias leves, proteínas do complemento, através da nefelometria; pela deteção de IgE's específicas pelo método FEIA (*Fluorescence enzyme immunoassay*) para o estudo de alergias; pelo estudo das proteínas séricas através do proteinograma e imunofixação; e pela pesquisa de fator reumatoide, crioglobulinas e calprotetina. A Imunologia inclui também uma outra área que trabalha de forma independente

– a Auto-imunidade, onde são pesquisados auto-anticorpos utilizando técnicas como imunofluorescência indireta, ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), FEIA, *Imunobloting*, RIA (*Radio immuno assay*).

Relativamente ao setor da Hematologia, possui o seu próprio distribuidor de amostras que tem também a função de armazenamento das amostras analisadas. É utilizado sangue total com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) para os hemogramas e velocidade de sedimentação e plasma citratado para o estudo da coagulação. É também realizado o estudo morfológico do sangue.

A confiança nos resultados emitidos pelo Laboratório está assegurada pelos Controlos de qualidade interno e externo. O controlo interno é efetuado diariamente para todos os parâmetros que serão analisados. Na microbiologia, a utilização de espécies ATCC (*American Type Culture Collection*) garante a qualidade dos resultados obtidos pelos equipamentos. A avaliação externa da qualidade permite avaliar o desempenho do Laboratório comparativamente a outros. Consiste no envio periódico de amostras pela entidade UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*), para onde os resultados obtidos são reportados.

III. MICROBIOLOGIA

O setor da Microbiologia do CHUC engloba quatro sub-setores responsáveis pela pesquisa de microrganismos em amostras biológicas: Bacteriologia, Micobacteriologia, Parasitologia e Micologia.

No presente relatório irei focar-me nas duas primeiras áreas referidas.

A. *Bacteriologia*

As bactérias são microrganismos procariotas que colonizam todo o ambiente que nos rodeia mas também o Homem. Quando um indivíduo é exposto a um microrganismo, pode ser colonizado de forma transitória ou permanente ou ser infetado (ou seja, neste caso o microrganismo pode provocar doença).¹ O organismo humano tem microambientes com diferentes condições, tendo por isso, diferentes bactérias residentes associadas a cada local do organismo humano. O nosso microbioma tem um papel fundamental na defesa contra infeções por agentes patogénicos estritos.² No entanto, alguns dos microrganismos residentes podem provocar doença no seu hospedeiro em determinadas condições (por exemplo, em imunossupressão), sendo então chamados de patógenos oportunistas.¹

É da competência do laboratório interpretar as culturas obtidas de acordo com o contexto clínico e alcançar uma identificação e perfil de suscetibilidades a antibióticos da(s) bactéria(s) valorizadas, de maneira a que o clínico possa iniciar uma antibioterapia eficaz o mais rápido possível.

Para isso, o processamento geral das amostras passa pela realização de um exame microscópico e da inoculação em meios de cultura:

1. Exame microscópico

Para todas as amostras, excetuando a urina e fezes, é feito um esfregaço em lâmina. Depois de secarem, as lâminas são fixadas pelo calor e são submetidas a uma coloração diferencial.

A coloração de eleição na bacteriologia é a Coloração de Gram - distingue bactérias devido à diferente estrutura da parede: as Gram negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana exterior que destabiliza com os reagentes e, por isso, perdem o primeiro corante (cristal violeta) quando tratadas com um descolorante (ácido-acetona) e

coram com o corante de contraste (safranina), adquirindo a cor rosa; as bactérias Gram positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano que lhes permite reter o primeiro corante, obtendo por isso a cor roxa.

No laboratório, todo este processo é automatizado.

As lâminas coradas são observadas ao microscópio com a objetiva de imersão (ampliação de 500x), onde se avalia a presença/ausência de bactérias, a sua quantidade, a reação de Gram, a sua morfologia (bacilos ou cocos) e o seu tipo de agrupamento (por exemplo: em cadeia; em “cacho”).

Este é um exame bastante importante porque é o primeiro contributo para a identificação do microrganismo em causa, podendo por isso direcionar os procedimentos seguintes e até mesmo ser uma orientação precoce da antibioterapia, caso necessário.

2. Exame cultural

Os meios inicialmente semeados dependem do tipo da amostra e do pedido do clínico. Na maior parte das amostras, é essencial que nas primoculturas haja um crescimento generalizado de todos os microrganismos presentes, sendo por isso utilizados, principalmente, meios de enriquecimento. Este tipo de meio é suplementado com nutrientes (através da adição de sangue, por exemplo) permitindo o crescimento de microrganismos mais fastidiosos para além dos pouco exigentes.

Estas culturas são, na sua maioria, observadas após 24 horas de incubação a 37°C para que possa ser feita uma análise macroscópica das colónias que cresceram. São então avaliados parâmetros como o predomínio, a cor e morfologia das colónias (forma, rebordo, superfície), presença ou não de hemólise (se aplicável). A interpretação das primoculturas, tendo em conta o contexto clínico, o tipo de produto e o que pode ser patogénico e o que é comensal, permite a repicagem da(s) bactéria(s) de interesse (o que se pensa ter significado clínico) para meios seletivos e/ou diferenciais de maneira a obtermos colónias isoladas para que as técnicas de identificação e de determinação de suscetibilidades a antibióticos possam ser aplicadas.³

Os meios seletivos favorecem o crescimento de determinado grupo de bactérias em detrimento de outras devido à presença de fatores essenciais ao crescimento do grupo de bactérias que se pretende isolar e/ou de antibióticos que suprimem o crescimento dos restantes grupos.

Quanto aos meios diferenciais, são úteis na medida em que evidenciam visualmente certas características bioquímicas que permitem diferenciar grupos de bactérias.³

Os meios utilizados na rotina do laboratório de Bacteriologia estão descritos na Tabela I.

Tabela I. Meios de cultura utilizados no Laboratório de Bacteriologia do CHUC.

GS	Meio de enriquecimento; Diferencial: detecção da atividade hemolítica
CLED	Ótimo para o crescimento de bacilos Gram negativos (maioria dos uropatógenos); Diferencial: diferencia fermentadores da lactose (meio fica amarelo) de não fermentadores
Hektoen	Seletivo para <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.; Diferencial: deteta fermentadores de lactose, salicina e sacarose (colónias amarelas) e produtores de sulfeto de hidrogénio (H ₂ S) (centro negro)
XLD	Seletivo para <i>Salmonella</i> sp. e <i>Shigella</i> sp.; Diferencial: deteta fermentadores de xilose (colónias amarelas), produtores de H ₂ S e produtores de lisina descarboxilase (halo cor-de-rosa)
CBGN	Meio de enriquecimento e seletivo para enteropatógenos (<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.)
SMAC	Seletivo para <i>Escherichia coli</i> O157:H7; Diferencial: diferencia fermentadoras de sorbitol (colónias rosa) de não fermentadoras
Yersinia selective agar	Seletivo para <i>Yersinia enterocolitica</i>
Campylobacter selective agar	Seletivo para <i>Campylobacter</i> spp.
Clostridium selective agar	Seletivo para <i>Clostridium difficile</i>
Helicobacter pylori selective medium	Seletivo para <i>Helicobacter pylori</i>
HAE2	Seletivo para <i>Haemophilus</i> spp.
PVX	Seletivo para <i>Haemophilus</i> spp. (e <i>Neisseria</i> spp.) (com suplemento de crescimento)

Sabouraud com cloranfenicol	Seletivo para fungos
BCSA	Seletivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
MRSA	Seletivo e diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistentes (MRSA) (colónias rosa)
CM	Meio de enriquecimento
BHI	Meio de enriquecimento
Columbia CNA	Seletivo para bactérias Gram positivas
VCAT	Seletivo para <i>Neisseria</i> spp.
StrepB	Seletivo e diferencial para <i>Streptococcus</i> grupo B (colónias azuis)
HK	Meio de enriquecimento para anaeróbios
SchKV	Meio seletivo para anaeróbios
Anaerobios NE	Meio seletivo para anaeróbios
TSA	Meio utilizado para controlo dos antibiogramas
TSS	Meio utilizado para controlo dos antibiogramas de bactérias fastidiosas
MH	Meio utilizado nos antibiogramas manuais
MHF	Meio utilizado nos antibiogramas manuais de bactérias fastidiosas

GS: Gelose de sangue; CLED: *Cystine lactose electrolyte deficient*; XLD: *Xylose-lysine-deoxycholate*; CBGN: Caldo de bacilos Gram neagativo; SMAC: Sorbitol-MacConkey; HAE2: *Haemophilus*; PVX: PolyViteX; BCSA: *Burkholderia cepacia* selective agar; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; CM: Cooked meat; BHI: *Brain-heart infusion*; CNA: *Colistin-nalidixic acid*; VCAT: Vancomicina-colistina-anfotericina-trimetoprim; HK: hemina-vitamina K; SchKV: *Schaedler-kanamicin-vancomycin*; TSA: Trypticase soja agar; TSS: Trypticase soja sangue; MH: Mueller-Hinton.

Os meios sólidos em placa são inoculados pela técnica de esgotamento do produto (Figura 1), que possibilita a obtenção de colónias isoladas.

Alguns produtos são exceções a esta regra: a urina é inoculada com uma técnica que possibilita um crescimento que pode ser semi-quantificado (Figura 2); o líquido cefalorraquídeo (LCR) é

inoculado por inundação, uma vez que os microrganismos estão sempre presentes em baixas concentrações e o espalhamento dificulta a detecção nessas condições; nos cateteres que são processados diretamente no meio sólido, o inóculo faz-se por rolamento.

Relativamente aos meios líquidos, a inoculação é feita adicionando diretamente a amostra ao meio, seguido de uma homogeneização.

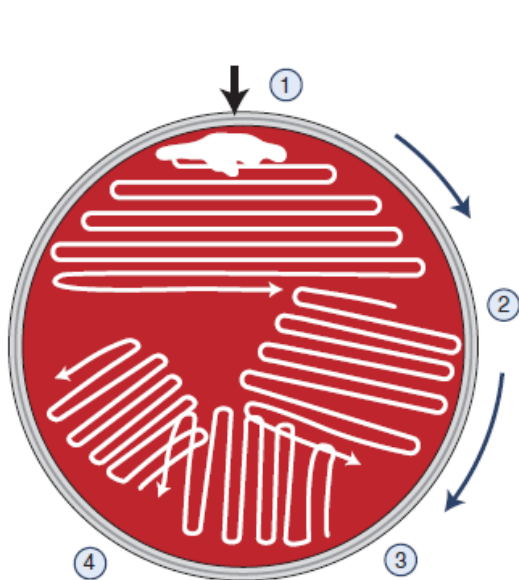


Figura 1. Técnica de sementeira por esgotamento do produto.

Fonte: MAHON, C. [et al.] Textbook of Diagnostic Microbiology, 2015. p. 121.

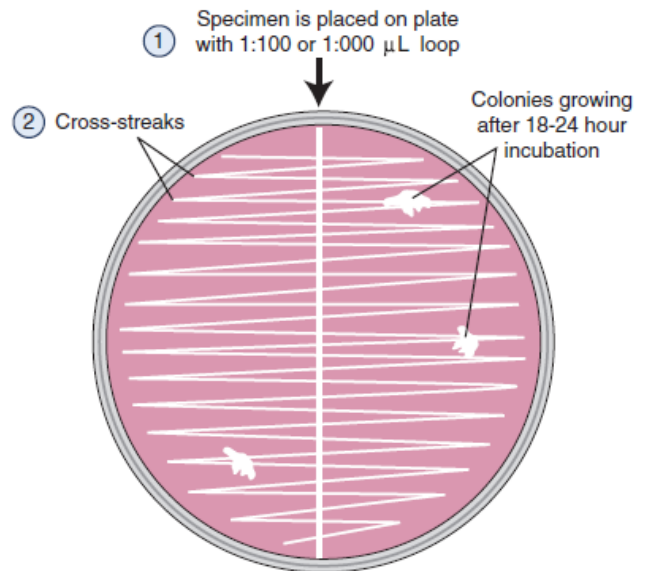


Figura 2. Técnica de sementeira quantitativa.

Fonte: MAHON, C. [et al.] Textbook of Diagnostic Microbiology, 2015. p. 121.

As bactérias anaeróbias são agentes etiológicos de diversas infecções, como por exemplo pneumonia por aspiração, abscesso cerebral, infecções intra-abdominais. Quando há suspeita de infecção por estas bactérias, a colheita, transporte e todo o processamento deve ter em consideração as condições necessárias à sobrevivência dos anaeróbios.⁴

Para a sua pesquisa, a amostra é inoculada em três meios: no enriquecido HK (Hemina-Vitamina K) e nos seletivos SchKV (*Schaedler-Kanamycin-Vancomycin*) e Anaerobios NE.

No meio HK é colocado um disco impregnado com netilmicina. Ao haver resistência ao antibiótico, confirma-se a presença de anaeróbios. Os meios são incubados numa câmara própria em atmosfera de anaerobiose e observados passadas 48 horas.

3. Produtos biológicos

a) Urina

Esta é das amostras mais frequentes que chegam ao laboratório.

