



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MONOGRAFIA

TROMBOCITOPENIAS E AVALIAÇÃO DE PSEUDOTROMBOCITOPENIAS CASOS CLÍNICOS

Monografia apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Susana Coimbra com
coorientação da Professora Doutora Alice Santos Silva

Patrícia Ferreira de Castro

Porto, julho de 2016

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer principalmente à minha orientadora, Professora Doutora Susana Coimbra, e à minha coorientadora, Professora Doutora Alice Santos Silva, pela ajuda e tempo disponibilizados, para que desse modo me fosse possível desenvolver e concluir a minha Monografia.

Quero também agradecer ao meu colega do Mestrado em Análises Clínicas, Paulo Aguiar, por me permitir utilizar e analisar as amostras do seu Laboratório, onde tive a oportunidade de estagiar.

Quero agradecer ainda à minha família e amigos, pela compreensão e apoio demonstrados ao longo de todo o meu percurso académico. E em especial, quero agradecer de coração ao meu namorado, pela paciência infinita, motivação e apoio demonstrados, e principalmente por nunca me ter deixado desistir nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a todas as outras pessoas que contribuíram e foram essenciais para a minha formação académica durante o Mestrado em Análises Clínicas, incluindo Professores e colegas de turma.

RESUMO

A trombocitopoiese ou megacariocitopoiese é um processo complexo que resulta na libertação de milhares de plaquetas a partir de um único megacariócito. Alterações neste processo, podem determinar manifestações clínicas relevantes, associadas a perturbações hemorrágicas e/ou trombóticas.

A trombocitopenia é definida por um valor de plaquetas inferior a $150 \times 10^9/L$. As trombocitopenias devem ser avaliadas e monitorizadas, devido à sua associação com manifestações hemorrágicas, cuja gravidade é determinada pelo valor da trombocitopenia. Quando na avaliação laboratorial do valor de plaquetas se observa um valor inferior ao de referência e o doente não apresenta nenhum sintoma e/ou sinal clínico de hemorragia, nem história de anterior trombocitopenia, deve considerar-se a possibilidade de se tratar de uma pseudotrombocitopenia (PTCP).

A PTCP pode observar-se quando a contagem plaquetária é efetuada por analisadores automáticos de hematologia, sendo comum nos Laboratórios de Análises Clínicas. Na maior parte dos casos é secundária à agregação plaquetária *in vitro*, desencadeada pelo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

A avaliação laboratorial criteriosa de situações de PTCP é de extrema importância para evitar um diagnóstico errado e procedimentos terapêuticos desnecessários. A observação microscópica do esfregaço de sangue periférico, para a pesquisa de agregados plaquetários ou satelitismo plaquetário, deve ser realizada sempre que se observe um valor diminuído de plaquetas, reportado pelo analisador automático de hematologia, não associado a sintomas e/ou sinais clínicos de trombocitopenia. Para excluir a presença de PTCP induzida pelo EDTA e corrigir o valor plaquetas, deve proceder-se a uma nova colheita de sangue, usando um anticoagulante diferente, habitualmente o citrato.

A avaliação do doente, tendo em conta a sua história clínica e familiar, e a observação do respetivo esfregaço sanguíneo, são passos essenciais para excluir uma PTCP, no caso de uma contagem de plaquetas inferior ao valor de referência, obtida por contagem no analisador automático de hematologia.

Palavras-chave: trombocitopoiese, trombocitopenia, pseudotrombocitopenia, satelitismo plaquetário, agregados plaquetários, ácido etilenodiamino tetra-acético, avaliação laboratorial, esfregaço de sangue periférico.

ABSTRACT

Thrombocytopoiesis or megacariocytopoiesis is a complex process leading to the production of thousands of platelets from a single megakaryocyte. Defects in this process may induce clinically relevant conditions, associated with hemorrhagic and/or thrombotic disturbances.

Thrombocytopenia is defined as a platelet value less than $150 \times 10^9/L$. Thrombocytopenia should be evaluated and monitored due to their association with bleeding that worsens with the severity of thrombocytopenia. When, in the laboratory assessment of platelets, its value is inferior to the reference value and the patient shows no symptoms and/or clinical signs of bleeding, neither history of thrombocytopenia, the possibility of pseudothrombocytopenia (PTCP) should be considered.

PTCP may occur when platelet count is performed by using automated hematology analyzers and is common in Clinical Laboratories. In most cases, PTCP is secondary to *in vitro* platelet aggregation, usually triggered by the anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Careful laboratory evaluation of PTCP is extremely important to avoid a wrong diagnosis and unnecessary therapeutic procedures. Microscopic observation of the peripheral blood smear, for the detection of platelet aggregates or platelet satellitism, should be performed whenever a decreased platelet value is reported by the automated hematology analyzer that is not associated with symptoms and/or clinical signs of thrombocytopenia. To exclude PTCP induced by EDTA and to correct platelet value, a new blood collection should be performed using a different anticoagulant, usually citrate.

The evaluation of the patient, considering the medical and familiar history, and the observation of the peripheral blood smear, represent essential steps to exclude PTCP, in case of a decreased platelet count reported by an automatic hematology analyzer.

Keywords: Thrombocytopoiesis, thrombocytopenia, pseudothrombocytopenia, platelet satellitism, platelet aggregates, ethylenediaminetetraacetic acid, laboratory evaluation, peripheral blood smear.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. MEGACARIOCITOPOIESE OU TROMBOCITOPOIESE	1
PROLIFERAÇÃO E MATURAÇÃO DOS MEGACARIÓCITOS	1
TROMBOPOIETINA.....	4
<i>REGULAÇÃO DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE TROMBOPOIETINA</i>	5
2. ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE PLAQUETAS	7
TROMBOCITOSE.....	8
<i>CLASSIFICAÇÃO DAS TROMBOCITOSE</i>	8
<i>MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS</i>	9
<i>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS</i>	10
<i>AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE TROMBOCITOSE</i>	10
TROMBOCITOPENIAS.....	12
<i>CLASSIFICAÇÃO DAS TROMBOCITOPENIAS</i>	12
TROMBOCITOPENIAS CONGÊNITAS/HEREDITÁRIAS	12
TROMBOCITOPENIAS ADQUIRIDAS	16
<i>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS</i>	30
<i>AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE TROMBOCITOPENIAS</i>	31
3. PSEUDOTROMBOCITOPENIAS	35
DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA SUA IDENTIFICAÇÃO	35
CAUSAS DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA	35
<i>ERROS PRÉ-ANALÍTICOS</i>	36
<i>PSEUDOTROMBOCITOPENIA ASSOCIADA A PLAQUETAS GIGANTES</i>	36
<i>PSEUDOTROMBOCITOPENIA INDUZIDA PELO ANTICOAGULANTE</i>	36
SATELITISMO PLAQUETÁRIO NA PRESENÇA DE EDTA	38
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA PRESENÇA DE EDTA	39
4. CASOS CLÍNICOS	43
APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA	44

CORREÇÃO DA CONTAGEM DE PLAQUETAS E LEUCÓCITOS EM CITRATO DE SÓDIO.....	45
HEMOGRAMAS E “FLAGS” EMITIDOS PELO EQUIPAMENTO	45
OBSERVAÇÃO DO ESFREGAÇO SANGUÍNEO	50
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do modelo clássico e alternativo para o desenvolvimento do progenitor eritroide/megacariocítico a partir das <i>stem cell</i> hematopoiéticas.	2
Figura 2. Processo de megacariocitopoiese/trombocitopoiese a partir do progenitor eritroide/megacariocítico.	3
Figura 3. Representação esquemática das diferentes fases incluídas na biogénese plaquetária.	4
Figura 4. Regulação do processo de megacariocitopoiese/trombocitopoiese pelas próprias plaquetas.	6
Figura 5. Algoritmo utilizado na realização do diagnóstico de trombocitoses.....	11
Figura 6. Mecanismo fisiopatológico de produção de anticorpos antiplaquetários na púrpura trombocitopénica imune..	20
Figura 7. Mecanismo fisiopatológico subjacente à trombocitopenia induzida pela heparina.	22
Figura 8. Mecanismo fisiopatológico subjacente à púrpura trombocitopénica trombótica.	26
Figura 9. Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à coagulação intravascular disseminada.	28
Figura 10. Algoritmo utilizado na realização do diagnóstico de trombocitopenias.	34
Figura 11. Estrutura bioquímica do ácido etilenodiamino tetra-acético	38
Figura 12. Satelitismo plaquetário observado numa amostra de sangue colhida em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético.....	39
Figura 13. Mecanismo fisiopatológico da pseudotrombocitopenia com agregação plaquetária induzida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético.	41
Figura 14. Histograma característico de uma pseudotrombocitopenia numa amostra obtida em tubo de colheita com ácido etilenodiamino tetra-acético (à esquerda) em contraste com um histograma normal obtido em tubo de colheita com citrato de sódio, de uma amostra do mesmo indivíduo (à direita).	42

Figura 15. Algoritmo utilizado para a identificação de casos de pseudotrombocitopenia induzida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético.	43
Figura 16. Hemograma relativo ao caso 1..	47
Figura 17. Hemograma relativo ao caso 2.	47
Figura 18. Hemograma relativo ao caso 3.	48
Figura 19. Histogramas plaquetários provenientes da contagem de plaquetas em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (à esquerda) e em citrato de sódio (à direita), referentes aos 3 casos clínicos em estudo.....	49
Figura 20. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 1) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).	50
Figura 21. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 2) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).	50
Figura 22. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 3) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação fisiopatológica das trombocitoses	8
Tabela 2. Classificação fisiopatológica das trombocitopenias	13
Tabela 3. Características da trombocitopenia gestacional que auxiliam no seu diagnóstico	30
Tabela 4. Principais achados laboratoriais no esfregaço de sangue periférico, associados a trombocitopenia; diagnósticos possíveis e testes laboratoriais adicionais para a sua confirmação.....	33
Tabela 5. Características e aplicações clínicas dos anticoagulantes mais frequentemente utilizados nas análises hematológicas de rotina	37
Tabela 6. Valor de plaquetas nas amostras colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético e com citrato de sódio, nos 3 casos clínicos estudados	44
Tabela 7. Valor de leucócitos nas amostras colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético e com citrato de sódio, nos 3 casos clínicos estudados	44
Tabela 8. Mensagem e respetivo significado dos flags emitidos pelo equipamento, em relação à linhagem plaquetária.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMTS-13 – Metaloprotease plasmática que cliva o Fator de von Willebrand
(*A Disintegrin-like And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motifs, member 13*)

AVC – Acidente vascular cerebral

BFU-E – *Burst-forming unit-erythroid*

BFU-MK – *Burst-forming unit-megakaryocyte*

CAA – Células apresentadoras de antígenos

CFU-MK – *Colony-forming unit-megakaryocyte*

CID – Coagulação intravascular disseminada

CLP – Progenitor comum linfóide (*common lymphoid progenitor*)

CMP – Progenitor comum mieloide (*common myeloid progenitor*)

c-MPL – Recetor da trombopoietina

CMV – Citomegalovírus

EBV – Vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FP4 – Fator plaquetário 4

FT – Fator tecidual

FvW – Fator de von Willebrand

FVIIa – Fator VII ativado

GB – Glóbulos brancos

GMP – Progenitor dos granulócitos e macrófagos (*granulocyte/macrophage progenitor*)

GP – Glicoproteínas

GPL – Glicoproteína da membrana lisossomal

GV – Glóbulos vermelhos

HCV – Vírus da hepatite C (*hepatite C virus*)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus*)

HPA – Antígeno plaquetário humano (*human platelet antigen*)

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

JAK – Janus Cinase

LDH – Lactato desidrogenase

LES – Lúpus eritematoso sistémico

LLC – Leucemia linfóide crónica

LMC – Leucemia mieloide crónica

MAC – Mestrado em Análises Clínicas

MEP – Progenitor eritroide/megacariocítico (*megakaryocyte/erythroid progenitor*)