Apesar do trato urinário possuir alguns mecanismos de defesa contra infeções, como a elevada osmolaridade e baixo pH da urina e a “limpeza” de possíveis patógenos por arrastamento durante a micção, este é um dos locais anatómicos mais suscetíveis a infeção, sendo mesmo a causa mais comum de infeções nosocomiais e com representatividade em todos os grupos etários.⁵

No entanto, as mulheres são muito mais afetadas por esta infeção do que os homens devido a questões anatómicas (o comprimento da uretra é muito mais curto, o que facilita a passagem de bactérias da zona perirectal) aliada ao facto de, ao contrário dos homens, não possuírem fluídos prostáticos (inibem os microrganismos). Como consequência de alterações anatómicas e hormonais, as infeções do trato urinário (ITU) são ainda mais prevalentes em mulheres grávidas.⁵

O agente infeccioso pode aceder ao trato urinário através de três vias: ascendente (a mais comum), hematogénea ou linfática. Consoante o local do trato urinário infetado, as ITU podem-se manifestar como uretrite, cistite, ureterite e pielonefrite. O quadro clínico da ITU é então bastante variável (pode mesmo ser assintomático) e influenciado pela localização da infeção mas também por outros fatores – as infeções mais complicadas surgem, por norma, em indivíduos imunossuprimidos e/ou hospitalizados com cateterização urinária.⁶

Escherichia coli é responsável pela maioria das ITU adquiridas na comunidade (*E. coli* uropatogénica – UPEC), à frente de outras Enterobacteriaceas. Quanto a ITU nosocomiais, podem-se identificar bactérias como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp..^{6,7}

A colheita de amostra para o diagnóstico das infeções urinárias é das mais banais, podendo ser, na grande maioria dos casos, realizada pelo próprio paciente pela colheita do jato intermédio da primeira urina da manhã. Isto é importante para que as bactérias colonizadoras da parte distal do trato sejam arrastadas no primeiro jato e a contaminação seja minimizada ao máximo (apesar de ser muito provável a presença de alguma(s) bactéria(s) do microbioma normal nas culturas).

Em casos especiais, a urina pode ser colhida através de sacos coletores e por aspiração supra-púbica.

As amostras para urocultura chegam ao Laboratório em tubos apropriados, que contêm borato de sódio, capaz de conservar a população microbiológica presente na amostra. Após agitação, a amostra é inoculada nos meios GS e CLED com uma ansa calibrada de plástico de 1 µL. A técnica de inoculação caracteriza-se por ter uma zona central de maior inóculo a partir de onde se estendem estrias mais largas, de maneira a permitir uma leitura semi-quantitativa e possivelmente colónias isoladas (Figura 2).

As uroculturas são incubadas e observadas após 24 horas de incubação. Estas culturas quase sempre contam com a presença de microrganismos comensais (como *Staphylococcus coagulase negativa*), mas quando estão presentes mais que três microrganismos, sem predomínio de um tipo de colónia, são consideradas contaminadas e não são mais processadas. Isto porque as ITU são quase exclusivamente causadas por um único uropatógeno.⁷ As culturas com uma ou duas populações de bactérias predominantes (igual ou superior a 10⁵ UFC) seguem para isolamento ou identificação.

b) Fezes

O trato gastrointestinal, especialmente o intestino grosso, é colonizado por uma grande quantidade de bactérias, essencialmente bacilos Gram negativos anaeróbios, como *Bacteroides* spp., e facultativos como as *Enterobacteriaceae*.

As infeções entéricas são bastante comuns, podendo provocar desde situações agudas auto-limitantes, a complicadas em determinados grupos de risco e até a morte.

O microbioma intestinal mantém-se constante devido a certos mecanismos de defesa: a acidez do estômago, os movimentos peristálticos, o muco que cobre o epitélio e a secreção de IgA no cólon.^{1,5} No entanto, os agentes enteropatógenos são capazes de causar doença através de diversos mecanismos: produção de enterotoxinas causadoras de alteração do balanço hidroelectrolítico (*Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* tipo I, *E. coli* enterotoxinogénica [ETEC], *Salmonella* spp., *Clostridium difficile* [toxina A], *Campylobacter jejuni*); produção de citotoxinas que provocam destruição celular com consequente resposta inflamatória (*Shigella* spp., *C. difficile* [toxina B], *E. coli* enterohemorrágica [EHEC]); grande capacidade de adesão à mucosa e alteração da função celular (*E. coli* enteropatógenica [EPEC], *E. coli* enterohemorrágica [EHEC]); invasão da mucosa intestinal (nesta situação pode haver disseminação e infeção sistémica) (*Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasiva [EIEC], *C. jejuni*, *Yersinia enterocolitica*).⁵

Este é mais um caso em que a colheita da amostra é realizada pelo próprio utente.

Os enteropatógenos de rotina a pesquisar são *Salmonella* sp. e *Shigella* sp.. Para o efeito, todas as amostras fecais são inoculadas nos meios sólidos Hektoen e XLD e também no meio líquido CBGN. Passadas pelo menos oito horas, o meio CBGN é repicado para os meios Hektoen e XLD.

Para além de serem inoculadas nestes meios, as amostras vindas do Hospital Pediátrico, são também cultivadas nos meios SMAC, Yersinia selective agar e Campylobacter selective agar. Este último é incubado em atmosfera microaerófila a 43°C e a sua observação é realizada passadas 48 horas.

A pesquisa de *C. difficile* em amostras fecais é um pedido que pode surgir, sendo feita através de um ensaio imuno-enzimático. A deteção do seu antígeno glutamato desidrogenase confirma a sua presença; no entanto, a técnica não é capaz de distinguir estirpes toxinogénicas. Em amostras positivas para a presença de *C. difficile*, o locus de patogenicidade, que codifica o gene da toxina A e o da toxina B é pesquisado através de um ensaio de amplificação de DNA (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). A presença do locus patogénico significa que se trata de uma estirpe toxinogénica de *C. difficile*.

Nas amostras com *C. difficile*, para além da PCR, é inoculado um meio seletivo para *Clostridium* sp..

c) Produtos do Trato respiratório

Ao contrário do trato respiratório inferior, o trato superior é colonizado por um enorme microbioma normal, constituída por não patógenos e por potenciais patógenos.

Por ser um sistema que faz a conexão entre o interior do corpo humano e o ambiente exterior, está constantemente sujeito à entrada de microrganismos. Os mecanismos de defesa que possui evitam o estabelecimento de infeções e evitam a chegada de microrganismos ao trato inferior: a própria flora do trato superior; os pelos nasais; o tapete mucociliar dos seios nasais, ouvido médio e árvore traqueobronquial; as fossas nasais humidificadas; a IgA e lisozimas presentes nas secreções respiratórias. Adicionalmente, as próprias ações de tossir, espirrar e engolir são barreiras à instalação de infeções. Caso cheguem aos alvéolos pulmonares, são fagocitados por macrófagos alveolares.

Apesar disso, os patógenos possuem determinados fatores que, por vezes, lhes permitem conseguirem escapar aos mecanismos de defesa: fatores de aderência, toxinas, fatores de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, como a cápsula e a multiplicação dentro de células fagocíticas.⁵

Alguns dos microrganismos a valorizar numa amostra respiratória são: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Klebsiella* spp..

As amostras mais recebidas para o diagnóstico destas infeções são expetoração, aspirado brônquico e lavado broncoalveolar.

Apesar da expetoração ser uma amostra bastante comum, o seu valor é questionável, uma vez que virá contaminada com microbioma comensal do trato respiratório superior.

Por esta razão, antes do seu processamento é feito um *screening* para avaliar a sua qualidade, que consiste num esfregaço seguido de coloração de Gram, em que se avalia a quantidade de células inflamatórias e células epiteliais. Uma amostra de fraca qualidade resulta de uma má colheita em que se obteve saliva (ou seja, é uma amostra da orofaringe que traz consigo células epiteliais e é bastante contaminada com a flora aí residente). Estarão presentes poucos leucócitos e muitas células epiteliais. O processamento cessa por aqui e é aconselhado o envio de nova amostra.

Numa boa amostra (grande quantidade de leucócitos e poucas células epiteliais), avalia-se o tipo de bactérias presentes e é dada uma quantificação às células epiteliais, leucócitos e bactérias. Estas, assim como todos os aspirados brônquicos e lavados broncoalveolares, são cultivados nos meios GS e HAE2.

A única exceção onde não é feito um *screening* às expetorações, é em amostras de doentes com fibrose quística; estas são sempre processadas porque todas as bactérias que aparecerem são de valorizar, contrariamente às expetorações de outros doentes, em que se avalia principalmente o predomínio de determinada bactéria. É frequente encontrar *Pseudomonas* spp. nas amostras destes doentes; muitas vezes também *S. aureus*, *H. influenzae* e complexo *Burkholderia cepacia*. De maneira a ser possível recuperar todos os diferentes microrganismos que possam estar presentes, para além das suas amostras serem cultivadas em GS e HAE2, são também em Sabouraud com cloranfenicol e em meio BCSA.

Relativamente a produtos do trato respiratório, o Laboratório pode ainda receber zaragatoas nasais. O seu processamento tem o objetivo de rastrear colonizações por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, sendo inoculada em meio MRSA.

Esta bactéria pode causar graves infeções a nível cutâneo, principalmente em ambiente hospitalar, embora possa também causar infeção na comunidade em pessoas colonizadas previamente saudáveis.⁸

d) Zaragatoa de inserção de cateter e Ponta de cateter

A utilização de cateteres em ambiente hospitalar é imprescindível. Porém, constituem um grave problema uma vez que é relativamente frequente ocorrerem infecções derivadas do seu uso por constituírem uma porta de entrada a microrganismos.

Ao fim de alguns dias de ser colocado, a maioria dos cateteres estarão colonizados por bactérias produtoras de biofilme, que lhes permite uma fácil adesão ao instrumento. Estas podem proliferar o suficiente para causar uma infecção local ou sepsis (cenário bastante provável). A infecção dá-se por entrada de bactérias presentes no cateter ou na pele no local de inserção do cateter, sendo por isso as mais comuns pertencentes à flora da pele - *Staphylococcus coagulase negativa* (particularmente *Staphylococcus epidermidis*).¹⁰

Para avaliar a possível origem de uma sepsis, chegam ao laboratório zaragatoas de inserção do cateter, que são inoculadas em meio GS e pontas de cateter, que podem ser diretamente roladas em GS (se for fino) ou colocadas em meio BHI (repicado para GS no dia seguinte).

Estas culturas devem ser interpretadas juntamente com as hemoculturas correspondentes, colhidas aquando da remoção do cateter.

e) Sangue

As infecções na corrente sanguínea são sempre situações de elevado risco, uma vez que podem levar à disseminação do microrganismo por todos os órgãos, causando a sua falha. O seu diagnóstico rápido é, portanto, crucial.

A bacteriemia pode ser transitória (bactéria é rapidamente eliminada pelo sistema imunitário, não levando a septicemia), contínua (em infecções endovasculares) ou intermitente. A maioria das bacteriemias ocorre secundariamente a uma infecção primária localizada que liberta bactérias para a circulação intervaladamente, sendo por isso intermitente. É, por isso, importante serem realizadas várias colheitas (o ideal serão três colheitas em tempos aleatórios durante 24 horas).^{1, 5}

A colheita executa-se por punção venosa. É essencial ter bastante cuidado com a preparação da pele de maneira a evitar a contaminação do sangue com o microbioma normal da pele (como *Staphylococcus coagulase negativa*, *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp.).⁴ O sangue é um produto estéril, logo qualquer agente microbiano encontrado é de valorizar. No entanto, é importante saber distinguir uma infecção de uma contaminação, com o auxílio do quadro clínico e das restantes hemoculturas.

As amostras de sangue são entregues no Laboratório de bacteriologia já inoculadas em frascos de hemocultura, que são incubados no sistema de deteção automático BacT/ALERT (BioMérieux). Ao haver crescimento bacteriano, o dióxido de carbono vai aumentando no meio e, conseqüentemente, o pH vai diminuir, levando a uma alteração da cor de um sensor colorimétrico que se encontra no fundo das garrafas de hemocultura. Esta alteração de cor é lida pelo aparelho, que emite o sinal de positividade (o equipamento faz a leitura a cada 10 minutos). Esta informação é passada automaticamente para o sistema informático - para o programa Myla (BioMérieux).

Para que possa ser feito o isolamento e identificação das bactérias presentes nas hemoculturas positivas, estas são cultivadas em meio GS e é feita uma coloração de Gram.

Após uma hemocultura estar cinco dias incubada no aparelho sem positivar, é dada como negativa. O aviso surge também no programa Myla.

Algumas das bactérias encontradas numa infeção do sangue são *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. e *P. aeruginosa*. Para além destas, também algumas bactérias frequentes em ambiente hospitalar e que colonizam a pele, orofaringe e trato gastrointestinal de doentes hospitalizados, podem ser encontradas nestas situações.⁵

f) Líquido Cefalorraquidiano

O sistema nervoso central (SNC) é composto pelo cérebro e pela espinal medula. A revestir estas estruturas, estão as meninges (constituídas pela dura mater, membrana aracnóide e pia mater). O LCR encontra-se no espaço sub-aracnóide (entre a membrana aracnóide e a pia mater) e forma uma proteção mecânica do SNC.

Para além do LCR, o SNC conta com outros sistemas de proteção: a estrutura óssea envolvente, as meninges e a barreira hematoencefálica que tornam a entrada de microrganismos no SNC dificultada ao máximo. Apesar disso, por vezes conseguem atingi-lo, através de determinadas vias: hematogénea, a mais comum; disseminação a partir de um local próximo primariamente infetado (das vias respiratórias e auditivas); defeito anatómico no SNC (resultantes de cirurgia, trauma ou anomalias congénitas); transportado ao longo dos nervos periféricos.

As infeções do SNC geralmente apresentam-se como meningite, encefalite ou meningoencefalite. Ou seja, inflamação das meninges, do encéfalo ou de ambos, respetivamente.

A etiologia da meningite aguda varia com a idade do hospedeiro:

Recém-nascidos: maioritariamente, bactérias flora vaginal da mãe durante o parto – *Streptococcus* grupo B, *E. coli*, outros bacilos Gram negativos, *Listeria monocytogenes*;

Bebés: *Streptococcus agalactiae*, *L. monocytogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*;

Crianças: *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tipo b;

Adultos: *S. pneumoniae*.^{3, 5, 9}

A colheita do LCR é feita por punção lombar. Apesar de ser um processo bastante delicado, deve-se ter sempre atenção ao volume colhido, porque um volume diminuído pode-se traduzir num resultado falso negativo.

Para a análise bacteriológica, o LCR é centrifugado (10 minutos a 2500 rpm) e o sedimento homogeneizado é processado: semeado por inundação nos meios GS, PVX e em BHI (repicado no dia seguinte). Também se realiza um exame microscópico, que irá orientar o seguimento dado às culturas (a amostra também não se espalha na lâmina).

g) Líquido pleural, Líquido peritoneal e Líquido sinovial

Por serem fluídos estéreis em condições normais, a presença de qualquer bactéria e em qualquer quantidade, é de valorizar.

Em situação de infeção, há uma acumulação do líquido em causa – forma-se um exsudato rico em células inflamatórias.

Em caso de suspeita de infeção por anaeróbios, a amostra deverá ser transportada num recipiente adequado às necessidades destas bactérias (em atmosfera anaeróbica).

O líquido pleural é semeado nos meios GS, PVX e CM; o líquido peritoneal é inoculado em GS e CM; e o líquido sinovial em GS e BHI. Após cerca de 24 horas de incubação, os meios de enriquecimento CM e BHI podem ser repicados para novos meios mais seletivos.

Para todos estes produtos é inicialmente realizado exame microscópico.

h) Exsudado de ferida e Pus de abcesso

Consoante o tipo de ferida (superficial ou profunda), a colheita é feita por zaragatoa ou aspiração.⁹ No caso da colheita de pus de abcesso, é sempre realizada por aspiração.

Os exsudados de feridas podem ser devidas de diversas situações clínicas, sendo apenas inoculados em meio GS e feito um esfregaço em lâmina, corado pela coloração de Gram. Após observação ao microscópio e observação da primocultura, o procedimento seguinte pode ser orientado.

Geralmente, o pus de abcesso é entregue no Laboratório de bacteriologia num contentor de atmosfera anaeróbica, pois é habitual a presença de anaeróbios nesta amostra. Para além da inoculação em meio GS e da coloração de Gram, é também inoculada em meio CM.

i) Fragmento de tecido

Estas amostras são obtidas por biópsia.

Inicialmente são cortadas com o auxílio de lâminas esterilizadas e, seguidamente, os fragmentos são inoculados nos meios GS, CM, Sabouraud com cloranfenicol, para além de ser feito o exame microscópico. O CM pode ser utilizado para a realização de um novo exame microscópico e permite também a repicagem para outros meios (normalmente GS). Se se justificar, a repicagem a partir do CM pode ser feita para meios de anaeróbios.

As biópsias gástricas são inoculadas em meio seletivo para *Helicobacter pylori* e incubadas em atmosfera microaerofílica a 37°C.

Biópsias superficiais (da pele) são processadas em Sabouraud com cloranfenicol a 25°C e a 30°C.

As biópsias podem ficar incubadas até 20 dias até o resultado microbiológico ser dado como negativo.

j) Placenta

Amostras de placentas são enviadas para o laboratório para determinar possíveis causas de aborto, parto prematuro ou caso o clínico suspeite de alguma infeção.⁴

Após ser cortada, a amostra placentária é inoculada nos meios GS, CNA e dois BHI - um incubado a 37°C e outro a 4°C. As culturas em BHI são repicadas para CNA após cinco dias. Inicialmente, a amostra é também observada microscopicamente.

É importante a incubação de BHI a duas temperaturas diferentes para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Esta bactéria cresce num grande intervalo de temperatura, mas é das únicas que cresce a 4°C.⁴

Em mulheres grávidas, a infeção por *L. monocytogenes* pode causar sintomas do tipo gripais, que podem passar despercebidos. No entanto, pode infetar a placenta e atravessá-la, infetando o feto, o que pode levar a um parto prematuro ou mesmo a aborto.⁴

k) Exsudado vaginal

A flora vaginal é altamente influenciada por fatores hormonais. Por esta razão, a sua composição sofre alterações com a idade, nomeadamente na entrada na puberdade e na menopausa. As bactérias colonizadoras predominantes na mulher em idade reprodutiva pertencem ao género *Lactobacillus* spp., que evitam a proliferação de espécies patogénicas.

As infeções do trato genital são, por norma, infeções exógenas transmitidas por via sexual. Algumas delas são a vaginite (desequilíbrio da flora normal, sendo o domínio de *Lactobacillus* sp. substituído por uma flora mista), cervicite e uretrite.

As zaragoas vaginais são semeadas nos meios GS, CNA e VCAT, para além de ser realizada uma coloração de Gram para o exame microscópico.

Associado a esta amostra, pode também vir pedido a pesquisa de *Chlamydia* (pesquisa por PCR) e *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp..

O teste para pesquisa de *M. hominis* e *Ureaplasma* spp. é feito através de um dispositivo que engloba um frasco para cultura com um caldo seletivo e uma galeria que permite fazer: identificação; contagem indicativa, que determina se o título da bactéria é igual ou superior ao limiar estabelecido de 10^4 UFC; testes de suscetibilidade de *M. hominis* e *Ureaplasma* spp. em relação a nove antibacterianos.

Algumas mulheres são colonizadas por *Streptococcus* grupo B (*Streptococcus agalactiae*) que pode ser transmitido ao recém-nascido durante o parto e consequentemente causar meningite. Por esta razão, todas as grávidas fazem um rastreio a esta bactéria às 35-37 semanas de gestação. Na colheita é feita uma amostragem da vagina e reto usando a mesma zaragoa. A inoculação faz-se em meio específico para *Streptococcus* grupo B.⁴

l) Exsudado ocular

O sistema ocular possui barreiras de defesa específicas: as pestanas, que evitam a entrada de material estranho; o pestanejar – secreções das glândulas lacrimais “lavam”; lisozima e IgA secretadas; a própria flora normal encontrada no saco conjuntival (embora em baixas quantidades) - *S. epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *S. aureus*, *H. influenzae*, etc. Apesar disso, uma infeção ocular é capaz de se instalar em algumas situações: quando há rutura da esclera ou córnea; via hematogénea como infeção secundária; por extensão de infeção dos seios perinasais.⁵

As infeções oculares podem ocorrer em estruturas externas: pálpebra, conjuntiva, córnea (blefarite, conjuntivite e queratite, respetivamente); ou internas: córnea, retinite,

humor aquoso e humor vítreo (corioretinite e endoftalmia). Para além disso, o sistema lacrimal pode, de igual forma, ser infetado – canaliculite, dacriocistite, dacrioadenite.

Alguns dos agentes causadores de doença nestas situações são *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *P. aeruginosa*, *Bacillus spp.*^{9, 11}

A colheita para o diagnóstico de infeções oculares é complexa, o que muitas vezes se traduz numa amostra reduzida. Adicionalmente ao facto do número de microrganismos mesmo em situação de infeção ser reduzido, é recomendado usar o maior volume possível de inóculo (do que se conseguiu amostrar) e vários meios de maneira a facilitar a recuperação dos patógenos.

Esta amostra chega ao laboratório já em lâmina corada e semeada nos meios GS, PVX e Sabouraud com cloranfenicol.

4. Identificação

Ao longo do processamento de uma amostra, a identificação de uma bactéria vai sendo presumida ao ter em conta o quadro clínico, a origem da amostra, o seu aspeto no exame microscópico e na avaliação macroscópica das colónias em cultura e, eventualmente, algumas características bioquímicas observadas em cultura.³

Para prosseguir para os testes de identificação definitiva, as colónias têm que ser puras, de maneira a evitar erros.

Estes testes podem ser realizados em dois equipamentos automáticos:

VITEK MS (BioMérieux)

Este sistema automatizado identifica os microrganismos por espetrometria de massa, através da tecnologia MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*).

O aparelho utiliza slides que se dividem em três quadrantes com 17 poços cada (um deles para o controlo, que consiste em *E. coli* ATCC).

Cada poço é inoculado com uma porção da colónia pura, onde é colocada também uma matriz que irá facilitar a libertação da bactéria da superfície. Depois de pronto, o slide é inserido no aparelho, num ambiente de alto vácuo. A amostra é ionizada por um laser, promovendo a libertação de proteínas, que são “arrastadas” por uma carga elétrica para um eletrodo. O *Time of Flight* varia conforme a massa e é registado para cada proteína. Esta informação é convertida num espetro, que é específico para cada espécie de bactéria.

O espectro obtido é comparado com uma enorme base de dados que o sistema de identificação possui.^{12, 13}

O resultado é dado associado a um valor de confiança baseado na precisão da correspondência dos espectros obtidos com os da base de dados. Quando este valor é baixo, o procedimento é repetido.

VITEK 2 (BioMérieux)

A metodologia do VITEK 2 baseia-se em provas bioquímicas, tendo estas uma leitura colorimétrica.

Utiliza cartas de identificação com poços contendo determinados substratos, onde as reações bioquímicas ocorrem. Estas diferem consoante os diferentes grupos de cartas, orientados para um determinado grupo de bactérias: bacilos Gram negativos; bactérias Gram positivas; leveduras; *Neisseria* e *Haemophilus*; bactérias anaeróbias.¹⁴

O processo é feito a partir de uma suspensão mãe feita em solução salina (com 0,65 McFarland para bactérias Gram negativas e 0,7 para bactérias Gram positivas). É recomendável que as colónias em questão tenham menos de 48 horas. A suspensão é aspirada e distribuída pelos poços da carta pelo aparelho.

Conforme o padrão de resultados das provas bioquímicas obtido na leitura, o aparelho dá a identificação.

5. Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos

Após o microrganismo estar identificado, prossegue-se com os Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos, que fornece resultados fundamentais para o clínico determinar a terapia mais adequada a administrar ao doente.

Como nos testes de identificação, é imperativa a realização do antibiograma a partir de culturas puras.

A realização e interpretação dos resultados do antibiograma são feitas de acordo com as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (ou do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI – para antibióticos não definidos no EUCAST).

Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos automático

Este procedimento é também realizado no equipamento VITEK 2 (BioMérieux). Tal como na identificação, é utilizado um sistema de cartas: *Staphylococcus* sp.; *Streptococcus pneumoniae*; *Enterococcus* sp.; *Enterobacteriaceae*; não fermentadores; leveduras. Cada uma tem

nos seus poços os antibióticos a testar para o grupo de bactérias correspondente, numa concentração conhecida. O teste de suscetibilidades é feito a partir de uma suspensão mãe que é aspirada para os poços da carta pelo aparelho. Após um período de incubação de pelo menos oito horas, o aparelho lê a densidade dos poços para avaliar o crescimento bacteriano por turbidimetria, e disponibiliza o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a sua interpretação, dando o resultado como suscetível ou resistente, através do sistema de validação *Vitek2 Advanced Expert* (BioMérieux).

Em paralelo, as suspensões são inoculadas no meio tripticase soja agar (TSA) ou no meio TSA suplementado com sangue, para bactérias mais exigentes (TSS) para controlo da pureza da suspensão.

Para controlo dos antibiogramas realizados neste equipamento, são utilizadas bactérias ATCC (*American Type Culture Collection*) com perfil de suscetibilidades conhecidas, que variam semanalmente.

É importante referir que o teste de suscetibilidade a antimicrobianos apenas pode ser realizado a partir de meios que não possuam antibióticos (GS, CLED, PVX) para que não hajam interferências no crescimento das bactérias.

Teste de Suscetibilidade a Antimicrobinos manual

O antibiograma é executado manualmente para algumas bactérias para as quais não está definido antibiograma automático ou quando o resultado deste é inconsistente, através do método de difusão em disco ou em tiras *E-test*.

Uma suspensão da bactéria em estudo (0,5 McFarland) é inoculada em meio MH ou MHF (MH suplementado com sangue, para bactérias mais fastidiosas) pela técnica de Kirby Bauer modificada. O meio fica completamente inoculado, uniformemente e com três camadas em diferentes direções. Após colocação dos discos impregnados com concentrações conhecidas de antibióticos, as placas são incubadas a 37°C e no dia seguinte o halo de inibição é medido em milímetros, dando o resultado de suscetível ou resistente aos antibióticos utilizados.

As tiras de *E-test* possuem um gradiente de concentração do antibiótico, possibilitando a leitura da CMI, ou seja, é uma técnica quantitativa. Por isso, para além de serem utilizadas para as bactérias para as quais está definido, podem ser utilizadas quando a CMI proveniente do antibiograma automático precisa de ser confirmada.

Para controlo dos testes de suscetibilidades manuais, é inoculado o meio TSS (PVX para *Haemophilus sp.*), para garantir a pureza da suspensão.

B. *Micobacteriologia*

Este grupo de bactérias é detentor de características bastante distintas e que implicam um processamento bastante diferente das amostras em que é necessária a sua pesquisa. Por essa razão, no Laboratório de Microbiologia o estudo micobacteriológico é realizado separadamente do bacteriológico.