MFP – Mielofibrose primária

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MO – Medula óssea

MPV – Volume plaquetário médio (*mean platelet volume*)

NK – *Natural killer*

PAI – Inibidor da ativação do plasminogénio (*plasminogen activator inhibitor*)

PCR – Proteína C-reativa

PCT – Plaquetócrito

PDF – Produtos de degradação da fibrina

PDW – Amplitude de distribuição das plaquetas (*platelet distribution width*)

PECAM – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária (*platelet endothelial cell adhesion molecule*)

P-LCR – Percentagem de plaquetas gigantes (*platelet large cell ratio*)

PLT – Plaquetas

PMG140 – Proteína membranar α -granular 140

PPT – Púrpura pós-transfusional

PTCP – Pseudotrombocitopenia

PTI – Púrpura trombocitopénica imune

PTT – Púrpura trombocitopénica trombótica

PV – Policitemia vera

SBS – Síndrome de Bernard-Soulier

SCF – Fator *stem cell* (*stem cell factor*)

SCH – *Stem cell* hematopoiética

SDF – Fator derivado das células do estroma (*stromal cell-derived factor*)

SHU – Síndrome hemolítico urémico

SP – Satelitismo plaquetário

STAT - *Signal Transducers and Activators of Transcription*

Tc – T citotóxica

TCR – Recetor das células T (*T-cell receptor*)

TE – Trombocitemia essencial

TG – Trombocitopenia gestacional

Th – T *helper*

TIH – Trombocitopenia induzida pela heparina

TNF – Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TP – Tempo de protrombina

TPO – Trombopoietina

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativado

VS – Velocidade de sedimentação

WAS – Síndrome Wiskott-Aldrich (*Wiskott-Aldrich syndrome*)

WASp – Proteína de Síndrome Wiskott-Aldrich (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*)

WBC – Glóbulos brancos (*white blood cells*)

XLT – Trombocitopenia ligada ao cromossoma X (*X-linked thrombocytopenia*)

1. MEGACARIOCITOPOIESE OU TROMBOCITOPOIESE

A megacariocitopoiese ou trombocitopoiese corresponde a um processo complexo, que ocorre em microambientes especializados da medula óssea (MO) e envolve o comprometimento das *stem cell* hematopoiéticas (SCH) com a linhagem megacariocítica e a proliferação, diferenciação e maturação dos progenitores megacariocíticos em megacariócitos maduros, que vão dar origem às plaquetas circulantes, essenciais à hemostasia sanguínea [1].

Todos os dias, num adulto saudável, são produzidas aproximadamente 1×10^{11} plaquetas a partir dos megacariócitos maduros, num nível de produção que pode aumentar em casos de necessidade acrescida de plaquetas [2].

PROLIFERAÇÃO E MATURAÇÃO DOS MEGACARIÓCITOS

Os megacariócitos são células mieloides raras (constituem apenas cerca de 0,01% do total de células nucleadas da MO normal), que possuem um aspeto característico, apresentando-se como células de grande diâmetro e com núcleo único, multilobulado e poliploide [2].

Durante a fase de desenvolvimento embrionário, antes das cavidades medulares estarem formadas, para suportar o desenvolvimento das células sanguíneas, os megacariócitos são produzidos essencialmente no saco vitelino, fígado fetal e baço, passando depois a residir quase exclusivamente a nível da MO, podendo também ser encontrados no sangue periférico e pulmões [3, 4].

Os megacariócitos resultam da diferenciação das SCH pluripotentes residentes no nicho osteoblástico da MO. No modelo clássico do desenvolvimento da linhagem hematopoiética, as SCH originam inicialmente duas linhagens celulares principais, que incluem o progenitor comum linfóide (CLP) e o progenitor comum mieloide (CMP). O CLP diferencia-se para produzir os diferentes tipos de linfócitos (células NK (*natural killer*), T e B), enquanto o CMP se diferencia nos progenitores dos granulócitos e dos macrófagos (GMP) e no progenitor eritroide/megacariocítico (MEP). Existem, no entanto, outros estudos que sugerem um modelo alternativo, em que o MEP se diferencia diretamente a partir das SCH, originando a linhagem eritroide ou megacariocítica, não existindo neste caso o intermediário CMP (figura 1) [2, 5].

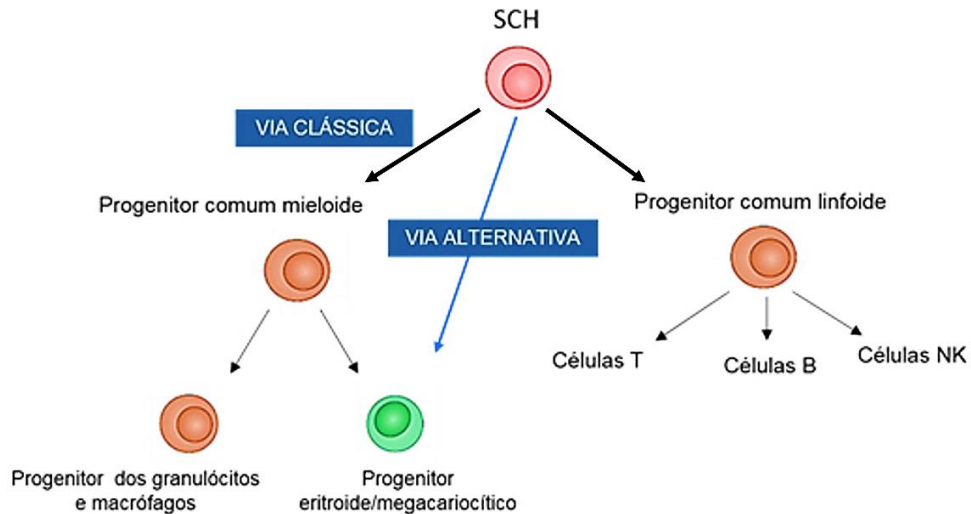


Figura 1. Representação do modelo clássico e alternativo para o desenvolvimento do progenitor eritroide/megacariocítico a partir das stem cell hematopoéticas.

Abreviaturas: NK, *natural killer*; SCH, *stem cell* hematopoética (Figura adaptada de Wen Q, et al. [2]; Szalai G, et al. [5]).

O MEP pode diferenciar-se em progenitores da linha eritroide, as BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*) ou da linhagem megacariocítica, as BFU-MK (*burst-forming unit-megakaryocyte*), já completamente restritos à linhagem eritroide ou megacariocítica, respetivamente [3, 6]. A diferenciação e maturação dos BFU-MK dá origem aos CFU-MK (*colony-forming unit-megakaryocyte*), que finalmente se diferenciam em precursores megacariocíticos, que já são reconhecidos morfológicamente, os megacarioblastos, que por endomitoses sucessivas dão origem aos megacariócitos maduros, que perdem essa capacidade de endomitose e que por maturação darão origem à libertação de plaquetas (figura 2) [3].

O processo de maturação dos megacariócitos inclui o aumento do número de lóbulos do núcleo, a expansão citoplasmática, a síntese de todos os componentes essenciais para a produção de plaquetas funcionais, com aparecimento de granulações, e posteriormente o desenvolvimento de um sistema de membranas altamente invaginado, que serve de reservatório aos organelos citoplasmáticos e grânulos secretores necessários à biogénese dos precursores das plaquetas [1, 2].

A endomitose, processo regulado pela trombopoietina (TPO), consiste numa forma modificada de mitose, na qual ocorre a replicação do DNA, sem existir divisão citoplasmática ou nuclear, resultando em células poliploides, com núcleo multilobulado (desde 4N a 128N por megacariócito) [3, 4].

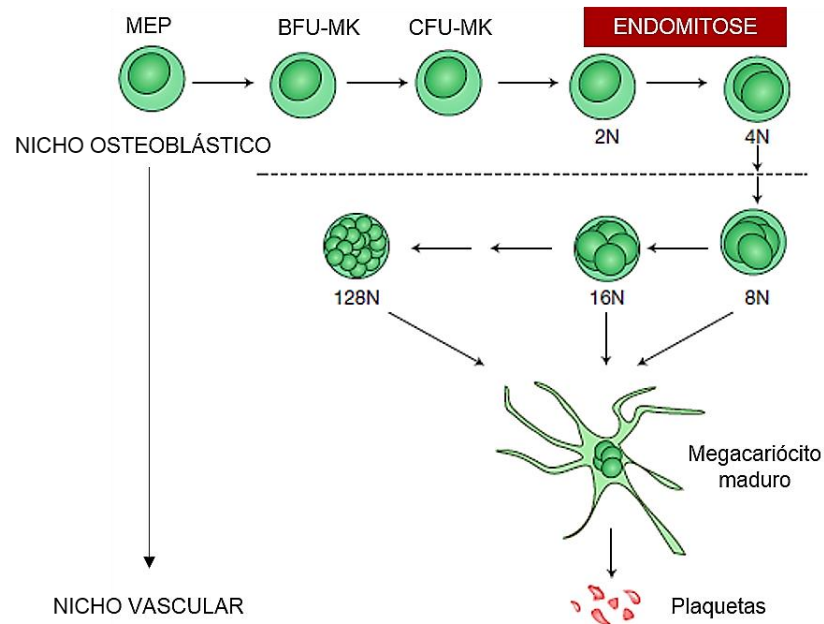


Figura 2. Processo de megacariocitopoiese/trombocitopoiese a partir do progenitor eritroide/megacariocítico.

Abreviaturas: BFU-MK, *burst-forming unit-megakaryocyte*; CFU-MK, *colony-forming unit-megakaryocyte*; MEP, progenitor eritroide/megacariocítico (Figura adaptada de Wen Q, et al. [2]).

Ainda durante o processo de maturação, os megacariócitos migram do nicho osteoblástico para o nicho vascular da MO, onde o microambiente específico promove a finalização da sua maturação e posteriormente a formação de múltiplas extensões citoplasmáticas produzidas pela evaginação do extenso sistema de membrana interna dos megacariócitos maduros (figura 2) [3].

Na fase final do processo de formação dos megacariócitos maduros, os componentes essenciais à biogênese plaquetária (que incluem os grânulos plaquetários, organelos e ribossomas) movimentam-se, com auxílio do sistema microtubular, para as pontas distais das extensões citoplasmáticas, onde permanecem aprisionados. Estes prolongamentos citoplasmáticos projetam-se para os vasos sanguíneos sinusoidais da MO, para onde são libertados. Finalmente, já na circulação sanguínea, originam-se plaquetas individuais por um processo de divisão dos seus precursores, sendo cada megacariócito capaz de produzir cerca de 2000 a 3000 plaquetas (figura 3) [3, 4, 7, 8]. Ocasionalmente, pode haver libertação de megacariócitos completos para a circulação sanguínea, onde sofrem depois fragmentação citoplasmática, com libertação das plaquetas [5].

A formação e libertação de plaquetas corresponde, portanto, a um processo terminal dos megacariócitos maduros, a que se segue a apoptose e fagocitose do núcleo, pelos macrófagos circulantes [5].

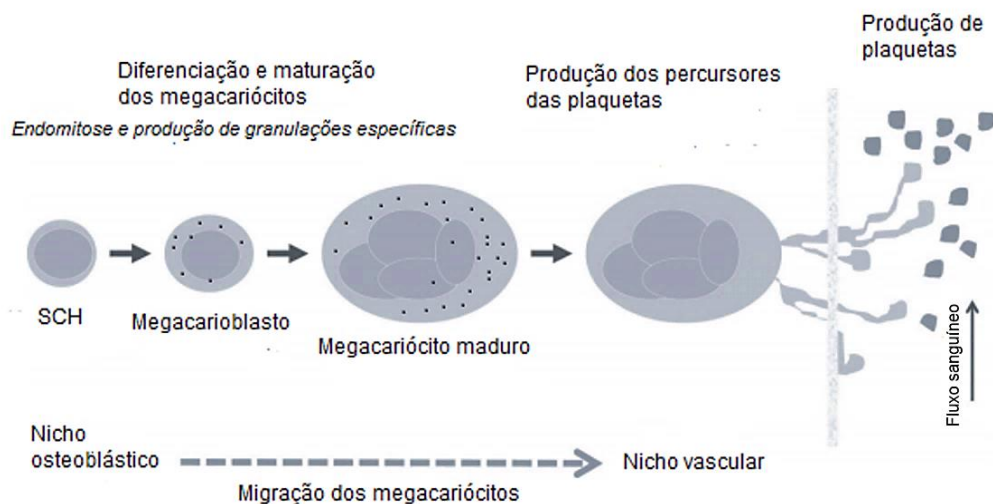


Figura 3. Representação esquemática das diferentes fases incluídas na biogênese plaquetária.