As micobactérias são um grupo de bacilos aeróbios estritos, imóveis, com alto teor em lípidos na sua parede, nomeadamente em ácidos micólicos (ácidos gordos de cadeia longa); daí serem extremamente impermeáveis e serosas e, conseqüentemente, resistentes a desinfetantes, antibióticos antibacterianos comuns e aos corantes tradicionais. Para além disso, também as torna de crescimento lento (na sua maioria).^{1,2}

Várias espécies de *Mycobacterium* são patógenos para os humanos, sendo as mais prevalentes, as pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium tuberculosis* (a mais frequente), capazes de causar tuberculose. Contudo, existem espécies de micobactérias não tuberculosas capazes de provocar doença no Homem (*Mycobacterium leprae*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium goodii*), apesar de algumas poderem ser colonizadoras de indivíduos saudáveis.^{4,5} São responsáveis por doença essencialmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo por isso considerados patógenos oportunistas.²

Algumas das amostras recebidas para pesquisa de micobactérias são: expectoração, lavados broncoalveolares, aspirados broncoalveolares, biópsias, sangue.

1. Digestão / Descontaminação

A maioria das amostras são muito mucosas e está contaminada por flora normal. Para que se possa avaliar apenas o crescimento de micobactérias, é necessário liquefazer as amostras e eliminar a flora associada, o que é feito com o kit de digestão/descontaminação de amostras para processamento de amostras de micobactérias - BD BBL MycoPrep, através da ação mucolítica e descontaminante de uma solução de N-acetil-L-cisteína – hidróxido de sódio (NALC-NaOH). A esta solução adiciona-se tampão fosfato para que a reação seja parada e o pH equilibrado. Após centrifugação e decantação do sobrenadante, obtém-se uma amostra concentrada e descontaminada adequada para o seguinte processamento.

É importante que a descontaminação não seja demasiado agressiva, para não afetar as micobactérias; nem demasiado leve, para não persistirem bactérias da flora normal na amostra. O ideal será uma descontaminação de cerca de 7%.

O LCR não necessita de digestão/descontaminação, uma vez que é uma amostra fluída e normalmente estéril, sendo apenas centrifugado e processado o sedimento.

No caso de amostras muito líquidas, como urinas, alguns lavados, alguns líquidos pleurais, são inicialmente centrifugadas; só depois se procede à digestão / descontaminação.

As biópsias e fragmentos ósseos são primeiro colocados em meio Middlebrook para enriquecer; só depois se realiza a digestão e descontaminação.

As amostras de sangue vêm já em frascos de hemoculturas e são diretamente inseridas no equipamento BACTEC (BD, Porto, Portugal). Dispensa o procedimento de descontaminação por ser um produto estéril.

A partir das amostras já tratadas é feita uma lâmina e um exame cultural em meio líquido e sólido. O exame cultural tem grande importância no diagnóstico e monitorização da terapêutica pois é o único que garante a existência de microrganismos viáveis.

2. Exame microscópico

Por terem um alto conteúdo em ácidos micólicos, as micobactérias não coram com a coloração de Gram e são resistentes ao descolorante ácido-álcool.³

A coloração geralmente utilizada para estas bactérias é a coloração de Kinyoun, que representa uma modificação da coloração de Ziehl-Neelsen, bastante utilizada na pesquisa de bactérias ácido-álcool resistentes.

As bactérias são inicialmente tratadas com elevadas concentrações de carbol fucsina ácida (corante vermelho) e fenol – este solubiliza os lípidos, possibilitando uma melhor penetração do corante. As elevadas concentrações utilizadas evitam a utilização do calor da técnica de Ziehl-Neelsen. Seguidamente, as bactérias são tratadas com um ácido-álcool, um agente descolorante forte. Como resistem a este tratamento, as micobactérias ficam coradas de vermelho. As restantes bactérias descoram e, após adição de azul metileno, coram de azul (assim como outras células).

Após observação do esfregaço corado ao microscópio, é dado um resultado qualitativo e, em relação às amostras positivas para a presença de bactérias ácido-álcool resistentes, é dado um resultado semi-quantitativo também. Para além disso, o exame microscópico pode

também ser um auxílio na identificação da espécie (por exemplo: *M. tuberculosis* tem aspeto em cordas).

São feitas lâminas para todas as amostras, exceto fezes e urina, pois apresentam uma baixa sensibilidade.

3. Exame cultural

Meio líquido

Para a pesquisa de micobactérias através de exame cultural, são utilizados tubos MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube* - BD, Porto, Portugal), que contêm meio de enriquecimento Middlebrook e, no fundo, um composto fluorescente envolvido em silicone que é sensível ao oxigénio inicialmente presente no tubo. A estes é adicionado um suplemento de crescimento (BACTEC MGIT *Growth Supplement*) para acelerar o crescimento das micobactérias e um cocktail de antibióticos (BACTEC MGIT PANTA) para reduzir ainda mais a contaminação.

As amostras já tratadas são inoculadas no tubo MGIT, que são inseridos no aparelho BACTEC MGIT, onde ficam incubados a 37°C, no máximo até 42 dias.

Na presença de microrganismos o oxigénio é consumido, deixando de inibir o composto presente no fundo do tubo, que passa a emitir fluorescência, lida pelo BACTEC MGIT (monitoriza o crescimento a cada 60 minutos). Nesta situação, o instrumento emite um aviso de positividade no(s) tubo(s) correspondente(s) (ou seja, há organismos viáveis – cerca de 10^5 a 10^6 UFC/mL).

A partir dos tubos MGIT positivos é feito novo exame microscópico e é inoculada uma placa de meio GS (por inundação) para confirmar a presença de micobactérias e excluir a hipótese de contaminação – deverão observar-se micobactérias no exame microscópico e não deverá haver crescimento no meio GS.

O aparelho dá uma amostra como negativa quando não deteta crescimento ao fim de 42 dias.

Meio sólido

Para além do meio líquido, as amostras são também inoculadas no meio sólido inclinado Löwenstein-Jensen e incubadas a 37°C.

Como o crescimento neste meio é mais lento do que no MGIT, o seu interesse está relacionado com a observação da morfologia das colónias, que pode dar uma orientação para a identificação da bactéria em causa (por exemplo: colónias de *M. tuberculosis* têm aspeto “couve-flor”).

A leitura é realizada semanalmente, durante seis semanas.

4. Identificação

Como já foi referido, a observação microscópica e da morfologia das colónias, bem como o histórico do doente e a informação clínica, podem direcionar o procedimento de identificação para um dos vários testes possíveis:

- **BD MGIT TBc Identification Test**: Teste rápido imunocromatográfico para a deteção qualitativa do antigénio do Complexo *M. tuberculosis*. Deteta *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Realizado a partir do meio líquido.
- **FluoroType MTB**: Ensaio qualitativo de amplificação seguida de análise da curva de melting para deteção do complexo *M. tuberculosis*. É o único método executado diretamente da amostra, sendo por isso útil em caso de necessidade urgente de um diagnóstico inicial.
- **AccuProbe**: Teste de identificação das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* isoladas de uma cultura por hibridização. Como são usadas sondas monoespecíficas, é utilizado quando se suspeita de uma espécie em concreto (Complexo *M. tuberculosis*, Complexo *M. avium* e *M. gordonae*). A deteção é feita por um luminómetro.
- **GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteraia)**: Teste de identificação a partir de material cultural de várias espécies clinicamente relevantes, baseado na deteção em tira. Consiste numa amplificação multiplex seguida de hibridização reversa em tira. Deteta as micobactérias atípicas mais comuns: Complexo *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, Complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi*.
- **GenoType Mycobacterium AS (Additional Species)**: Apenas difere do Mycobacterium CM quanto às espécies que identifica, que são as menos comuns.
- **Inno-LiPA Mycobacteria**: Teste de identificação de várias espécies de *Mycobacterium* a partir de meio sólido. Também por amplificação multiplex associada a hibridização em tira. Apesar de identificar um grande conjunto de espécies e de ser muito eficiente, o

seu uso nem sempre se justifica devido ao seu custo elevado, sendo apenas usada como último recurso.

- GenoType MTBDRplus: Identifica MTB e analisa geneticamente resistência a rifampicina e/ou isoniazida. Normalmente utilizado para multirresistentes. Não dispensa a análise fenotípica das resistências.

5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O antibiograma é realizado para amostras com primeiro diagnóstico ou que tenham este pedido (por exemplo, em casos de ineficácia da terapia administrada).

O teste de suscetibilidade é feito a partir do MGIT, entre o segundo e o quinto dia de positividade. Porém, a partir do terceiro dia o isolado tem que ser diluído, para evitar falsos resistentes, uma vez que o tubo fica muito rico em micobactérias.

Este teste é executado com o BD BACTEC MGIT 960 SIRE Kits e BD Kit BACTEC MGIT 960 PZA – que testam a sensibilidade do complexo *M. tuberculosis* aos antimicrobianos de primeira linha: Estreptomicina (S), Isoniazida (I), Rifampicina (R), Etambutol (E) e Pirazinamida (PZA). São testados em tubos MGIT normais (para a Pirazinamida utiliza-se um tubo MGIT com pH mais baixo), onde é inicialmente adicionado um suplemento de crescimento.

Os tubos do teste de suscetibilidades são também incubados no instrumento BACTEC MGIT que monitoriza o seu crescimento e compara com um controlo de crescimento (tubo contendo apenas a amostra diluída e o suplemento de crescimento).

Quando o aparelho deteta um crescimento igual ou superior a 400 UFC nos controlos de crescimento, compara com o crescimento dos tubos do teste de suscetibilidades e automaticamente reporta os resultados como sensível ou resistente para cada fármaco.

Na eventualidade de haver um crescimento igual ou superior a 400 UFC em menos de quatro dias ou de não haver crescimento até 14 dias, o teste é dado como inválido e será repetido.

Em paralelo com o antibiograma, é inoculada uma placa de meio GS por inundação com a diluição da amostra para assegurar a pureza da mesma.

As resistências detetadas no teste de suscetibilidades inicial são sempre confirmadas para os fármacos em questão com um novo teste.

IV. HEMATOLOGIA

O sangue consiste num fluido biológico circulante com funções de transporte: fornece oxigénio e nutrientes aos diversos tecidos e leva os produtos do metabolismo para os pulmões, fígado e rins para serem eliminados do organismo.¹⁵

É composto por glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos), plaquetas e plasma (constituído por água, proteínas e sais).

A medula óssea é o local hematopoiético mais importante nos adultos, nomeadamente no esqueleto central e nas extremidades proximais dos fémures.¹⁶

Uma célula estaminal pluripotente capaz de originar as diferentes linhagens celulares inicia a hematopoiese, em resposta a fatores de crescimento hematopoiéticos. Até se formarem as células circulantes no sangue periférico, as células passam por diversos estados de diferenciação.

Para além desta capacidade de diferenciação, a célula estaminal hematopoiética também tem capacidade de autorrenovação, o que permite a sua reposição.¹⁶

A colheita de sangue por punção venosa corretamente realizada é bastante importante para a fiabilidade dos resultados analíticos neste produto.

Para impedir a coagulação do sangue após a sua colheita, este é adicionado a um anticoagulante, que promove a separação do produto nos seus componentes: numa camada ficam os eritrócitos, noutra o plasma e a dividi-las, os leucócitos e plaquetas (*buffy coat*).

O setor da Hematologia inclui o estudo do hemograma (incluindo morfologia) e da hemóstase.

Todas as amostras que dão entrada para este setor são introduzidas no aparelho Automate 1250 (Beckman Coulter), que as distribui por sub-setor e conforme os seus pedidos e a urgência (urgência ou rotina).

Os tubos para hemograma e coagulação têm tampas de cor diferente, refletindo a diferença de anticoagulantes: os tubos para hemograma têm EDTA; para coagulação, citrato de sódio.

A. Hemograma

O hemograma é dos exames mais comuns e importantes realizados na prática clínica. Consiste numa avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos celulares do sangue e também no cálculo de índices eritrocitários.¹⁹

Por refletir inúmeras patologias de diversas origens, é fundamental não só como exame de rotina, como também para diagnóstico e acompanhamento de múltiplas situações clínicas.¹⁹

As contagens celulares são realizadas em aparelhos automáticos:

1. Contadores hematológicos automáticos

A impedância elétrica é considerado o método de referência para contagens de células. Tem por base o Princípio de Coulter: os eritrócitos são maus condutores de eletricidade, enquanto certos diluentes são bons condutores. Um volume conhecido de sangue, diluído numa solução de eletrólitos (bom condutor), passa por um orifício situado entre dois eletrodos. Como as células não são boas condutoras de corrente elétrica, ao passarem no orifício provocam uma alteração no potencial mantido entre os dois eletrodos, que é correspondente ao tempo que a célula demora a passar na fenda. Assim, o número de impulsos produzidos corresponde à contagem das células e a altura do impulso indica o volume da célula que passou, permitindo a determinação da contagem de eritrócitos, Hematócrito e Volume Corpuscular Médio.¹⁷

✓ UniCel DxH 800 (Beckman Coulter)

Existem três contadores DxH 800 responsáveis pela realização dos hemogramas. Dois deles realizam contagem de reticulócitos.

A contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas é feita pelo método da impedância elétrica. Os eritrócitos e plaquetas são contados num canal. Noutro canal, onde para além do diluente é adicionado um agente lítico para os eritrócitos, é feita a contagem dos leucócitos e o doseamento da hemoglobina. Este último parâmetro é determinado por fotometria.

Quanto à contagem de reticulócitos, eritroblastos e o diferencial leucocitário, são realizadas por VCS (volume, condutividade, *scattering*).

Esta tecnologia separa as células com base nas suas características físicas, através de medições em cada célula: por impedância (dependente do volume celular), condutividade (dependente da estrutura interna da célula – razão núcleo-citoplasma, densidade nuclear, granularidade) e *forward light scattering* (dependente da estrutura, forma e refletividade).¹⁸

Os contadores fornecem também histogramas de eritrócitos, leucócitos e plaquetas que relacionam o tamanho das células com a sua frequência (Figura 3).