Abreviaturas: SCH, *stem cell* hematopoietica (Figura adaptada de Savoia A. [8]).

O processo de produção de plaquetas ocorre na presença de um microambiente complexo, nos nichos osteoblástico e vascular da MO, altamente especializados para o efeito. Nestes locais existe uma grande variedade de mediadores celulares, incluindo quimiocinas, citocinas, fatores de transcrição e sinalização, moléculas de adesão, oxigênio e cálcio, responsáveis por regular o processo de trombocitopoiese, incluindo a produção e migração dos megacariócitos [1].

TROMBOPOIETINA

Entre os diversos mediadores celulares existentes, a TPO é o regulador fisiológico primário e a citocina mais potente que estimula todas as fases da megacariocitopoiese/trombocitopoiese [1, 9]. É sintetizada principalmente a nível hepático e renal, e medeia os seus efeitos através da ligação ao recetor da TPO (c-MPL) que se encontra expresso principalmente na superfície membranar das SCH, progenitores e precursores megacariocíticos, megacariócitos maduros e plaquetas [9-11].

A TPO regula o processo de maturação dos megacariócitos e a sua fragmentação para plaquetas, e possui ainda efeitos biológicos mais amplos; suporta a sobrevivência e a proliferação das SCH e de todos os progenitores com potencial megacariocítico, promove o processo de endomitose e a maturação dos megacariócitos e melhora a resposta plaquetária, induzindo a adesão e agregação das plaquetas [11].

A TPO atua ainda em sinergia com outras hormonas e citocinas hematopoieticas, incluindo o fator *stem cell* (SCF), fator derivado das células do estroma (SDF)-1, interleucina (IL)-6, IL-3, IL-11 e eritropoietina [7, 12].

Como se referiu, a TPO liga-se ao recetor c-MPL, exercendo múltiplos efeitos, a nível das SCH, megacariócitos e plaquetas. Após a ligação e ativação do recetor c-MPL, por autofosforilação, este sofre uma mudança conformacional, ativando várias vias de sinalização molecular, incluindo a fosforilação dos resíduos de tirosina de um membro da família da tirosina cinase – JAK (Janus cinase) 2. Este, uma vez ativado, origina uma rápida fosforilação de vários fatores de transcrição, incluindo as proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*), que dimerizam e formam complexos específicos de ligação ao DNA, migrando para o núcleo, onde regulam a transcrição génica de moléculas antiapoptóticas e pró-proliferativas, importantes para a sobrevivência e proliferação de células envolvidas na megacariocitopoiese/trombocitopoiese [13, 14]. A etapa de ativação de JAK2 e a propagação do sinal através da fosforilação de resíduos de tirosina são assim importantes na regulação da atividade da TPO nas células da linhagem megacariocítica [15].

REGULAÇÃO DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE TROMBOPOIETINA

Os rins e principalmente o fígado, produzem TPO de forma constitutiva, libertando-a para a circulação sanguínea, onde a sua concentração plasmática varia de forma inversa com o número de plaquetas circulantes, às quais se liga. A quantidade de TPO disponível para regular o processo de proliferação e maturação dos megacariócitos na MO depende da sua ligação aos recetores plaquetários c-MPL, responsáveis por controlar o *uptake* e posterior destruição desta hormona [12, 16].

Assim, durante situações de trombocitose, o elevado número de plaquetas circulantes remove a maior parte da hormona presente na circulação sanguínea, diminuindo deste modo a quantidade de TPO disponível para promover a proliferação dos megacariócitos na MO. Pelo contrário, em situações de trombocitopenia, como existem menos plaquetas circulantes, ocorre um menor *uptake* da hormona, e, por consequência, existe uma maior quantidade de hormona disponível no plasma para estimular o processo de trombocitopoiese e restabelecer o valor normal de plaquetas (figura 4) [11, 12].

Ou seja, o número total de plaquetas circulantes regula a sua própria produção na MO, regulando os níveis de TPO plasmáticos, assegurando um número de plaquetas dentro dos valores fisiológicos [17].

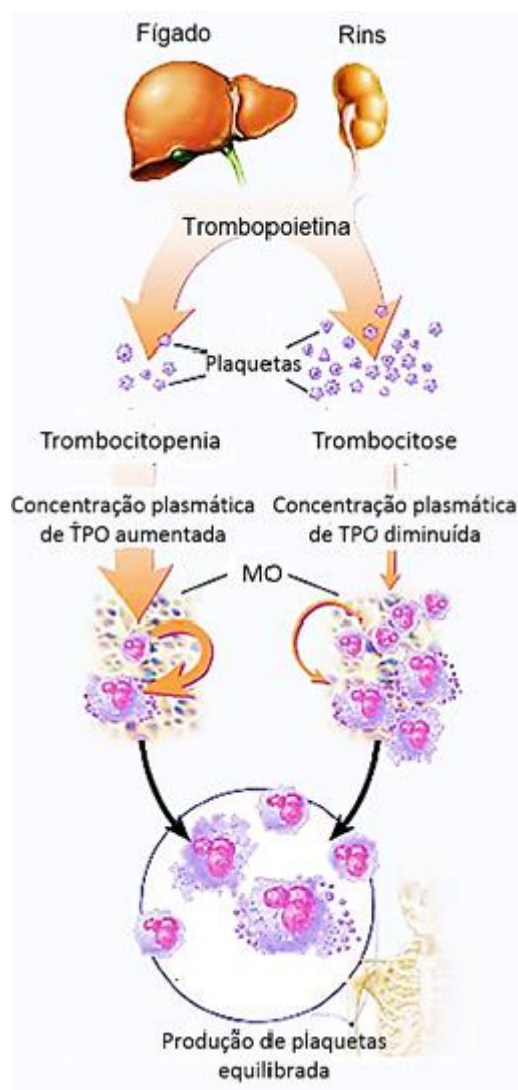


Figura 4. Regulação do processo de megacariocitopoiese/trombocitopoiese pelas próprias plaquetas.

Abreviaturas: MO, medula óssea; TPO, trombopoietina (Figura adaptada de Kaushansky K. [12]).

2. ALTERAÇÃO NO NÚMERO DE PLAQUETAS

As plaquetas correspondem às células sanguíneas de menor tamanho, que apesar de serem apenas fragmentos citoplasmáticos anucleados provenientes dos megacariócitos, possuem um papel essencial na manutenção da hemostasia sanguínea. Para além de participarem nos processos de hemóstase e trombose, atuam também na manutenção e regulação do tônus vascular, na defesa do hospedeiro e no processo inflamatório [18].

Em estados fisiológicos, as plaquetas circulam sem aderir ao endotélio vascular intacto. Após lesão endotelial e exposição das plaquetas a estruturas do subendotélio (colagénio, fibronectina), ocorre a sua ativação com libertação de partículas prócoagulantes e consequente agregação plaquetária, com formação temporária de um coágulo hemostático primário, para prevenir uma hemorragia aguda no local de lesão. De modo a obter uma reparação permanente do vaso sanguíneo, o processo de coagulação é ativado pelos fosfolípidos carregados negativamente à superfície das plaquetas ativadas e pelo fator tecidual (FT) libertado pelas células endoteliais lesadas, conduzindo à formação de um coágulo de fibrina mais estável. Existindo alterações no número e/ou função das plaquetas, o processo de hemostasia sanguíneo encontra-se comprometido, podendo ocorrer eventos hemorrágicos e/ou trombóticos graves [18].

Para que ocorra a manutenção da hemostasia sanguínea, o valor de plaquetas no sangue periférico de um indivíduo adulto saudável varia entre $150 - 400 \times 10^9$ plaquetas/L. Ocasionalmente, pessoas aparentemente saudáveis possuem valores entre os $400 - 450 \times 10^9$ plaquetas/L de sangue [9, 19].

Considerando o tempo de semivida médio das plaquetas circulantes (aproximadamente 10 dias) e o facto de 1/3 destas ser sequestrada a nível do baço, um adulto necessita produzir diariamente cerca de 1×10^{11} plaquetas, de forma a manter um valor de plaquetas dentro dos limites considerados de referência [19]. É necessário que exista um equilíbrio constante entre a trombocitopoiese e o consumo plaquetário, pois um desequilíbrio nestes processos pode conduzir a valores superiores ou inferiores aos valores de referência mencionados, ocorrendo nesses casos trombocitose ou trombocitopenia, respetivamente [10, 19].

O limite inferior do número de plaquetas, que define uma trombocitose clinicamente relevante, é variável de pessoa para pessoa e a definição desse valor varia bastante na literatura científica. No entanto, um valor superior a 450×10^9 plaquetas/L num adulto é um valor aceite pela generalidade dos autores como indicador de trombocitose [20, 21].

A trombocitopenia num adulto é definida como um valor de plaquetas inferior ao limite de referência da população em geral, que na maioria dos laboratórios corresponde a um valor

inferior a 150×10^9 plaquetas/L [22]. No entanto, se o indivíduo se apresentou estável nos últimos meses, uma contagem de plaquetas entre $100 - 150 \times 10^9$ /L não indica necessariamente a presença de doença, pelo que a adoção de um valor de *cut-off* de 100×10^9 plaquetas/L pode ser mais apropriado para identificar uma trombocitopenia clinicamente relevante associada a uma situação patológica [23, 24].

TROMBOCITOSE

A trombocitose é detetada maioritariamente de forma acidental, em indivíduos geralmente assintomáticos, quando realizam análises hematológicas de rotina [25].

CLASSIFICAÇÃO DAS TROMBOCITOSSES

As trombocitoses podem ser secundárias/reativas, primárias/clonais ou hereditárias/familiares, de acordo com a sua etiologia, tal como se pode observar na tabela 1 [17, 25, 26].

Tabela 1. Classificação fisiopatológica das trombocitoses

Classificação	Etiologia
Trombocitose secundária/reativa	Situação transitória - Hemorragia aguda - Exercício físico prolongado Situação contínua - Deficiência em ferro - Inflamação aguda/crónica e doenças infecciosas - Esplenectomia - Reação medicamentosa - Lesão tecidual - Neoplasias
Trombocitose primária/clonal	- Trombocitemia essencial (mutação JAK2-V617F ou MPL-W515L/K); - Outras doenças mieloproliferativas crónicas: policitemia vera (mutação JAK2-V617F) e mielofibrose primária (mutação JAK2-V617F ou MPL-W515L/K) - Leucemia mieloide crónica (rearranjo cromossomal BCR-ABL1).
Trombocitose hereditária/familiar	Corresponde a uma doença genética rara; a maioria dos casos ocorre devido a mutações germinativas no gene <i>TPO</i> ou <i>MPL</i> .

Abreviaturas: JAK, Janus cinase; MPL, recetor da trombopoietina; TPO, trombopoietina.

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

- Trombocitose secundária/reactiva

A trombocitose secundária/reactiva corresponde à causa mais frequente de trombocitose na população em geral, sendo observada numa grande variedade de condições subjacentes; a lesão tecidual devido a cirurgia, infeção, inflamação crónica ou neoplasia são causas comuns deste tipo de achado clínico, podendo também ocorrer associada a algumas situações fisiológicas transitórias [17].

A trombocitose reativa surge essencialmente devido à presença de elevados níveis endógenos de IL-6, bem como de outras citocinas e/ou catecolaminas, presentes na resposta de fase aguda de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. A IL-6 é o principal mediador celular responsável pela sobreprodução hepática de TPO e dessa forma estimula o processo de megacariocitopoiese/trombocitopoiese a nível da MO [17, 25].