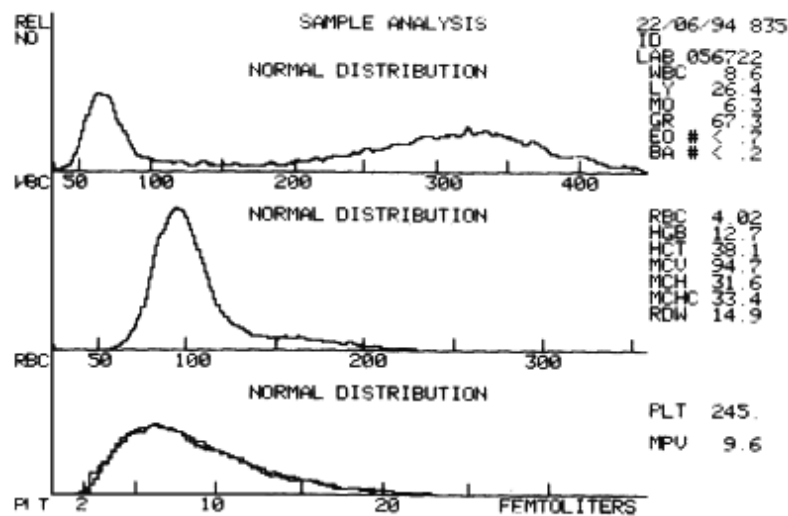


Figura 3. Histogramas representativos da distribuição dos volumes dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

Fonte: BAIN, Barbara – Blood Cells: A Practical Guide, 2006. p. 47.

✓ ABX Pentra DX-DF 120 (Horiba)

O Pentra DX-DF 120 consiste num contador automático que executa também os esfregaços de sangue em lâmina.

O hemograma é realizado por neste aparelho quando há necessidade de confirmação de algum parâmetro do hemograma feito nos aparelhos DxH 800.

O Pentra DX-DF 120 executa a contagem dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas também através do método da impedância elétrica. Para além disso inclui também contagem de reticulócitos. O leucograma é feito através de quatro canais independentes: WBC (para

contagem dos leucócitos), dupla matriz DIFF (para o diferencial leucocitário), BASO (para a contagem dos basófilos) e ERB (para a contagem dos eritroblastos).

Num canal são determinados os linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos através de medições de absorvância da luz e impedância após coloração diferencial dos grânulos. Num segundo canal, os basófilos são diferenciados das restantes células por impedância.¹⁸

Os parâmetros avaliados no hemograma são os seguintes (valores de referência em Anexo I):

2. Eritrograma

a) Contagem de eritrócitos (RBC)

Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue.

Uma contagem superior ao valor superior de referência designa-se por eritrocitose. A situação inversa, eritrocitopenia, acontece devido a uma produção reduzida ou a uma destruição excessiva (hemólise) e está, em muitas das vezes, associada a anemia, apesar de não poder ser interpretada isoladamente para a diagnosticar.

Os valores de referência diferem entre o sexo feminino e masculino. Esta variação deve-se a fatores hormonais: os andrógenos aumentam a sensibilidade do tecido eritroblástico à eritropoietina.¹⁹

b) Hemoglobina (Hb)

É o principal constituinte dos eritrócitos, que acaba por conferir o tom avermelhado a estas células e consequentemente ao próprio sangue. Por ter afinidade para o oxigénio, é responsável pela sua ligação nos pulmões e distribuição pelo organismo.

O doseamento da hemoglobina é um dado bastante importante no hemograma, pois pode fazer o diagnóstico de uma anemia quando abaixo do limite de referência.¹⁹

c) Hematócrito (Hct)

Indica o volume da massa eritroide no volume total da amostra sanguínea ($Hct = RBC \times VCM$).

Assim como na contagem de eritrócitos, pode estar diminuído nas anemias. Excetuando as anemias causadas por diminuição na produção de hemoglobina, o hematócrito varia proporcionalmente com este parâmetro. ¹⁹

d) Índices eritrocitários

Partindo dos valores de RBC, Hb e Hct, o aparelho calcula os índices eritrocitários que caracterizam os glóbulos vermelhos quanto ao seu volume e conteúdo em hemoglobina. ¹⁸

Têm utilidade principalmente para a classificação de anemias. ¹⁷

- Volume Corpuscular Médio (VCM)

Este parâmetro pode ser calculado: $VCM = Hct \div RBC$. No entanto, é possível ser determinado automaticamente pelo aparelho através da tecnologia da impedância elétrica. ¹⁹

Um valor de VCM superior ao valor superior de referência significa que, em média, o tamanho dos eritrócitos é maior que o normal – macrocitose. Pode-se verificar, por exemplo, no alcoolismo, hepatopatias, anemias megaloblásticas, anemia aplástica. A situação inversa designa-se por microcitose e geralmente acontece quando há uma deficiente síntese de hemoglobina (estando por isso associado a hipocromia). Pode estar patente na anemia sideropénica, talassemia, anemia sideroblástica, anemia da doença crónica, entre outras patologias ¹⁹

É utilizado para gerar o histograma que relaciona o volume das células com a sua frequência.

- Coeficiente de variação dos eritrócitos (RDW)

Representa a variação dos volumes dos eritrócitos.

Valores elevados de RDW significam uma grande heterogeneidade nos volumes da população de eritrócitos – anisocitose. Uma anisocitose é também visível no histograma, quando este apresenta a base da curva alargada, mostrando uma grande variação de volumes em torno da média.

Pode ser indicativo de uma situação patológica, como por exemplo a anemia da doença crónica ou talassemia minor, em que o RDW é baixo; ou a anemia sideropénica, em que está aumentado. ¹⁹

- Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

É a quantidade média de hemoglobina por eritrócito: $HCM = Hb \div RBC$. ¹⁹

Um HCM superior ao limite designa-se por hipercromia e significa que a quantidade média de hemoglobina nos eritrócitos está acima do normal. A situação inversa é chamada de hipocromia e é comum nas anemias.

- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Corresponde à concentração média de hemoglobina nos eritrócitos. É também um parâmetro calculado: $CHCM = HCM \div Hct$.

Biologicamente, tem pouca variação, tornando a sua interpretação um pouco limitada.

¹⁹

e) Reticulócitos (RET)

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos logo, recentemente libertados para a circulação.

¹⁸

A sua contagem (por VCS) reflete o estado da eritropoiese. Normalmente, a sua quantidade no sangue periférico é baixa; mas em casos de estimulação da eritropoiese (por exemplo, em caso de anemia hemolítica ou hipoxia), pode haver libertação prematura de reticulócitos, levando a uma reticulocitose. ¹⁹

Um esfregaço sanguíneo com policromasia (referido mais à frente) é indicativo da presença de reticulócitos em número significativo no sangue periférico.

3. Leucograma

a) Contagem de leucócitos (WBC)

A quantificação dos glóbulos brancos no volume total da amostra pode revelar uma leucocitose, que denomina a situação em que a contagem dos leucócitos está elevada; ou leucopenia, que designa a situação inversa. Estas alterações podem dever-se à alteração de uma ou mais populações de leucócitos que, por sua vez, podem ter inúmeras causas, algumas das quais descritas na Tabela II.

Tabela II. Algumas causas de alterações nas contagens dos leucócitos. ¹⁶

		Algumas causas
Neutrófilos	Neutrofilia	Infeções bacterianas; inflamação e necrose tecidual; doenças metabólicas; neoplasias; fármacos; LMC; neoplasias mieloproliferativas.
	Neutropenia	Fármacos; autoimune; LES; hipersensibilidade e anafilaxia; leucemia de linfócitos grandes e granulares; infeções virais; infeções bacterianas fulminantes.
Linfócito	Linfocitose	Infeções; LLC; LLA; alguns linfomas.
	Linfopenia	Insuficiência grave da medula óssea; fármacos; linfoma de Hodgkin.
Monócito	Monocitose	Infeções bacterianas crónicas; doenças do tecido conjuntivo; infeções por protozoários; doença de Hodgkin, LMA; leucemia mielomonocítica crónica.
Eosinófil	Eosinofilia	Doença alérgica; infeção parasitária; recuperação de infeção aguda; linfoma de Hodgkin; síndrome hipereosinofílica; neoplasias mieloproliferativas; pós-quimioterapia.
Basófilos	Basofilia	LMC; Policitemia vera; Varíola; Varicela; Colite ulcerativa.

LMC: Leucemia Mielóide Crónica; LES: Lúpus eritematoso sistémico; LLC: Leucemia Linfocítica Crónica; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LMA: Leucemia Mielóide Crónica.

b) Diferencial leucocitário

Diferencia com base nas características físicas e quantifica as diferentes populações de leucócitos (Figura 4).¹⁸

Normalmente, a quantificação relativa da fórmula apresenta-se com predomínio de neutrófilos, seguidos de linfócitos, monócitos, eosinófilos e por fim, os basófilos.¹⁹

Se presentes, células anormais como *Large immature cells* (blastos e granulócitos imaturos) e *Atypical lymphocytes* (linfócitos atípicos; inclui blastos pequenos) também são incluídos na contagem e apresentadas como *flag*.¹⁷

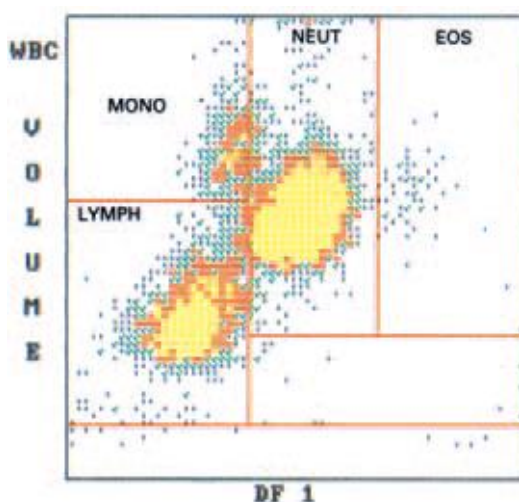


Figura 4. Diferencial leucocitário produzido pela tecnologia VCS.

Fonte: BAIN, Barbara – Blood Cells: A Practical Guide, 2006. p. 48.

4. Plaquetograma

a) Contagem de plaquetas (PLT)

A contagem das plaquetas é feita por impedância no mesmo canal da contagem dos eritrócitos, sendo estas células diferenciadas pelo volume.

Por vezes, o equipamento pode emitir uma *flag* de agregados de plaquetas ou de plaquetas gigantes. Estas situações podem originar uma contagem falsamente baixa. Outras causas de erro nas contagens das plaquetas é o satelitismo plaquetário (adesão das plaquetas

aos neutrófilos) e presença de coágulos que, de igual forma, se traduzem numa pseudotrombocitopenia; a existência de fragmentos de eritrócitos ou leucócitos ou de microcitose acentuada aumenta falsamente o valor da contagem plaquetar.^{19, 17}

A contagem de plaquetas abaixo do valor de referência – trombocitopenia -, pode ser observada na gravidez, púrpura trombocitopénica imune, trombocitopatias genéticas, viroses febris, esplenomegalia, doenças infecciosas (principalmente septicemias), tratamento com heparina não fracionada. Trombocitose refere-se a um valor aumentado e algumas das suas possíveis causas são neoplasias mieloproliferativas, anemia sideropénica, doenças inflamatórias crónicas, o período da hemóstase primária.¹⁹

b) Volume Plaquetário Médio (VPM)

Representa o volume médio das plaquetas amostradas.

Tem utilidade no diagnóstico quando interpretada juntamente com a contagem de plaquetas e para a deteção de plaquetas gigantes.¹⁵

c) Coeficiente de variação plaquetar (PDW)

É indicativo da variação dos volumes das plaquetas. Um valor elevado significa uma anisocitose plaquetar.¹⁵

d) Plaquetócrito (PCT)

Tal como na série eritroide, é medido pela soma dos impulsos correspondentes às plaquetas, representando a percentagem do volume total de plaquetas em relação ao volume total de sangue.

B. *Estudo da morfologia*

O exame microscópico de um esfregaço sanguíneo é realizado quando uma amostra vem com este pedido ou quando o responsável pela validação entende que deve ser feito, para

confirmação de resultados do hemograma (por exemplo, quando o hemograma mostra presença de células anormais ou agregados de plaquetas).

Pode também ser necessário realizar a fórmula leucocitária manual, em casos de contagens bastantes alteradas e sem histórico.

Os esfregaços sanguíneos são feitos pelo equipamento Pentra Dx I20.

A coloração utilizada é a May-Grünwald-Giemsa. Combina a ação de um corante ácido com a de um corante básico, permitindo assim uma coloração diferencial das estruturas celulares. O corante básico cora os ácidos nucleicos, proteínas nucleares e grânulos dos basófilos e neutrófilos de um tom azulado; o corante ácido confere um tom alaranjado à hemoglobina, aos grânulos dos eosinófilos e a proteínas nucleares catiónicas.^{18, 17}

Um esfregaço sanguíneo tem uma zona inicial de eritrócitos sobrepostos, que se vão espaçando até à cauda. A zona ideal para observação de um esfregaço é onde há grande quantidade de células mas sem se sobreporem.

Os diferentes tipos de leucócitos não estão uniformemente distribuídos no esfregaço (Figura 5). Este problema deve-se tentar minimizar com uma leitura correta da lâmina.

A observação microscópica deve ser iniciada com uma objetiva de pequena ampliação para escolha do campo a observar com maior pormenor, com a objetiva de imersão de 50x.