- Trombocitose primária/clonal

Este grupo de doenças é caracterizado pela expansão clonal descontrolada de uma linhagem celular específica de células progenitoras descendentes de uma SCH pluripotente, conduzindo a um excesso de células sanguíneas maduras. A trombocitose primária/clonal é encontrada principalmente nas doenças mieloproliferativas crónicas, particularmente na trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV), mielofibrose primária (MFP) e leucemia mieloide crónica (LMC) [21].

A mieloproliferação anormal deve-se à ativação constitucional de vias de transdução de sinal, causada por rearranjos genéticos ou mutações que afetam as proteínas tirosina cinase ou moléculas relacionadas. A presença de mutações somáticas no gene *JAK2* e no gene *MPL* conduz a uma orientação mais eficiente do sinal da TPO e por consequência a uma produção plaquetária aumentada [26].

A mutação somática específica *JAK2-V617F*, associada a ganho de função, está relacionada com perda do controlo auto-inibitório desta tirosina cinase. Assim, a *JAK2-V617F* mutante permanece constitutivamente ativada, independentemente do ligante, e desenvolve hipersensibilidade às citocinas, podendo conduzir à hiperproliferação das três linhagens celulares, o que frequentemente se manifesta como PV com eritrocitose, trombocitose e leucocitose com neutrofilia. Esta mutação é encontrada em mais de 90% dos doentes com PV, 60% dos casos de TE e 50% dos casos de MFP [20].

A mutação somática específica *MPL-W515K/L* corresponde também a uma mutação com ganho de função, que induz a ativação espontânea e constitutiva do recetor c-MPL sem existir a ligação do ligando, determinando uma produção excessiva de plaquetas. Esta

mutação foi detetada em 5 a 8% dos doentes com MFP e em cerca de 3 a 5% dos doentes com TE sem mutação JAK2-V617F associada [20].

A LMC está associada a uma expansão clonal desregulada de todas as células pertencentes à via da maturação granulocítica, devido à ocorrência de uma translocação entre os cromossomas 9 e 22 que origina uma fusão dos genes *BCR* e *ABL1* (“cromossoma Philadelphia”), com produção consequente de uma proteína de fusão BCR-ABL1. Esta proteína de fusão possui uma atividade tirosina cinase descontrolada, favorecendo a divisão e proliferação celular de forma inadequada, sendo, por isso, frequentemente acompanhada de trombocitose (em aproximadamente 50% dos doentes com LMC) [21].

- Trombocitose hereditária/familiar

A trombocitose hereditária/familiar corresponde a uma doença genética heterogénea extremamente rara [16].

Esta patologia está maioritariamente associada a mutações germinativas específicas no gene *TPO*, que resultam na desrepressão da sua transcrição génica, originando uma sobreprodução do fator de crescimento. Embora menos frequentemente, pode encontrar-se ainda associada a mutações pontuais ativantes no gene *MPL* [16, 25].

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS

Na maioria dos doentes, é possível observar a presença de sintomas e/ou sinais clínicos típicos de uma doença sistémica subjacente ativa, incluindo manifestações gerais como febre, sudorese, perda/ganho de peso e manifestações cutâneas. No entanto, em doentes com patologias subclínicas, como neoplasias ocultas, pode existir uma trombocitose secundária sem a presença de sintomas [17].

A existência de trombocitose nestes doentes está associada a várias complicações, incluindo um maior risco de ocorrência de eventos trombóticos, como o acidente vascular cerebral (AVC), isquemia periférica e o enfarte do miocárdio. Em conjunto com as complicações trombóticas, existe um risco paradoxal de hemorragia devido a uma função plaquetária alterada, ocorrendo hemorragias principalmente a nível mucocutâneo [3, 9].

AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE TROMBOCITOSSES

Após confirmação da trombocitose, pela visualização do esfregaço de sangue periférico, deve determinar-se se o processo é reativo, clonal ou hereditário. Para isso, realiza-se uma avaliação inicial de forma a excluir as causas frequentes de uma trombocitose reativa [21]. No estudo do doente devem considerar-se as características clínicas, incluindo exame físico e histórico médico completo, avaliação cuidadosa dos sinais e/ou sintomas de

doenças sistêmicas subjacentes e avaliação de parâmetros hematológicos relevantes [21, 27].

Os exames laboratoriais básicos, devem incluir a determinação dos níveis de PCR (proteína C-reativa) e VS (velocidade de sedimentação), bem como, a determinação do *status* de ferro, para excluir a deficiência em ferro. A trombocitose reativa está geralmente, mas não sempre, associada a valores de VS e PCR aumentados ou a níveis e reservas de ferro diminuídos, podendo estes dados auxiliar na identificação da causa de trombocitose. Se estes parâmetros se apresentarem dentro dos valores de referência, num indivíduo assintomático, sem nenhuma patologia subjacente visível e se a trombocitose persistir, será necessário recorrer à execução de um aspirado e biópsia medular, e também à pesquisa de alterações genéticas clonais, para avaliar se se trata de uma trombocitose clonal ou hereditária [21, 27].

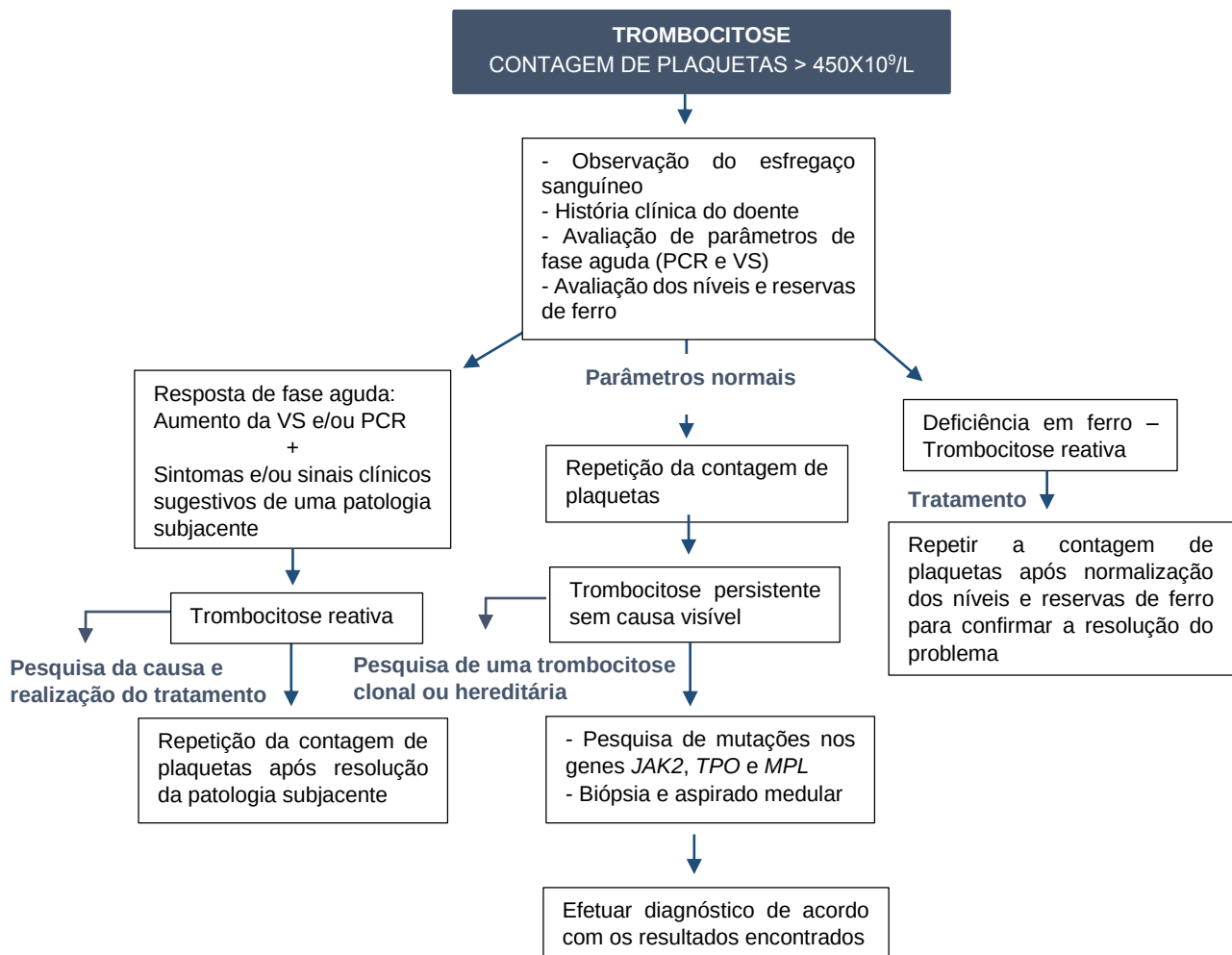


Figura 5. Algoritmo utilizado na realização do diagnóstico de trombocitoses.

Abreviaturas: JAK, Janus cinase; MPL, recetor da trombopoietina; PCR, proteína C-reativa; TPO, trombopoietina; VS, velocidade de sedimentação (Figura adaptada de Harrison CN, *et al.* [27]).

Na figura 5, encontra-se representado um algoritmo de trabalho que poderá ser utilizado para o estudo das trombocitoses.

TROMBOCITOPENIAS

Com a produção dos analisadores automáticos de hematologia, a trombocitopenia tornou-se num achado hematológico relativamente comum, que é detetado acidentalmente em análises de rotina [22, 28].

Uma baixa contagem de plaquetas não indica a presença de uma etiologia específica, podendo estar associada a uma grande variedade de situações clínicas subjacentes, tornando-se essencial a realização de uma investigação adicional. A identificação correta da causa de trombocitopenia é fundamental para o tratamento dos doentes [23, 28].

CLASSIFICAÇÃO DAS TROMBOCITOPENIAS

A trombocitopenia corresponde a um problema clínico que pode ter diferentes etiologias, sendo classificada em 5 categorias: trombocitopenias adquiridas por diminuição da produção plaquetária; por aumento da sua *clearance* no sangue periférico; por aumento da sequestração plaquetária a nível do baço; por diluição plaquetária; e trombocitopenias congénitas/hereditárias (tabela 2) [24, 28, 29]. Para além disso, é importante, numa primeira abordagem hematológica, considerar a possibilidade de uma pseudotrombocitopenia.

TROMBOCITOPENIAS CONGÉNITAS/HEREDITÁRIAS

As trombocitopenias hereditárias constituem um grupo heterogéneo de doenças raras que ocorrem em indivíduos com mutações genéticas, responsáveis por uma redução sustentada de plaquetas, associada com disfunção plaquetária. Quando existe um histórico familiar de hemorragia persistente e trombocitopenias inexplicáveis na infância deve ser considerada a possibilidade de uma trombocitopenia hereditária [30]. São descritas, de seguida, algumas das trombocitopenias congénitas mais frequentemente identificadas na prática clínica.

- *Síndrome de Bernard-Soulier*

A Síndrome de Bernard-Soulier (SBS) corresponde a uma doença plaquetária hereditária com carácter autossómico recessivo, caracterizada por disfunção plaquetária, trombocitopenia variável, com plaquetas de tamanho aumentado, e tempo de hemorragia alargado [31].