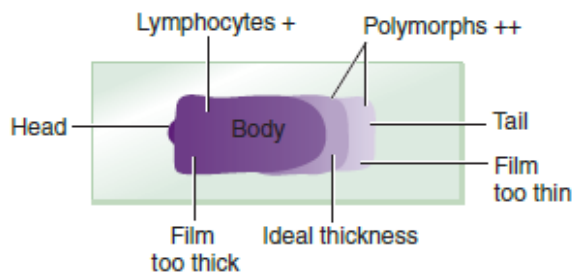


Figura 5. Esquema da distribuição dos leucócitos num esfregaço sanguíneo.

Fonte: BAIN, Barbara [et al.] – Dacie and Lewis Practical Haematology, 2011. p. 39.

1. Eritrócitos

Os glóbulos vermelhos são células circulares e anucleadas (perdem o seu núcleo ao passarem para o sangue periférico). Coram intensamente com o corante ácido, principalmente na periferia, devido à sua forma bicôncava, sendo por isso ligeiramente pálidos no centro.^{15,}

^{18, 17}

Diz-se que os eritrócitos são normocíticos e normocrômicos quando têm tamanho e cor (que reflete o conteúdo em hemoglobina) normais.

No entanto, estas células podem sofrer diversas alterações morfológicas (Tabela III), que são descritas sempre que observadas. Estas alterações podem ser causadas por um aumento compensador da eritropoiese, mostrando células imaturas no esfregaço do sangue periférico (policromasia); por uma produção inadequada de hemoglobina (hipocromia, anisocromasia, dimorfismo); por uma eritropoiese anormal (anisocitose, poiquilocitose, ponteados basófilos); ou por dano direto ao eritrócito (esferócitos, eliptócitos, ovalócitos, esquisócitos, corpos de Pappenheimer, corpos de Howell-Jolly).¹⁷

Tabela III. Alterações morfológicas na série eritroide e condições onde podem ser encontradas.¹⁸

17

	Alteração	Presente em
Tamanho	Macrocitose (Fig 6. a)	Anemia megaloblástica (def. em Vitamina B12 ou ácido fólico); anemia hemolítica; SMD; alcoolismo; doença hepática
	Microcitose (Fig 6. b)	Anemia por def. de ferro; talassemias; anemia sideroblástica; anemia da doença crónica
	Anisocitose	Não específico
Cor	Hipercromia (Fig 6. c)	Eritrócitos de formas anormais; macrócitos
	Hipocromia (Fig 6. d)	Mesmas condições da microcitose.
	Anisocromasia	Situação em mudança (Evolução ou regressão de anemia por def. de ferro ou de anemia da doença crónica)
	Policromasia (Fig 6. e)	Stress hematopoiético; estímulos hipóxicos; mielofibrose; carcinomatose.
	Dimorfismo	Resposta de anemia por def. de ferro após administração de ferro ou transfusão; anemia sideroblástica; anemia macrocítica após transfusão; anemia hipocrômica após transfusão

Forma	Esferocitose (Fig 6. f)	Esferocitose hereditária; anemia hemolítica autoimune; reação transfusional; doença hemolítica do RN; sepsis por <i>C. clostridium</i>	
	Eliptócitos e ovalócitos (Fig 6. g)	Eliptocitose hereditária; def. de ferro; talassemia; anemia megaloblástica; mielofibrose; SMD	
	Dacrócitos (Fig 6. h)	Anemia megaloblástica; talassemia major; mielofibrose	
	Equinócitos (Fig 6. i)	Artefacto de armazenamento; doença hepática; síndrome hemolítico urémico; pós transfusão	
	Acantócitos (Fig 6. j)	Hipobetalipoproteinemia; doenças neurológicas hepáticas; hiposplenismo; artefacto de armazenamento	
	Queratócitos (Fig 6. l)	Anemia hemolítica microangiopática; coagulação disseminada intravascular; doença renal; após remoção de corpo de Heinz pelo baço	
	Esquisócitos (Fig 6. m)	Anemia hemolítica microangiopática; anemia hemolítica mecânica; SMD; eritroleucemia; talassemias	
	Células em alvo (Fig 6. n)	Icterícia obstrutiva; hipobetalipoproteinemia familiar; anemia falciforme; doença hepática crônica; esplenectomia; anemia por def. de ferro.	
	Estomatocitose (Fig 6. o)	Alcoolismo; doença hepática; anemia hemolítica autoimune	
	Células em foice (Fig 6. p)	Anemia falciforme; anoxia	
	Poiquilocitose	Não específico	
	Inclusões	Corpúsculos de Howell-Jolly (Fig 6. q)	Pós esplenectomia; hipoesplenismo
		Ponteados basófilos (Fig 6. r)	Talassemias; anemia megaloblástica; hemoglobinas instáveis; anemia hemolítica; doença hepática; envenenamento por chumbo e outros metais pesados
		Corpos de Pappenheimer (Siderócitos)	Pós esplenectomia; hipoesplenismo; anemia sideroblástica
Rouleaux (Fig 6. s)		Gravidez; condições inflamatórias; discrasias de plasmócitos	

SMD: Síndrome Mielodisplásico; RN: Recém-nascido.

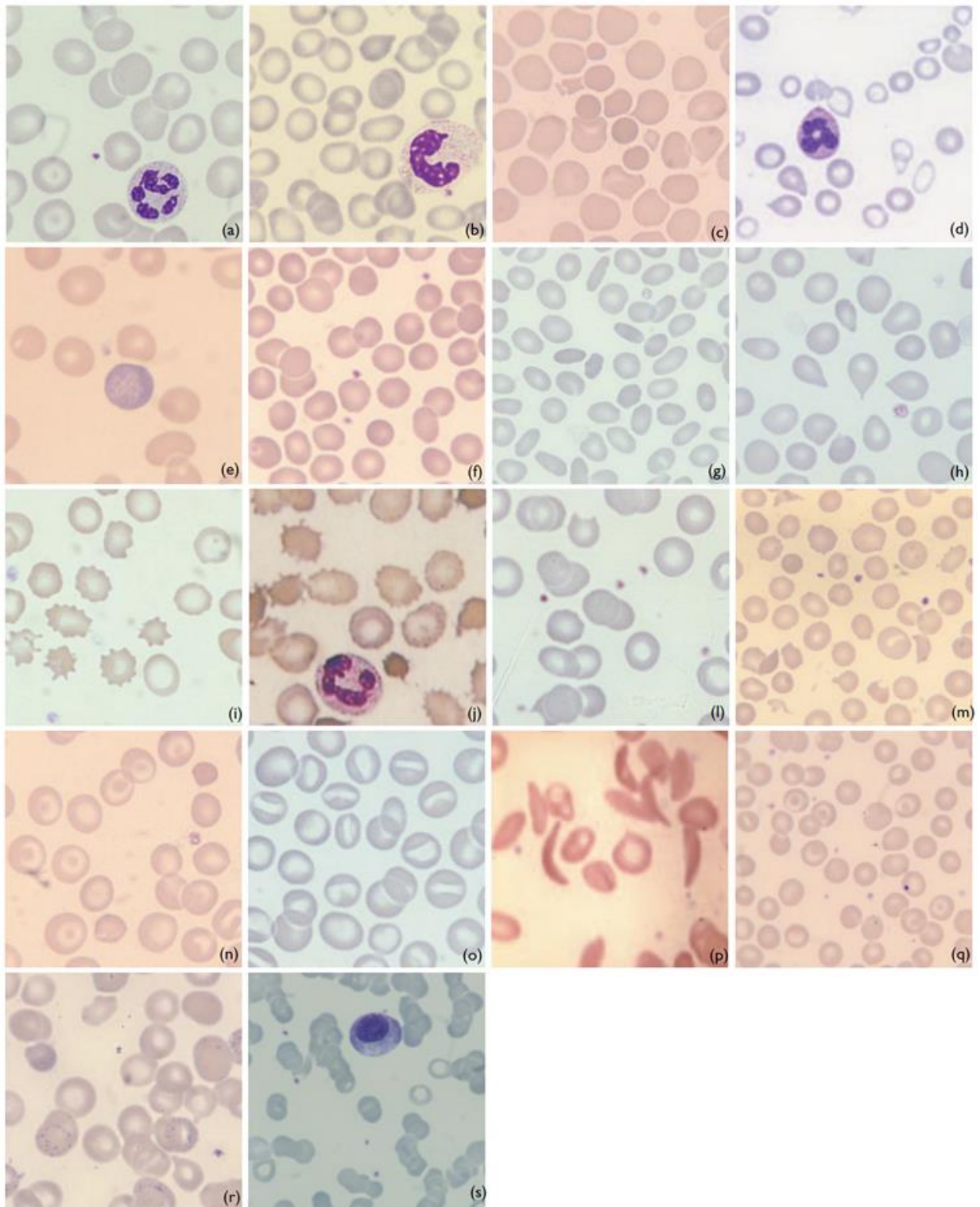


Figura 6. Alterações na série eritroide. (a): macrócitos; (b): micrócitos; (c): hiperchromia; (d): hipocromia; (e): macrócito policromático; (f): esferócitos; (g): eliptócitos e ovalócitos; (h): dacrócitos; (i): equinócitos; (j): acantócitos; (l): queratócitos; (m): esquisócitos; (n): células em alvo; (o): estomatócitos; (p): células em foice; (q): corpúsculos de Howell-Jolly; (r): ponteados basófilos; (s): *rouleaux*.

Fonte: BAIN, Barbara - *A Beginner's Guide to Blood Cells*, 2004. p. 38-79; BAIN, Barbara - *Blood Cells: A Practical Guide*, 2006. p. 79, 97.

No estudo morfológico podem também ser encontradas células imaturas da série eritroide, como eritroblastos (*nucleated red blood cells - NRBC*), principalmente devido a um aumento da eritropoiese. Podem ser encontrados em condições como a anemia severa e a doença hemolítica do recém-nascido.¹⁷

Podem, no entanto, estar presentes em pequeno número no sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Estas células têm citoplasma com tom rosado ou arroxeadado, devido à hemoglobina.¹⁵

2. Leucócitos

Ao contrário dos eritrócitos, os leucócitos ou glóbulos brancos são células nucleadas, o que dá nome aos grupos nos quais as cinco populações são divididas: os neutrófilos, eosinófilos e basófilos são chamados de células polimorfonucleares ou granulócitos; os linfócitos e monócitos são células mononucleares.¹⁵

a) Neutrófilos

Tal como o nome polimorfonuclear indica, o núcleo dos neutrófilos pode ter uma morfologia bastante diversa, podendo ter entre dois a cinco lobos. Este cora de roxo (corante básico), enquanto o citoplasma é acidofílico. Os seus grânulos coram com ambos os corantes (sendo por isso neutrofilicos) (Figura 7. a).

Esta população de leucócitos tem a principal função de fagocitose em tecidos infetados.¹⁵

A hipo e hipersegmentação são alterações que podem ser encontradas na morfologia dos neutrófilos. A primeira pode ser notada na anomalia Pelger-Huët e na deficiência de lactoferrina. Quanto à hipersegmentação, pode estar presente na eritropoiese megaloblástica e na deficiência de ferro.¹⁸

b) Eosinófilos

Possuem um núcleo geralmente bilobado e grânulos facilmente visíveis que coram de alaranjado (são eosinofílicos). O seu citoplasma é fracamente basofílico (Figura 7. b).^{15, 18}

Atuam diretamente contra microrganismos, incluindo parasitas, por liberação do conteúdo dos seus grânulos ou por fagocitose. Estão também implicados nas reações alérgicas.

¹⁵

Também podem apresentar o núcleo hipo ou hipersegmentado. A primeira situação pode ocorrer na anomalia Pelger-Huët, na deficiência de lactoferrina (e também como alteração adquirida em perturbações mieloproliferativas). O núcleo hipersegmentado pode aparecer, por exemplo, na anemia megaloblástica. ¹⁸

c) Basófilos

Também possuem grânulos bastante proeminentes que coram intensamente ganhando um tom roxo escuro (basofílicos), “camuflando” o núcleo e o citoplasma. (Figura 7. c)

Têm atividade em reações de hipersensibilidade imediata e respostas inflamatórias.

Os seus grânulos podem aparecer diminuídos em perturbações mieloproliferativas e em síndromes mielodisplásicas. ^{18, 15}

Em determinadas ocasiões, as células precursoras dos granulócitos (mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, em banda) normalmente presentes apenas na medula óssea, passam para o sangue periférico. Quando isto acontece, há desvio à esquerda. Exceto em grávidas e recém-nascidos, esta situação está, na maioria das vezes, associada a neoplasias hematológicas. ¹⁸

d) Monócitos

São as células sanguíneas de maior tamanho (Figura 7. d).

São fagócitos e constituem uma defesa contra infecções bacterianas e fúngicas, para além de modularem a atividade de outras células. Nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos. ¹⁵

Algumas alterações que podem estar patentes nos monócitos são uma razão núcleo-citoplasma aumentado, nucléolo, número aumentado de vacúolos. Isto pode acontecer em condições de estimulação da medula óssea. ¹⁸

Células precursoras dos monócitos, como os monoblastos e promonócitos apenas são encontrados no sangue periférico na leucemia aguda com diferenciação monocítica. ¹⁸

e) Linfócitos

São células mais pequenas que os granulócitos, com citoplasma azul pálido (fracamente basofílico) (Figura 7. e).^{18, 15}

Dividem-se em três tipos com funções de resposta imunológica diferentes:

Linfócitos B – diferenciam-se em células memória e em plasmócitos. Estes participam na imunidade humoral produzindo anticorpos.