Tabela 2. Classificação fisiopatológica das trombocitopenias

Trombocitopenias congénitas/hereditárias	
Síndrome de Bernard-Soulier Trombocitopenias relacionadas ao gene <i>MYH9</i> Síndrome de Wiskott-Aldrich	
Trombocitopenias adquiridas	
Produção diminuída de plaquetas na MO	- Neoplasias (infiltração neoplásica medular) - Trombocitopenia induzida por xenobióticos - Infecções (CMV, EBV, HCV, HIV) - Deficiências nutricionais (vitamina B ₁₂ e/ou folatos)
Aumento da clearance de plaquetas no sangue periférico	CAUSA IMUNOLÓGICA - Púrpura trombocitopénica imune - Púrpura pós-transfusional - Trombocitopenia induzida por xenobióticos - Infecções (CMV, EBV, HCV, HIV, <i>Plasmodium falciparum</i>) - Trombocitopenia induzida pela heparina - Púrpura trombocitopénica trombótica
	CAUSA NÃO IMUNOLÓGICA - Trombocitopenia induzida por xenobióticos - Infecções (CMV, EBV, HCV, HIV, <i>Plasmodium falciparum</i>) - Púrpura trombocitopénica trombótica - Síndrome hemolítico urémico - Coagulação intravascular disseminada
Distribuição anormal das plaquetas	- Esplenomegalia
Diluição plaquetária	- Trombocitopenia gestacional
Trombocitopenias artificiais	
Pseudotrombocitopenia	- Agregação plaquetária na presença de EDTA - Satelitismo plaquetário na presença de EDTA - Plaquetas gigantes - Erros pré-analíticos

Abreviaturas: CMV, citomegalovírus; EBV, vírus Epstein-Barr; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; HCV, vírus da hepatite C; HIV, vírus da imunodeficiência humana.

Mecanismo fisiopatológico

A membrana das plaquetas contém recetores glicoproteicos específicos que possuem um papel importante na adesão, ativação e agregação plaquetária. Em condições fisiológicas, o complexo membranal plaquetário glicoproteína (GP) Ib/IX/V é responsável pela adesão plaquetária ao subendotélio exposto após lesão vascular, através da sua interação com o Fator de von Willebrand (FvW) [31, 32].

As plaquetas dos indivíduos que sofrem de SBS carecem deste complexo ou possuem um recetor disfuncional, de que resulta uma grave disfunção plaquetária por fraca adesão das plaquetas ao subendotélio. As plaquetas disfuncionais podem resultar de mutações nos genes que codificam para a síntese de GPIb- α , GPIb- β , GPV ou GPIX [29, 31, 32].

A causa de trombocitopenia nesta doença ainda não é clara, mas alguns estudos sugerem a existência de uma trombocitopoiese ineficaz, devido à dinâmica alterada do citoesqueleto celular durante a formação das plaquetas, uma vez que o complexo GPIb/IX/V está associado ao citoesqueleto membranal plaquetário [3, 33].

Manifestações clínicas e achados laboratoriais

A SBS manifesta-se geralmente na infância, com sintomas de hemorragia, principalmente a nível cutâneo (petéquias, púrpura e/ou equimoses) e das mucosas (gengivorragia e epistaxe). A gravidade das hemorragias varia muito de doente para doente; como sintomas tardios poderão observar-se hemorragias gastrointestinais e menorragia [32].

Os doentes apresentam uma trombocitopenia ligeira a severa, com uma contagem de plaquetas que pode variar entre $30 - 200 \times 10^9$ plaquetas/L. Na avaliação do esfregaço sanguíneo é possível observar alterações da morfologia plaquetária, como anisocitose e plaquetas de grandes dimensões [31].

Em estudos de agregação plaquetária *in vitro* observa-se uma deficiente agregação plaquetária na presença do agonista ristocetina, que não é corrigida pela adição de plasma normal; estes testes permitem a distinção entre SBS e a doença de von Willebrand. Pode ainda utilizar-se a citometria de fluxo para estudar/confirmar os defeitos no complexo membranal GPIb/IX/V, utilizando anticorpos específicos contra os antígenos plaquetários; em caso de doença verifica-se uma redução ou deficiência nalguma das GP anteriormente mencionadas [31].

- Trombocitopenias relacionadas com o gene MYH9

As trombocitopenias relacionadas com o gene *MYH9* correspondem a doenças de carácter autossómico dominante, sendo uma das formas de trombocitopenia congénita encontrada

mais frequentemente na prática clínica, incluindo Síndrome de Sebastian, Anomalia de May-Hegglin, Síndrome de Alport, Síndrome de Epstein e Síndrome de Fechtner [34].

Mecanismo fisiopatológico

Estas trombocitopenias resultam de mutações no gene *MYH9*, que em situações normais codifica a cadeia pesada da miosina não muscular da classe IIA, que corresponde a uma proteína contrátil existente ao nível do citoesqueleto dos megacariócitos, plaquetas e neutrófilos [24, 35].

As mutações neste gene destabilizam a estrutura hexamérica da proteína ou a sua interação com outras proteínas, resultando numa deficiente maturação dos megacariócitos com produção de plaquetas de grandes dimensões e trombocitopenia, por trombocitopoiese ineficaz [35].

Manifestações clínicas e achados laboratoriais

Esta patologia apresenta um amplo espectro de características clínicas, manifestando-se geralmente na infância, associada a uma macrotrombocitopenia moderada a severa ($10 - 100 \times 10^9$ plaquetas/L), com um risco de hemorragia que varia amplamente entre os diferentes indivíduos e que aparece relacionado com o valor de plaquetas. No esfregaço de sangue periférico é possível observar plaquetas gigantes, inclusões citoplasmáticas leucocíticas (tipo corpos de *Döhle*) e um grau extremo de macrocitose plaquetária (tamanho médio das plaquetas > 20 fL), muito mais marcada que noutras formas de macrotrombocitopenia hereditária e trombocitopenias autoimunes [24, 29].

Os sintomas e/ou sinais físicos incluem equimoses, menorragia, epistaxe e/ou sangramento gengival, existindo o risco de os doentes desenvolverem também nefropatia progressiva durante a infância ou na vida adulta, surdez neurosensorial e/ou cataratas [34, 35].

- Síndrome Wiskott-Aldrich

A Síndrome Wiskott-Aldrich (WAS) é uma doença recessiva severa e complexa, ligada ao cromossoma X, causada por diferentes mutações no gene que codifica para a proteína WAS (WASp) presente em células hematopoiéticas, independentemente do seu estadio de diferenciação. É caracterizada por microtrombocitopenia, associada frequentemente a eczema e imunodeficiência, com infeções recorrentes [36].

Mecanismo fisiopatológico

A proteína WAS possui ao nível das células hematopoiéticas, e em condições fisiológicas, um papel essencial na transdução de sinais a partir da superfície celular até ao

citoesqueleto de actina. Assim, esta proteína regula a reorganização do citoesqueleto através do recrutamento e localização das proteínas estruturais, para além de atuar no processo de desenvolvimento e ativação celular, por regulação das sinapses imunológicas. A WASp possui um papel essencial no desenvolvimento e na ativação dos linfócitos, bem como no processo quimiotático e de fagocitose, que ocorre durante uma resposta imune [36, 37].

Um doente com ausência ou redução quantitativa da WASp, possui linfócitos com uma morfologia anormal impossibilitando a formação das sinapses imunológicas, de que resulta uma ativação transcripcional e proliferação celular inadequada, que conduz a uma resposta imunitária deficiente, característica deste síndrome [38].

Manifestações clínicas e achados laboratoriais

As mutações identificadas neste gene originam diferentes manifestações clínicas, que vão desde a trombocitopenia moderada ligada ao cromossoma X (XLT), sem manifestações de imunodeficiência, até ao clássico fenótipo do WAS, caracterizado por microtrombocitopenia, eczema, petéquias, púrpura e/ou equimoses, infeções recorrentes devido à presença de imunodeficiência, e um aumento da incidência das manifestações de doenças autoimunes e neoplasias [36].

TROMBOCITOPENIAS ADQUIRIDAS

PRODUÇÃO DIMINUÍDA E/OU DESTRUIÇÃO AUMENTADA DE PLAQUETAS

As trombocitopenias adquiridas podem surgir devido a defeitos na produção de plaquetas a nível da MO (trombocitopoiese ineficaz, diminuição na produção de precursores megacariocíticos, regulação anormal da trombocitopoiese) ou devido a uma *clearance* periférica aumentada de plaquetas, que pode ou não ter uma origem imunológica [24]. Dependendo do agente químico/biológico em causa, a trombocitopenia pode resultar tanto de uma diminuída produção de plaquetas, como de uma destruição plaquetária aumentada; é o caso das trombocitopenias induzidas por xenobióticos e aquelas causadas por infeções víricas [39].

- Trombocitopenia induzida por xenobióticos

A trombocitopenia induzida por determinados xenobióticos é uma patologia relativamente comum, caracterizada por uma trombocitopenia aguda, que pode ser moderada a severa, por vezes com um número de plaquetas inferior a $10 \times 10^9/L$, com sinais de hemorragia espontânea de variados graus de severidade, que incluem desde petéquias, púrpura e/ou equimoses, até hemorragias intracranianas graves, que podem colocar o doente em risco

de vida. São vários os mecanismos fisiopatológicos que podem conduzir a este tipo de trombocitopenia [39].

Mecanismos fisiopatológicos

Os compostos quimioterápicos citotóxicos e o etanol, podem causar mielossupressão, por inibirem diretamente a produção e maturação dos megacariócitos na MO e, por vezes, também a das restantes linhagens celulares, conduzindo a pancitopenia. Podem também induzir uma plaquetopenia periférica, por atuarem diretamente sobre as plaquetas circulantes, determinando uma diminuição do seu tempo de semivida, sem existir comprometimento da MO [40]. Existem, ainda, xenobióticos que podem induzir uma trombocitopenia imune; uma rápida diminuição do número circulante de plaquetas após administração de um xenobiótico é sugestiva do desenvolvimento de um processo autoimune. O xenobiótico pode funcionar como hapteno, ligando-se à membrana das plaquetas e desencadeando uma resposta imune, com produção de anticorpos que se ligam ao complexo plaqueta/xenobiótico, promovendo a remoção da plaqueta. O xenobiótico pode também induzir a exposição de um novo epítipo na membrana da plaqueta, desencadeando a produção de anticorpos contra o novo antígeno expresso na superfície plaquetária. Os anticorpos são habitualmente dirigidos contra as GP da membrana plaquetária, GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V e/ou molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM)-1.

O abciximab, o eptifibatide e o tirofiban, frequentemente utilizados após angioplastia coronária para reduzir o risco trombótico, podem induzir trombocitopenia, aparentemente através de um mecanismo de produção de anticorpos naturais contra um novo epítipo expresso na superfície das plaquetas, induzido pelo composto [23, 39, 41].

Na avaliação da história clínica de um doente com trombocitopenia, deve ter-se sempre em conta o seu histórico de medicação completo, incluindo fármacos recentemente adicionados a essa lista, bem como o possível contacto com outros agentes físicos, químicos ou biológicos. O diagnóstico deste tipo de trombocitopenia é essencialmente empírico, baseando-se geralmente na recuperação do número de plaquetas após a descontinuação do xenobiótico suspeito [28].

- Trombocitopenia induzida por infeções víricas

É frequente encontrar-se uma trombocitopenia transitória, no seguimento de determinadas infeções víricas, incluindo as infeções pelo citomegalovírus (CMV), vírus da hepatite C (HCV), vírus Epstein-Barr (EBV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esta trombocitopenia induzida por diferentes vírus é multifatorial, e os mecanismos subjacentes

à diminuição do número de plaquetas circulantes difere, de acordo com o agente etiológico em causa [42].

Mecanismos fisiopatológicos

Os agentes víricos podem causar trombocitopenia através da diminuição da produção de plaquetas a nível da MO por: i) infetarem os precursores megacariocíticos, o que pode conduzir à sua apoptose ou à diminuição da sua maturação, proliferação e expressão do recetor da TPO; ii) infetarem as SCH e as células do estroma da MO, de que pode resultar uma produção deficiente das CFU-MK, devido à produção alterada de citocinas pelas células infetadas na MO; iii) influenciarem de forma indireta a produção de plaquetas, pela produção aumentada de interferão (IFN) α/β que suprime a formação das plaquetas; iv) por regularem negativamente a função hepática, incluindo a produção do fator de crescimento e desenvolvimento dos megacariócitos (TPO).

Outro mecanismo pelo qual os vírus podem causar trombocitopenia é por aumento da destruição periférica das plaquetas, devido a: i) citotoxicidade direta do vírus sobre as plaquetas circulantes, induzindo a sua apoptose e posterior lise; ii) estimulação da produção de autoanticorpos não específicos que causam a destruição plaquetária; iii) reconhecimento, pelo recetor Fc γ RII presente nas plaquetas, de imunocomplexos constituídos por antígenos virais e imunoglobulinas (Ig)G, de que resulta a sua rápida remoção, por fagocitose macrófagica no fígado ou no baço; iv) ou devido a pressão alterada da veia portal e sequestração aumentada de plaquetas, em consequência da dilatação do baço [42-44].

- *Púrpura trombocitopénica imune*

A púrpura trombocitopénica imune (PTI) é uma doença autoimune adquirida, relativamente frequente nos adultos, que se caracteriza pelo aumento da destruição das plaquetas, mediada por autoanticorpos dirigidos contra proteínas da membrana plaquetária, e por uma deficiente produção de plaquetas a nível da MO, causando uma diminuição no número de plaquetas circulantes, com aumento do risco de hemorragias. Pode ser classificada de acordo com a idade do doente, em infantil ou adulta e, de acordo com o tempo de evolução, como aguda ou crónica [45, 46].

Na maior parte dos casos a PTI é idiopática, podendo no entanto encontrar-se associada a patologias secundárias, incluindo determinadas doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistémico (LES), doença de Graves), doenças linfoproliferativas (leucemia linfóide crónica (LLC), linfoma de Hodgkin) e infeções (HIV, *Helicobacter pylori*, CMV, EBV) [28, 45].

Mecanismo fisiopatológico

Apesar da etiologia que desencadeia a formação de anticorpos antiplaquetários na PTI não ser ainda muito clara, o mecanismo fisiopatológico de formação de anticorpos que conduz à destruição de plaquetas e à supressão da produção plaquetária encontra-se bem descrito [46].

A maioria dos doentes com PTI, no momento em que a doença se torna clinicamente evidente, possui anticorpos antiplaquetários, geralmente IgG, contra diferentes GP constituintes dos complexos GPIIb/IIIa e GPIb/IX. No entanto, alguns estudos indicam que inicialmente existem apenas anticorpos contra o complexo plaquetário GPIIb/IIIa, sendo os anticorpos que reconhecem o complexo GPIb/IX produzidos posteriormente [45].

As plaquetas, uma vez revestidas por anticorpos, são reconhecidas através de recetores Fcγ presentes à superfície de células apresentadoras de antígenos (CAA), como macrófagos e células dendríticas. Após internalização das plaquetas, as GP plaquetárias são degradadas em péptidos e expressas à superfície das CAA através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II. Estas células produzem ainda epítomos crípticos de outras GP plaquetárias, como GPIb/IX, amplificando a resposta imune inicialmente desenvolvida.

Os recetores das células T (TCR) presentes nas células T *helper* (Th) reconhecem os péptidos apresentados no complexo MHC II, que em conjunto com interações coestimulatórias conduzem à sua ativação. Estas células ativadas produzem diversas citocinas, como a IL-2 e o IFN-γ, promovendo a diferenciação das células B e a produção de autoanticorpos plaquetários específicos. São estes anticorpos que vão opsonizar as plaquetas, que são internalizadas e destruídas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial. Estes anticorpos ligam-se ainda, aos megacariócitos presentes na MO, inibindo a sua maturação e a produção plaquetária. Uma via alternativa da destruição plaquetária parece ser mediada por células T citotóxicas (Tc) autoreativas (figura 6) [45-47].

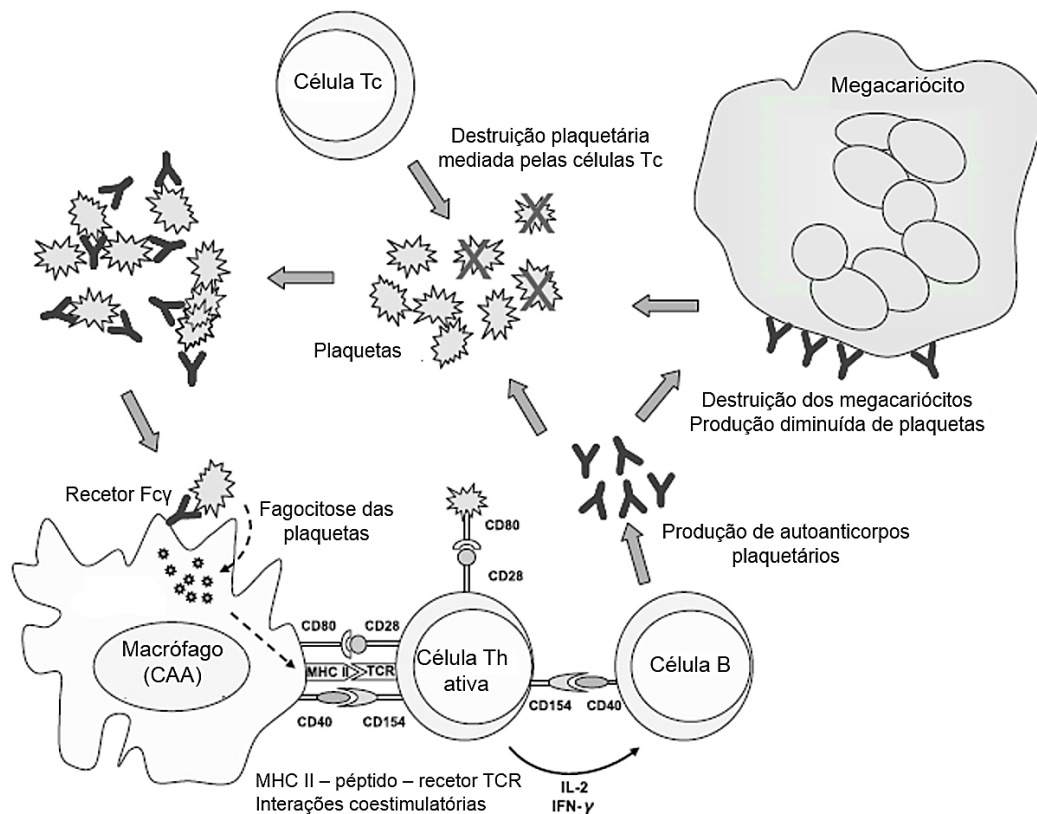


Figura 6. Mecanismo fisiopatológico de produção de anticorpos antiplaquetários na púrpura trombocitopénica imune.

Abreviaturas: CAA, células apresentadoras de antígenos; IFN, interferão; IL, interleucina; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; Tc, T citotóxica; TCR, receptor das células T; Th, T helper (Figura adaptada de Stasi R, et al. [47]).

Manifestações clínicas

A apresentação clínica e a evolução da PTI em crianças e adultos são notavelmente diferentes. Durante a infância, esta doença apresenta-se frequentemente sob a forma aguda, com início súbito e aparecimento de petéquias, púrpura e/ou equimoses; ocorre, geralmente, 2 a 3 semanas após uma infeção viral ou imunização, o que sugere uma reação cruzada entre os antígenos virais e os plaquetários. Em mais de 70% das crianças, a doença é autolimitada e resolve-se de forma espontânea. Suspeita-se com alguma frequência desta patologia quando existe referência a vacinas, casos de varicela ou mononucleose infecciosa [45, 47].

Pelo contrário, a PTI nos adultos é caracterizada por um aparecimento insidioso que evolui geralmente para uma forma crónica, com recaídas frequentes, apresentando-se relativamente resistente à maioria dos tratamentos existentes. Os sintomas e sinais clínicos são variáveis de pessoa para pessoa, podendo os doentes ser completamente assintomáticos, diagnosticados acidentalmente durante a realização de análises de rotina,

ou apresentarem uma instalação abrupta da doença, com hemorragias mucocutâneas (petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia e menorragia) gastrointestinais e intracranianas graves. A PTI é frequente nos adultos com LES, HIV, LLC, linfoma de Hodgkin ou anemia hemolítica autoimune [46].

Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico desta patologia continua a ser realizado por exclusão de outras patologias com trombocitopenia associada, sendo baseado inicialmente na história clínica do doente, exame físico, hemograma completo e observação do esfregaço sanguíneo.

A contagem plaquetária está significativamente diminuída, geralmente isolada, com valores compreendidos entre $10 - 100 \times 10^9$ plaquetas/L. O esfregaço sanguíneo confirma o baixo valor de plaquetas, sendo frequente detetar, ainda, anisocitose plaquetária e plaquetas gigantes, não se observando, habitualmente, alterações nas restantes linhagens celulares. Quando efetuado um mielograma, observa-se um número normal ou ligeiramente aumentado de megacariócitos [46].

Eventualmente, pode observar-se associada à PTI uma anemia hemolítica autoimune, sendo esta combinação referida como Síndrome de Evans [22].

- Trombocitopenia induzida pela heparina

A trombocitopenia induzida pela heparina (TIH) é uma complicação pouco frequente, que pode ocorrer em resposta à terapia anticoagulante com heparina não fracionada, heparina de baixo peso molecular ou outros polianióes. Corresponde a uma reação imuno-mediada, que se desenvolve após ativação plaquetária *in vivo*, por ligação de anticorpos IgG que reconhecem o complexo heparina/proteína, habitualmente o fator plaquetário (FP) 4 [48, 49].

Paradoxalmente, a trombocitopenia que resulta do tratamento com este anticoagulante, manifesta-se não com episódios hemorrágicos, mas sim através de um estado pró-trombótico, que pode pôr em risco a vida do doente, envolvendo veias, artérias e a microvasculatura [50].

Mecanismo fisiopatológico

A TIH desenvolve-se cerca de 5 a 10 dias após o tratamento com heparina, através da produção de anticorpos do tipo IgG que reconhecem os locais conformacionalmente alterados no FP4 (“neoepítomos”), após ligação deste à heparina. O complexo imunológico resultante liga-se a recetores plaquetários Fcγ (FcγRIIa), determinando a ativação, agregação e secreção plaquetária, que, por sua vez, conduz à libertação de micropartículas pró-coagulantes derivadas das plaquetas, que aceleram a produção de trombina. Para

além disso, ocorre também a neutralização do efeito anticoagulante da heparina, pela liberação de mais FP4 pelas plaquetas ativadas.

O complexo imunológico heparina/FP4/IgG tem, ainda, a capacidade de se ligar a recetores específicos nos monócitos (FcγRI) e, diretamente, às células endoteliais, induzindo a sua ativação e consequente produção de FT, intensificando a produção de trombina (figura 7) [49, 51].

Em consequência da produção exagerada de trombina existe um risco aumentado de trombose venosa e/ou arterial [51].

Devido à ativação plaquetária excessiva causada por este complexo imunológico, uma grande quantidade de plaquetas é removida da circulação, resultando numa trombocitopenia geralmente moderada, em que os doentes evidenciam uma redução de cerca de 50% na sua contagem de plaquetas [23].