Linfócitos T – para além de modularem a atividade dos linfócitos B, são agentes da imunidade celular.

Células NK (*Natural Killer*) – também contribuem para a imunidade celular, atuando diretamente contra o corpo estranho.

Morfologicamente, é difícil fazer a distinção entre estes três tipos celulares.¹⁵

A resposta dos linfócitos a estímulos imunológicos traduz-se por um aumento na sua quantidade e por alterações morfológicas (linfócitos reativos). É frequente haver alterações morfológicas não concretas – linfócitos atípicos, que são bastante pleomórficos. A situação mais comum onde aparecem em grande número é na mononucleose infecciosa podendo, no entanto, aparecer noutras infeções virais e bacterianas.¹⁸

Precusores dos linfócitos (linfoblastos) são tipicamente encontrados no sangue periférico na Leucemia linfoblástica aguda.¹⁸

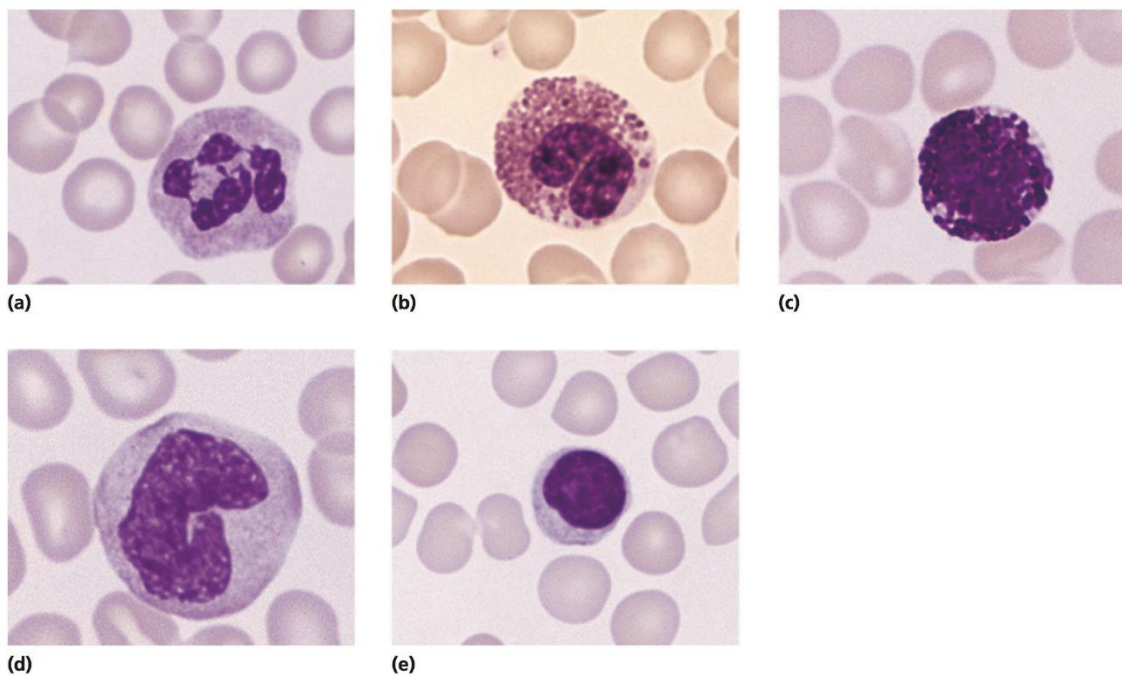


Figura 7. Leucócitos. (a): Neutrófilo; (b): Eosinófilo; (c): Basófilo; (d): Monócito; (e): Linfócito.

Fonte: HOFFBRAND, A; MOSS, P. – Fundamentos em Hematologia, 2013. p. 109.

3. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, presentes na medula óssea. A sua principal função é a participação na resposta hemostática.¹⁶

Na observação de um esfregaço sanguíneo, as plaquetas aparecem com contornos irregulares e com tamanho inferior ao dos glóbulos vermelhos e brancos.^{15, 17}

O mais importante a observar no esfregaço em relação às plaquetas, é a existência de agregados de plaquetas e/ou plaquetas gigantes (que são causas comuns de alterações da contagem).

C. *Velocidade de Sedimentação*

Este teste mede a velocidade de sedimentação (VS) dos eritrócitos durante um determinado período de tempo, que varia com a concentração de moléculas proteicas grandes, como as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas. Estas alteram as suas concentrações em infeções agudas, em fases ativas de inflamação crónica, na malignidade, em danos agudos a tecidos e em lesões físicas. Assim, a VS estará aumentada nestas situações e, apesar de não ser específico, este teste é útil como complemento ao diagnóstico de inúmeras doenças inflamatórias sistémicas e neoplásicas e, principalmente, para monitorizar a progressão da doença e a resposta ao tratamento.

A VS é também influenciada pela formação de *rouleaux* pelos eritrócitos (aumenta) e pela razão eritrócitos-plasma (por exemplo, na anemia severa em que há baixa concentração de eritrócitos, a VS estará aumentada; pela razão oposta, há uma diminuição da VS na policitemia vera).^{16, 17}

Esta análise é feita no aparelho Test I (Alifax) por cinética fotométrica, isto é, o aparelho mede a cinética do fenómeno da sedimentação sanguínea. Analisa a capacidade de agregação e sedimentação dos eritrócitos através da densidade ótica. O aparelho converte, através de um algoritmo matemático, os resultados da densidade ótica para a taxa de sedimentação eritrocitária.

Os valores de normalidade da VS situam-se entre 1 – 20 mm/h.

D. Estudo da coagulação

A hemóstase é o conjunto de processos fisiológicos que permitem a manutenção da integridade da vasculatura.²⁰ Esses mecanismos têm como objetivo manter o sangue num estado fluido, estancar lesões vasculares e limitar e finalizar esse mesmo processo. Os principais componentes envolvidos são os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação, os inibidores dos fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico. O sistema hemostático tem que manter o equilíbrio entre os fatores pró- e anticoagulantes; caso contrário ocorrerão eventos hemorrágicos ou trombóticos.^{17, 16}

Após dano vascular, os processos que se sucedem podem ser divididos na hemóstase primária (vasoconstrição, adesão e agregação plaquetar), em que há formação quase imediata de um trombo plaquetar; hemóstase secundária ou coagulação, que leva à formação de um coágulo de fibrina insolúvel através da ativação do sistema pró-coagulante; e por fim a fibrinólise, que promove a dissolução do coágulo formado.

A exposição do colágeno desencadeia uma série de mecanismos que culminam na formação de um tampão hemostático.

As ações mais imediatas após a lesão vascular são a adesão plaquetar ao local danificado (favorecida pelo Fator de Von Willebrand – FVW) e em seguida a vasoconstrição e a agregação plaquetária, facilitadas pelo Tromboxano A₂. Esta ligação plaqueta-plaqueta constitui o tampão hemostático primário (instável) (Figura 8).

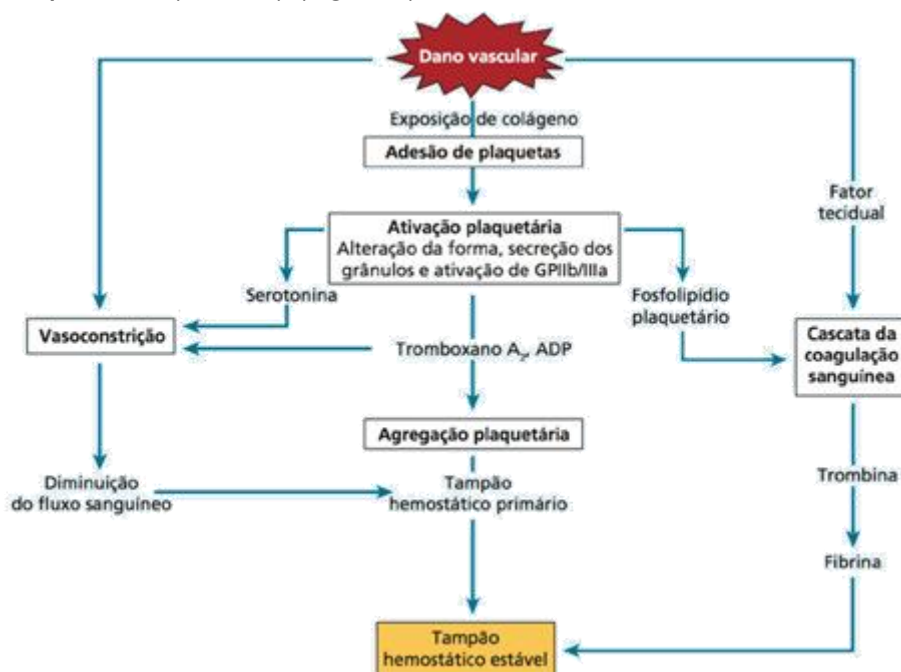


Figura 8. Resposta hemostática a uma lesão vascular.

Fonte: HOFFBRAND, A.; MOSS, P. – Fundamentos em Hematologia, 2013. p. 315

A hemóstase secundária ou coagulação é igualmente desencadeada pela exposição do colagénio, através da produção de Fator tecidual (FT), que a inicia pela via extrínseca. A via intrínseca é ativada através do contato de proteínas plasmáticas circulantes com o local da lesão. Passando por uma série de ativações sequenciais de Fatores pró-coagulantes, as duas vias convergem numa via comum com a ativação do Fator X. Este fator ativado (Xa), na presença do Fator Va, fosfolípidos plaquetares e cálcio, converte protrombina (Fator II) em trombina (Fator IIa) que, por sua vez, converte fibrinogénio (Fator I) em fibrina (Fator Ia). Esta forma polímeros, originando um trombo hemostático insolúvel e estável (que ainda é mais estabilizado pelo Fator XIII) (Figura 9).

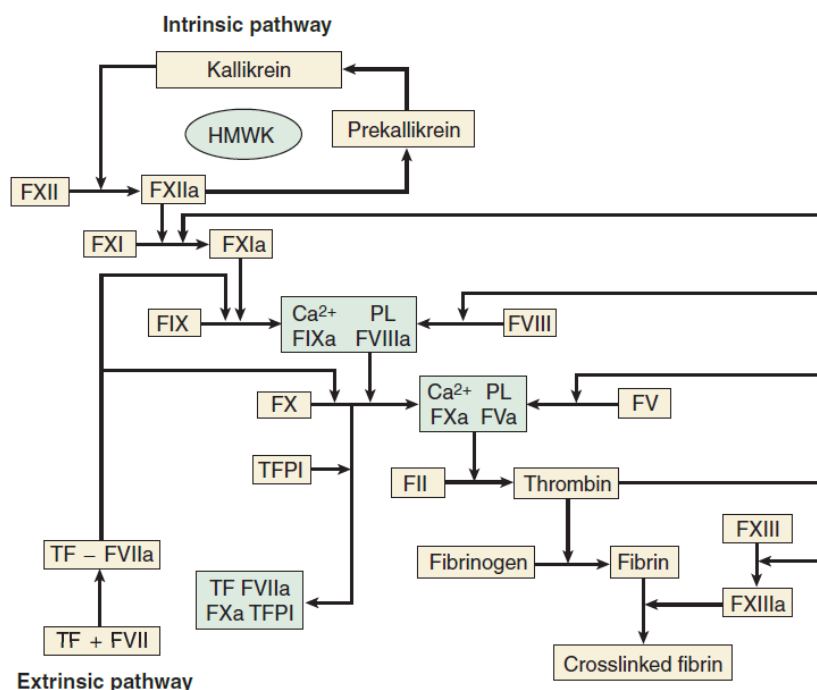


Figura 9. Modelo clássico da Cascata de coagulação.
 Fonte: BAIN, Barbara [et al.] – Dacie and Lewis Practical Haematology, 2011. p. 400

Apesar do modelo da cascata da coagulação dividido nas vias intrínseca e extrínseca não ser o atual modelo explicativo da coagulação *in vivo*, é amplamente utilizado para a interpretação dos resultados analíticos do estudo da hemóstase.²¹

Para que os acontecimentos pró-coagulantes não se perpetuem e causem a oclusão do vaso sanguíneo, têm que haver mecanismos antitrombóticos fisiológicos que os inibam. Existem vários inibidores dos fatores de coagulação que têm essa mesma função. O primeiro a atuar é o Inibidor do Fator tecidual (TFPI), que inibe o Fator tecidual, o Fator VIIa e o Fator Xa. A antitrombina (AT) é outro inibidor, que atua diretamente na trombina e noutros fatores. Também a α_2 -macroglobulina, a α_2 -antiplasmina e a α_1 -antitripsina inibem os fatores. A Proteína C inibe os co-fatores V e VIII e tem a sua atividade amplificada pela Proteína S. Para além disso, a Proteína C também estimula a fibrinólise.

A fibrinólise remove o excesso de fibrina, de maneira a não comprometer o normal fluxo do sangue e limitar a extensão do trombo em formação. O plasminogénio, presente no sangue, é convertido em plasmina pela ação de ativadores como o ativador tecidual do plasminogénio (TPA). A plasmina tem a função de degradar a fibrina e também fibrinogénio, fatores V e VIII e outras proteínas.¹⁶

Qualquer um dos vários componentes deste complexo sistema que esteja alterado qualitativa ou quantitativamente, pode causar graves problemas a nível da hemóstase. Estas perturbações na coagulação são detetadas analisando diferentes tempos de coagulação.