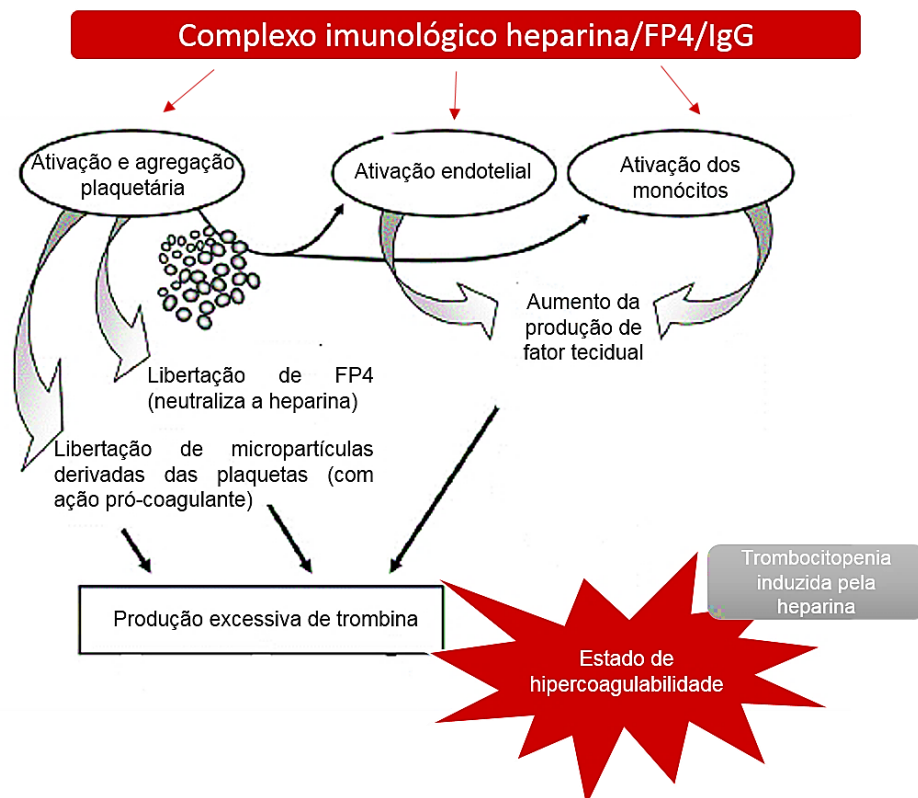


Figura 7. Mecanismo fisiopatológico subjacente à trombocitopenia induzida pela heparina. Abreviaturas: FP4, fator plaquetário 4; Ig, imunoglobulina (Figura adaptada de Warkentin TE. [49]).

Manifestações clínicas

A TIH raramente é sintomática, uma vez que na maior parte dos casos é identificada e tratada precocemente. Acresce que a diminuição do número de plaquetas circulantes não chega a ser muito significativa, não estando assim habitualmente associada a situações hemorrágicas.

O risco principal é o desenvolvimento de um estado pró-trombótico e as suas consequências, que incluem tromboembolismo venoso, trombose arterial, AVC trombótico, reação anafilática e pele necrótica junto ao local da injeção de heparina, ocorrendo em cerca de 20 a 50% dos doentes com TIH [49, 52].

Diagnóstico clínico e laboratorial

A avaliação de um doente com suspeita de TIH não é fácil e requer uma avaliação complexa, que inclua o histórico de tratamento farmacológico e os resultados laboratoriais. A suspeita surge quando um doente apresenta uma trombocitopenia recente, que se desenvolveu após exposição à heparina [24].

Como se trata de uma emergência clínica, o diagnóstico deve realizar-se o mais rapidamente possível, sendo muitas vezes realizado apenas com os achados clínicos [23]. Assim, a avaliação inicial utiliza um sistema de *score* clínico, que tem em conta o tempo ocorrido entre o tratamento com heparina e a diminuição do número de plaquetas circulantes, o grau de trombocitopenia, a presença de trombose ou de outros sintomas clínicos de TIH, e a presença de outras causas de trombocitopenia.

Nos doentes com forte suspeita de TIH, deve ser descontinuada a terapia com heparina e substituída por outro anticoagulante, até estarem disponíveis os resultados para o diagnóstico, que incluem a demonstração *in vitro* da presença de anticorpos anti-complexo heparina/FP4 [23, 48, 49, 52].

- Púrpura pós-transfusional

A púrpura pós-transfusional (PPT) corresponde a uma complicação aloimune rara e severa, que pode ser fatal por não ser detetada de forma precoce (aproximadamente em 10 a 20% dos casos de PPT) [53].

É caracterizada por trombocitopenia grave, com diminuição súbita do número de plaquetas para valores inferiores a 15×10^9 plaquetas/L, que ocorre, geralmente, 7 a 14 dias após a realização da transfusão de produtos sanguíneos [53, 54].

Mecanismo fisiopatológico

Os indivíduos afetados produzem aloanticorpos contra antígenos plaquetários humanos (HPA) específicos, principalmente HPA-1a, presentes nas plaquetas do sangue transfundido; estes aloanticorpos levam à destruição, paradoxalmente, das plaquetas do próprio doente; o mecanismo fisiopatológico associado à destruição das próprias plaquetas permanece por esclarecer [55].

Sabe-se que o doente que é HPA-1a negativo pode ficar imunizado quando é exposto pela primeira vez a plaquetas HPA-1a positivas; quando reexposto a esse antígeno, pode desencadear-se uma trombocitopenia profunda, devido à destruição imuno-mediada das próprias plaquetas. A maioria dos casos surge em mulheres HPA-1a negativas com história de pré-exposição a antígenos HPA-1a, durante uma gravidez anterior, com plaquetas fetais HPA-1a positivas, ou por transfusão sanguínea prévia com plaquetas do dador positivas para este antígeno [22, 56].

Diagnóstico clínico e laboratorial

Para a realização do correto diagnóstico de uma situação de PPT é necessário ter em conta a história de transfusões sanguíneas e gestações, o tempo decorrido entre a transfusão e o aparecimento de trombocitopenia e o seu grau de severidade. A confirmação final do diagnóstico é feita com a deteção e identificação genotípica dos anticorpos anti-HPA presentes no sangue do doente [53].

- *Púrpura trombocitopénica trombótica*

A púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) é uma doença rara, que pode afetar ambos os géneros, e é causada por uma deficiência adquirida ou congénita da metaloprotease plasmática que cliva o FvW (ADAMTS-13). Desta deficiência resulta, portanto, a acumulação de multímeros do FvW, que induzem a agregação plaquetária espontânea intravascular, com formação de microtrombos, que podem determinar a oclusão de arteríolas e capilares da microcirculação. Em paralelo, desenvolve-se uma trombocitopenia acentuada, por aprisionamento de plaquetas nos microtrombos formados [22].

Mecanismo fisiopatológico

O FvW é uma proteína multimérica libertada pelos grânulos α das plaquetas e pelos corpos Weibel-Palade das células endoteliais, que intervém na adesão e agregação das plaquetas ao endotélio ativado ou lesado, sendo o seu tamanho regulado pela metaloprotease ADAMTS-13 [24].

Em condições fisiológicas, as plaquetas circulantes aderem transitoriamente, através do recetor GPIIb, aos multímeros do FvW que se encontram expostos e ancorados ao endotélio intacto ou ao tecido conjuntivo exposto, após a sua libertação pelas células endoteliais ativadas/lesadas. Esta adesão é acompanhada pela ligação de outras moléculas de adesão e de sinalização que auxiliam na ativação plaquetária e na sua propagação. Sob a influência da tensão criada pela corrente sanguínea, os grandes multímeros do FvW são reconhecidos pela enzima ADAMTS-13, que os cliva em

subunidades menores, diminuindo a sua capacidade de induzir a adesão e agregação plaquetária, limitando desta forma a formação do trombo plaquetário [57].

Em casos de PTT, a clivagem dos grandes multímeros do FvW encontra-se comprometida, devido à existência de uma deficiência qualitativa ou quantitativa da enzima ADAMTS-13, como resultado da mutação no gene responsável pela sua síntese ou da presença de autoanticorpos inibidores. A acumulação de multímeros do FvW induz uma adesão espontânea e subsequente agregação das plaquetas circulantes, com posterior formação de microtrombos na circulação sanguínea causando isquemia tecidual (figura 8) [58].

PTT congénita

A PTT congénita tem um curso crónico, com episódios recorrentes de trombocitopenia e corresponde à forma menos comum da doença. Surge em consequência de uma das diferentes mutações descritas no gene *ADAMTS13*, que conduz a uma deficiência qualitativa e/ou quantitativa da enzima responsável pela clivagem dos grandes multímeros do FvW. Estes doentes apresentam níveis plasmáticos de ADAMTS-13 muito diminuídos, em conjunto com uma redução da atividade enzimática (atividade <5%) e ausência de anticorpos anti-ADAMTS-13 [59].

PTT adquirida

A PTT adquirida é a forma mais comum da doença, sendo considerada uma patologia autoimune que se manifesta de forma abrupta e severa, ocasionalmente após um episódio febril; caracteriza-se pelo desenvolvimento de autoanticorpos neutralizantes, principalmente IgG, que reconhecem a metaloprotease ADAMTS-13, inibindo a sua atividade. Estes autoanticorpos podem desenvolver-se idiopaticamente ou podem surgir na sequência de determinadas patologias, como infeções, doenças autoimunes e, ainda, por ação de determinados xenobióticos. Estes doentes apresentam um título de anticorpos anti-ADAMTS-13 muito elevado, em conjunto com uma redução da atividade da metaloprotease (atividade <10%) [59, 60].

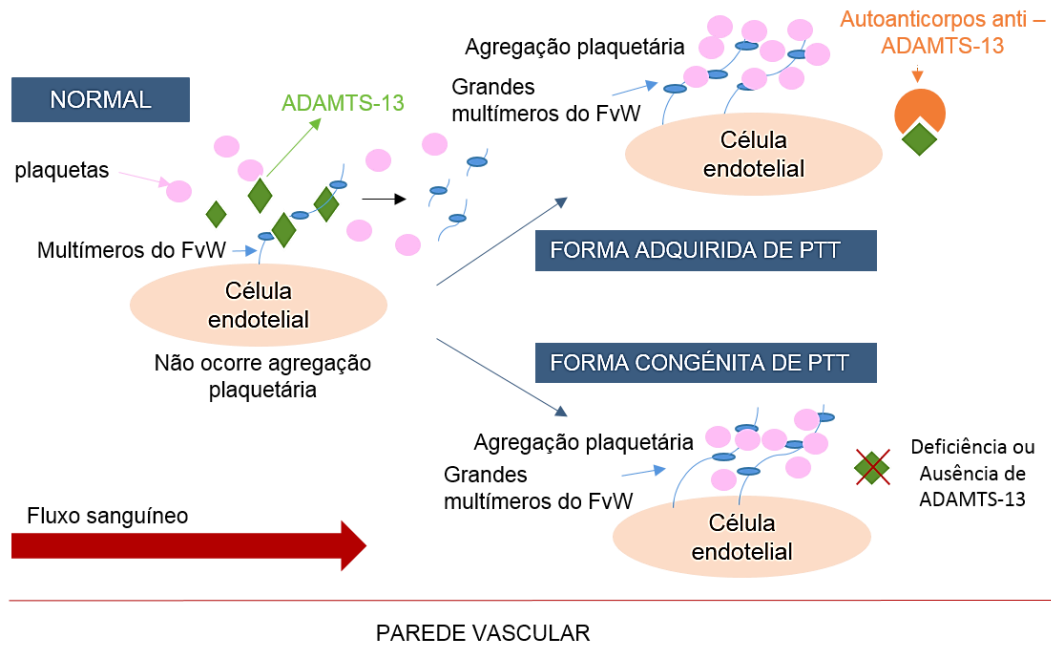


Figura 8. Mecanismo fisiopatológico subjacente à púrpura trombocitopénica trombótica.

Abreviaturas: ADAMTS-13, metaloprotease plasmática que cliva o Fator de von Willebrand; FvW, fator de von Willebrand; PTT, púrpura trombocitopénica trombótica.

Manifestações clínicas e achados laboratoriais

A presença de PTT resulta num quadro característico de anemia hemolítica microangiopática, por fragmentação mecânica dos glóbulos vermelhos (GV) induzida por passagem destes pelos microvasos parcialmente ocluídos; a trombocitopenia é acentuada, geralmente entre $10 - 30 \times 10^9$ plaquetas/L, devido à sequestração aumentada de plaquetas nos microtrombos vasculares, com aparecimento de petéquias, púrpura e/ou equimoses; pode ainda associar febre, fraqueza e sintomas decorrentes de isquemia, incluindo alterações neurológicas (cefaleias, fadiga, confusão mental, convulsões e coma) e disfunção renal com proteinúria e hematúria. A insuficiência renal grave, com anúria e uremia excessiva é atípica na PTT [57, 60, 61].

Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico diferencial de PTT é realizado por exclusão de outras causas de trombocitopenia, associando a história clínica completa do doente, exame físico, estudos laboratoriais e a observação do esfregaço de sangue periférico [59].