As amostras de sangue para estudo da coagulação vêm em tubo com citrato de sódio. É fundamental que a proporção entre o anticoagulante e a amostra de 1:9 seja cumprida, para serem evitados resultados falsos. Para isso, os volumes de todas as amostras são verificados. Caso o volume de amostra seja insuficiente, não é possível prosseguir com os testes pois os tempos de coagulação iriam estar falsamente aumentados, sendo dada a resposta especial de “Volume inadequado”. Este rastreio feito às amostras serve também para verificar a possível existência de coágulos. Nesta situação é também dada uma resposta especial e o processamento cessa por aqui, para evitar tempos falsamente diminuídos.

As amostras adequadas para os testes da coagulação são centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos.

As amostras que se apresentam muito hemolisadas após a centrifugação também não são processadas, uma vez que iriam originar tempos falsamente diminuídos, devido à libertação de cálcio. Amostras lipémicas também não são processadas por possibilidade de interferência nos resultados.

A maioria das provas de coagulação realizadas na rotina são (valores de referência em Anexo II):

1. Tempo de Protrombina (TP)

Avalia a via extrínseca e comum da cascata de coagulação, através da adição de componentes que induzem a sua iniciação – cálcio e Fator tecidual (ou tromboplastina). Como o tipo de tromboplastina utilizada faz variar o TP, este pode ser expresso em *International Normalized Ratio* (INR), para padronizar o resultado do teste.

O prolongamento do TP pode ser indicativo de deficiência ou inibição dos fatores de coagulação VII, X, V, II (protrombina), fibrinogénio.^{16,20} Estas alterações podem ser causadas, principalmente, por doença hepática (particularmente icterícia obstrutiva), tratamento com anticoagulantes orais, coagulação intravascular disseminada (CID) e deficiência em Vitamina K.^{16,17}

Para além da sua utilidade para diagnósticos de anomalias da coagulação, é também importante para monitorização da terapêutica anticoagulante oral.

2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)

Avalia a via intrínseca e comum, através da medição do tempo de coagulação após adição de fosfolípidos, de um ativador de superfície e de cálcio.²¹

O prolongamento do TTPA indica deficiência ou inibição dos fatores XII, XI, IX (Doença de Christmas), VIII (Hemofilia), X, V, II, fibrinogénio. Na CID, presença do anticoagulante lúpico e na terapia com heparina e novos anticoagulantes orais o tempo poderá estar também alongado.^{16,20}

A determinação do TTPA tem grande importância na monitorização de doentes sob terapêutica anticoagulante com heparina, uma vez que a presença deste anticoagulante se reflete notoriamente neste teste (heparina potencia o efeito da antitrombina, havendo por isso uma maior inibição de fatores da cascata de coagulação, incluindo os Fatores IXa, XI, XII, pertencentes à via intrínseca).

Se houver necessidade de se confirmar se o aumento do TTPA é real ou devido a heparina, devem-se avaliar o Tempo de Trombina e o Tempo de Reptilase.

3. Quantificação do Fibrinogénio

Determinação quantitativa do fibrinogénio, baseado no método de Clauss.

Deteta deficiência de fibrinogénio, sendo por isso útil na avaliação de certas doenças como a CID e doença hepática.¹⁶ Também se encontra diminuído em condições hereditárias – hipofribtinogenemia, afibrinogenemia e disfibrinogenemia.²¹

Níveis altos de produtos de degradação do fibrinogénio ou fibrina (FDP) podem interferir com o ensaio.¹⁷

4. D-dímeros (DD)

Determinação feita através de um imunoensaio turbidimétrico.

A degradação da fibrina origina derivados solúveis que contêm D-dímero. A concentração destes produtos de degradação aumenta quando há trombose recente. No entanto, não é uma avaliação específica.¹⁶ Assim, este teste é cada vez mais utilizado para exclusão de diagnóstico de trombozes e para a monitorização de terapêuticas tromboembólicas. Um resultado de D-dímero negativo, aliado à avaliação clínica, tem um valor preditivo negativo bastante elevado para Trombose Venosa Profunda (TVP) e Tromboembolismo Pulmonar (TEP).

Outras provas realizadas no setor do estudo da coagulação são:

5. Anticorpos Anti-Fator Plaquetário 4 (Ac anti-FP4)

Imunoensaio para deteção semi-quantitativa dos anticorpos que reagem com o Fator Plaquetário 4 (FP4) quando complexado com a heparina. Os anticorpos associados à heparina são normalmente encontrados em pacientes com trombocitopenia induzida pela heparina (HIT).

O Fator Plaquetário 4 é libertado dos grânulos plaquetários e complexa com a heparina na superfície da plaqueta. Desenvolvem-se anticorpos contra esse complexo, levando à ativação plaquetária, com consequente trombocitopenia e desenvolvimento de trombo. A HIT é, por isso, considerada paradoxal.¹⁶

Há suspeita de HIT quando os pacientes tratados com heparina apresentam um decréscimo na contagem das plaquetas superior a 50% a partir da linha de base. O diagnóstico rápido, através da deteção de anticorpos anti-FP4, é muito importante porque o tratamento com heparina tem de ser descontinuado e devem ser utilizados anticoagulantes alternativos.

6. Anti Xa

Ensaio cromogénico para a determinação quantitativa da atividade da heparina não fracionada e da heparina de baixo peso molecular, tendo maior importância na monitorização da heparina de baixo peso molecular, pois não é detetável pelo TTPA.²¹

A heparina liga e potencia a ação da antitrombina, que inibe os fatores IIa (trombina), IXa, Xa, XIa.¹⁶ A determinação do Fator Xa livre ou residual (que não é ligado e inibido pelo complexo heparina-antitrombina) é inversamente proporcional à quantidade de heparina.

7. Tempo de Trombina (TT)

O tempo de trombina mede a taxa de conversão de fibrinogénio em fibrina após adição de trombina.

A determinação do Tempo de Trombina é sensível à hipo e disfibrinogenemia e à inibição da trombina (por exemplo, por heparina). As causas mais comuns desta alteração são a CID ou o tratamento com heparina. O ensaio também é sensível à presença de FDP.^{16, 20}

Um resultado extremamente elevado é, na maioria das vezes, devido à presença de heparina não fracionada. Se a determinação do TT fizer suspeitar da presença de heparina, deve-se realizar o Tempo de Reptilase.¹⁷

Normalmente, este ensaio é realizado para avaliação de CID, para a monitorização do anticoagulante heparina e terapêutica anticoagulante, para a deteção da presença de FDP, anomalias quantitativas e qualitativas do fibrinogénio hereditárias ou adquiridas e aumento da fibrinólise.

8. Teste de Reptilase (TR)

O ensaio apenas difere do Tempo de Trombina na substância utilizada para a indução da conversão do fibrinogénio em fibrina. A trombina é substituída por reptilase (enzima purificada de veneno da cobra *Bothrops atrox*), que também tem a capacidade de clivar o fibrinogénio, transformando-o em fibrina.

Como o TT, este tempo estará prolongado na presença de grandes quantidades de FDP ou fibrinogénio anormal ou reduzido.

Ao contrário da trombina, a reptilase não é inibida pela heparina dando, por isso, tempos normais em plasmas heparinizados.^{16,20} Por este motivo, a determinação do TR em conjunto com o TT diferencia uma perturbação da síntese da fibrina da influência da heparina.

Não pertencendo à rotina, o laboratório realiza ainda outras provas mais específicas, como provas de avaliação do risco trombótico: Antitrombina III, Proteína C, Proteína S livre, Resistência à Proteína C ativa, pesquisa de Anticoagulante lúpico. Realiza também o doseamento de fatores, doseamento de plasminogénio, pesquisa de inibidor da plasmina, pesquisa de inibidores de fatores (testes de mistura e testes de paralelismo), pesquisa da Doença de Von Willebrand, testes de agregação plaquetar e tromboelastograma.

V. CONCLUSÃO

Considero que a realização deste estágio teve uma grande importância na minha formação pois permitiu-me ter uma visão global da rotina de um Laboratório de análises clínicas num contexto real de trabalho e compreender o papel do Técnico Superior de Análises Clínicas.

A formação teórica e prática adquirida no Mestrado de Análises Clínicas mostrou-se adequada à realidade com que me deparei no estágio profissional.

Tive a oportunidade de estagiar num local prestigiado como é o CHUC, em que o Laboratório abrange uma grande diversidade de áreas, de amostras recebidas, de utentes e de pessoal profissional, o que julgo ser uma grande vantagem.

Nesta área, a confiança no resultado emitido é de extrema importância e, por isso, todo o processo analítico (incluindo as fases pré e pós-analíticas) deve ser executado com a máxima responsabilidade para que sejam evitados erros.

A comunicação entre os diversos setores do Laboratório de análises e, principalmente, entre o Laboratório e o clínico é imprescindível, mas por vezes é difícil. Por isso, penso que deveria ser melhorada, para benefício dos utentes.

Apesar de considerar o tempo de estágio diminuto para uma participação mais aprofundada em cada uma das áreas, os objetivos propostos foram atingidos, tornando esta uma experiência com balanço bastante positivo.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; PFALLER, Michael – Microbiologia Médica. 6ª Ed. Barcelona: Mosby Elsevier, 2009. ISBN 978-0-323-05470-6.
2. MAHON, Connie; LEHMAN, Donald; MANUSELIS, George – Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ª Ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
3. PRESCOTT, Lansing; HARLEY, John; KLEIN, Donald. Microbiology. 5ª Ed. McGraw-Hill, 2002. ISBN 0-07-282905-2.
4. JORGENSEN, James; PFALLER, Michael – Manual of Clinical Microbiology. 11ª Ed. Washington, DC: ASM Press, 2015. ISBN 978-1-55581-738-1.
5. FORBES, Betty; SAHM, Daniel; WEISSFELD, Alice – Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12ª Ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. ISBN 0-323-03065-3.
6. CORREIA, Carlos [et al.] - Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. Acta Média Portuguesa. ISSN 0870-399X. Nº20 (2007), p.543-549.
7. KLEIN, Robert - Criteria for the Diagnosis of Urinary Tract Infection. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. ISSN 1062-4821. 3, Nº6 (1994), p.652–655.
8. Mayo Clinic – MRSA infection. Disponível na Internet: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/mrsa/basics/definition/con-20024479>. [Acedido a 16 de Julho de 2016].
9. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Programa Nacional de Controlo da Infecção: Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. 2004.
10. VIALE, P.; STEFANI, S. - Vascular Catheter-Associated Infections: A Microbiological and Therapeutic Update. Journal of Chemotherapy. ISSN 1120-009X. 18, Nº3 (2006), p.235–249.
11. KOWALSKI, Regis; DHALIWAL, Deepinder - Ocular Bacterial Infections: Current and Future Treatment Options. Expert Review of Anti-infective Therapy. ISSN 1478-7210. 3, Nº1 (2005), p.131–39.
12. BioMérieux SA – VITEK® MS. Disponível na Internet: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-ms>. [Acedido a 18 de Julho de 2016].
13. PATEL, R. - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*. ISSN 1058-4838. 57, Nº4 (2013), p.564–572.

14. BioMérieux SA – VITEK® 2 ID Cards. Disponível na Internet: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-2-identification-cards>. [Acedido a 18 de Julho de 2016].
15. BAIN, Barbara – A Beginner's Guide to Blood Cells. 2ª Ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-2175-0.
16. HOFFBRAND, A.; MOSS, P. – Fundamentos em Hematologia. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. ISBN 978-85-65852-30-2.
17. BAIN, Barbara [et al.] – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2011. ISBN-13: 9780702034084.
18. BAIN, Barbara – Blood Cells: A Practical Guide. 4ª Ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006. ISBN-10: 1-4051-4265-0.
19. FAILACE, R – Hemograma – Manual de Interpretação. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. ISBN 978-85-363-2081-6.
20. KEY, Nigel; MAKRIS, Michael; O'SHAUGHNESSY, Denise; LILLICRAP, David – Practical Hemostasis and Thrombosis. 2ª Ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN: 978-1-4051-8460-1.
21. A practical guide to laboratory haemostasis. Disponível na Internet: www.practical-haemostasis.com. [Acedido a 29 de Julho de 2016].

VII. ANEXOS

Anexo I. Valores de referência do hemograma.

Parâmetro	Valores de referência	
RBC	Masc.	4.5 – 5.5 × 10 ¹² /L
	Fem.	3.8 – 4.8 × 10 ¹² /L
Hb	Masc.	13 – 17 g/dL
	Fem.	12 – 15 g/dL
Hct	Masc.	40 – 50 %
	Fem.	36 – 46 %
VCM	83 – 101 fL	
RDW	11.6 – 14 %	
HCM	27.0 – 32.0 pg	
CHCM	31.5 – 34.5 g/L	
RET	50 – 100 × 10 ⁹ /L (0.5 – 2.5 %)	
WBC	4.0 – 10.0 × 10 ⁹ /L	
Neutrófilos	2.0 – 7.0 × 10 ⁹ /L (40 – 80%)	
Linfócitos	1.0 – 3.0 × 10 ⁹ /L (20 – 40%)	
Monócitos	0.2 – 1.0 × 10 ⁹ /L (2 – 20%)	
Eosinófilos	0.02 – 0.5 × 10 ⁹ /L (1 – 6%)	
Basófilos	0.02 – 0.1 × 10 ⁹ /L (<1 – 2%)	
PLT	150 - 400 × 10 ⁹ /L	
VPM	6.0 – 11.0 fL	
PDW	11.0 – 18.0 %	
PCT	0.150 – 0.500 %	

Anexo II. Valores de referência do estudo da hemóstase.

Parâmetro	Valores de referência
TP	12 – 17 seg
INR	0.9 – 1.26
TTPA	25 – 34 seg
Fibrinogênio	2 – 5 g/L
D-dímeros	0.0 – 0.5 µg/mL