No esfregaço sanguíneo é possível observar sinais de anemia hemolítica microangiopática, tais como, GV fragmentados, anisocitose eritrocitária e GV policromatófilos, para além de uma trombocitopenia intensa, confirmada pela contagem de plaquetas. É frequente encontrar níveis séricos extremamente elevados de lactato desidrogenase (LDH), em consequência da hemólise eritrocitária e da libertação da enzima pelos tecidos isquémicos

ou necróticos. Os níveis de bilirrubina indireta e o número de reticulócitos aumentam, o que é também característico de uma anemia hemolítica [58].

Os valores das provas de coagulação, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), estão compreendidos dentro dos valores de referência e a prova de Coombs direta é negativa, permitindo a sua distinção relativamente à coagulação intravascular disseminada (CID) e ao Síndrome de Evans, respetivamente [22, 59]. A PTT deve ainda ser diferenciada do Síndrome hemolítico urémico (SHU), que se caracteriza também por anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, mas com predominância do quadro renal, que evolui frequentemente para insuficiência renal, o que normalmente não acontece na PTT. Para além disso, o SHU está muitas vezes associado a infeções bacterianas, principalmente por *Escherichia coli* e *Shigella* spp., em que há produção de determinadas toxinas que se ligam às células endoteliais renais, comprometendo a sua função [60].

Para confirmação do diagnóstico de PTT, devem realizar-se ensaios de atividade da enzima ADAMTS-13, assim como ensaios para deteção e determinação dos níveis de ADAMTS-13 e de anticorpos anti-ADAMTS-13, úteis não só para confirmação do diagnóstico, mas também para a distinção entre a forma hereditária e adquirida da doença [61].

- Coagulação intravascular disseminada

A CID refere-se a um severo e complexo síndrome trombohemorrágico, na qual ocorre uma excessiva coagulação intravascular com formação difusa e generalizada de microtrombos, que comprometem a perfusão adequada, contribuindo para a falência de múltiplos órgãos. Em simultâneo, a inativação e o consumo excessivo de plaquetas e de fatores da coagulação causam, paradoxalmente, a ocorrência de hemorragias, consequência da trombocitopenia e disfunção plaquetária [62-64].

A CID não corresponde a uma doença primária específica, mas sim a uma complicação secundária associada a várias patologias, incluindo doenças neoplásicas, trauma severo, patologias vasculares, doenças autoimunes, septicemia e outras infeções graves [65].

Mecanismos fisiopatológicos

Em condições patológicas que conduzem ao aparecimento de CID, há produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6, IL-1 e TNF (fator de necrose tumoral), pelas células mononucleares ativadas e pelas células endoteliais lesadas. Estas citocinas são responsáveis pela estimulação da expressão do FT pelas células endoteliais,

permitindo em conjunto com o fator VII ativado (FVIIa), a ativação da via extrínseca do processo de coagulação [64].

Simultaneamente, ocorre uma disfunção dos mecanismos fisiológicos anticoagulantes, por inibição dos anticoagulantes naturais, como a antitrombina e a proteína C, de que resulta uma amplificação da produção de trombina. Ocorre, ainda, uma deficiente remoção de fibrina em consequência da supressão do sistema fibrinolítico, devido à liberação do inibidor da ativação do plasminogénio (PAI)-1 pelas células endoteliais ativadas. A produção e deposição excessiva de fibrina resultante das alterações destes mecanismos, leva à formação de múltiplos microtrombos na microcirculação, conduzindo a isquemia tecidual e necrose em órgãos vitais. Durante esta fase de coagulação intravascular excessiva, ocorre ainda a inativação e o consumo aumentado de fatores de coagulação e de plaquetas, originando disfunção plaquetária e trombocitopenia [65].

O sistema fibrinolítico é posteriormente ativado, devido à produção aumentada de trombina, resultante do processo de coagulação excessivo, que atua na produção de plasmina a partir de plasminogénio. A plasmina degrada a fibrina do coágulo sanguíneo, com libertação dos produtos de degradação da fibrina (PDF) [62, 64].

Assim, em conjunto, estes mecanismos fisiopatológicos explicam a ocorrência simultânea de eventos trombóticos e hemorrágicos nesta patologia (figura 9) [64].

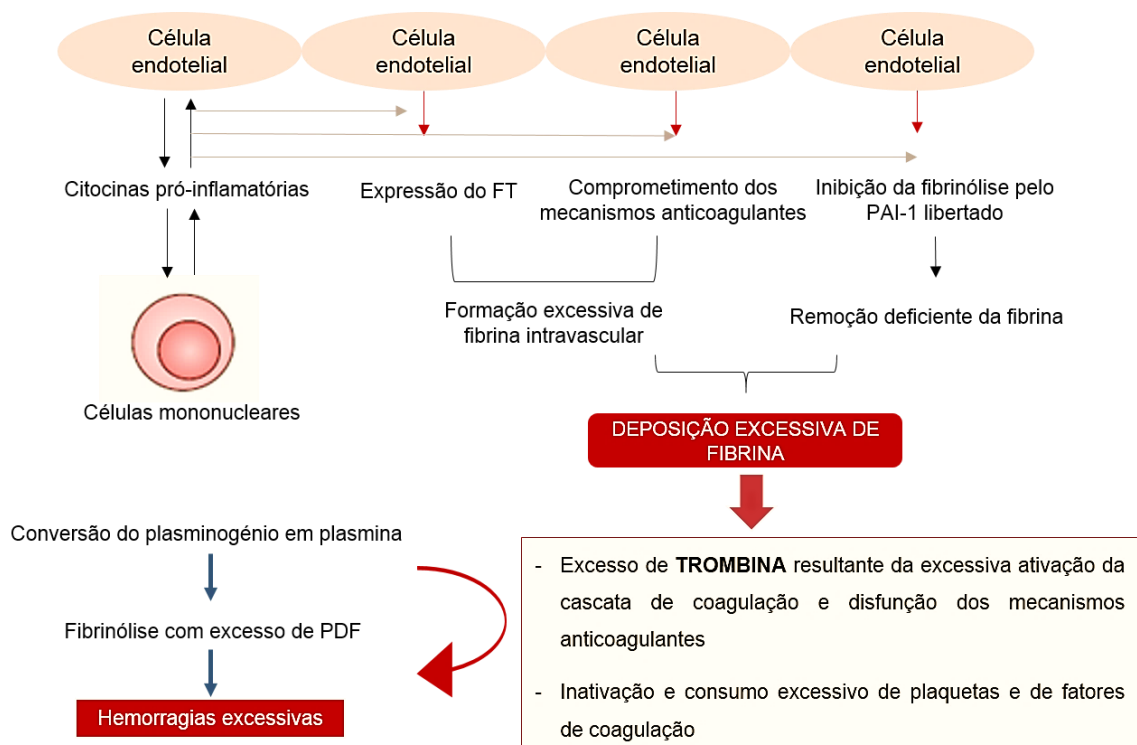


Figura 9. Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à coagulação intravascular disseminada. Abreviaturas: FT, fator tecidual; PAI, inibidor da ativação do plasminogénio; PDF, produtos de degradação da fibrina (Figura adaptada de Levi M. [65]).

Manifestações clínicas

Em doentes com uma forma severa de CID é possível observar a presença paradoxal, simultânea, de manifestações trombóticas e hemorrágicas. Assim, os principais sintomas e/ou sinais clínicos incluem essencialmente a presença de isquemia e necrose tecidual, disfunção de múltiplos órgãos, anemia hemolítica microangiopática, hemorragias mucocutâneas (incluindo petéquias, púrpura, equimoses e/ou epistaxe) e hemorragias a nível do trato gastrointestinal e cerebral [65].

Diagnóstico clínico e laboratorial

Não existe um teste laboratorial específico para o diagnóstico exato e preciso de CID. A realização do diagnóstico definitivo de CID corresponde a um processo complexo, que é baseado na história clínica do doente (conhecimento e identificação de possíveis patologias subjacentes associadas à CID), exame físico completo, testes laboratoriais, incluindo o hemograma, com observação do esfregaço de sangue periférico [65].

São vários os achados hematológicos não específicos que auxiliam no diagnóstico presuntivo de CID, incluindo a presença de anemia hemolítica microangiopática, com níveis de LDH aumentados, associada à presença de esquistócitos, anisocitose plaquetária e trombocitopenia acentuada [64].

Para além disso, devido ao excessivo consumo dos fatores de coagulação, observa-se um prolongamento do TP e do TTPa, verificando-se também um aumento dos níveis dos PDF e D-dímeros, ao contrário do que acontece na PTT, permitindo deste modo a realização do diagnóstico diferencial entre ambas as patologias [22, 24].

DISTRIBUIÇÃO ANORMAL DE PLAQUETAS

- *Esplenomegalia*

A trombocitopenia é uma complicação comum em indivíduos portadores de doença hepática crónica com hipertensão portal e cirrose extensiva, em consequência da esplenomegalia normalmente associada a esta patologia [22, 66].

Em resultado do aumento do volume do baço, ocorre uma maior sequestração dos elementos plaquetários presentes na circulação sanguínea e, por consequência, o número de plaquetas circulantes diminui. Para além disso, dados recentes indicam que o mecanismo de trombocitopenia associado à doença hepática, também se deve a uma diminuição da produção plaquetária a nível da MO em consequência da menor produção de TPO pelo fígado lesado [66].

DILUIÇÃO PLAQUETÁRIA

- Trombocitopenia gestacional

A trombocitopenia gestacional (TG) corresponde a uma condição clínica benigna que não está associada com morbidade nem mortalidade materna ou neonatal, correspondendo à causa de trombocitopenia mais frequentemente encontrada numa mulher grávida [67].

A TG surge em consequência da expansão do volume plasmático (hemodiluição) durante o período de gravidez e do aumento da ativação e consumo das plaquetas a nível periférico [68].

Para a realização do diagnóstico de TG não existem testes laboratoriais específicos, sendo geralmente efetuado pela exclusão de outras possíveis patologias, como a PTI. Assim, o diagnóstico de uma TG é suportado na presença de determinadas considerações clínicas que se encontram mencionadas na tabela 3 [69].

Tabela 3. Características da trombocitopenia gestacional que auxiliam no seu diagnóstico

Presença de trombocitopenia moderada ($> 70 \times 10^9$ plaquetas/L) e assintomática
Surge geralmente no final do segundo trimestre de gravidez
Não está associada com trombocitopenia fetal
Sem histórico de trombocitopenia anterior à gravidez
Resolve-se espontaneamente 1 a 2 meses após o parto

Abreviaturas: TG, trombocitopenia gestacional (Tabela adaptada de Jodkowska A, *et al.* [68]).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS

A importância clínica de uma trombocitopenia num doente é variável, dependendo da gravidade da trombocitopenia, que se manifestará com perturbações a nível da hemostasia primária [23].

Em geral, contagens entre $100 - 150 \times 10^9$ plaquetas/L, não associam sintomas e/ou sinais clínicos visíveis, apresentando o doente um tempo de hemorragia normal em caso de lesão ou de procedimento cirúrgico. As manifestações clínicas surgem normalmente quando a contagem de plaquetas é inferior a 100×10^9 plaquetas/L de sangue [22, 28, 70]:

- **Contagem plaquetária entre $50 - 100 \times 10^9$ /L:** hemorragias anormais após lesão traumática grave e cirurgias, com tempo de hemorragia prolongado;
- **Contagem plaquetária entre $10 - 50 \times 10^9$ /L:** risco de hemorragia frequente e grave após pequenas lesões, com aparecimento espontâneo e frequente de petéquias, púrpura e/ou equimoses;
- **Contagem de plaquetas inferior a 10×10^9 /L:** elevado risco de hemorragias espontâneas graves, incluindo hemorragias mucocutâneas (petéquias, púrpura,

equimoses, gengivorragia, epistaxe e menorragia), gastrointestinais, gínito-urinárias e até mesmo intracranianas, associadas a um elevado risco de vida para o doente.

AValiação CLÍNICA E LABORATORIAL DE TROMBOCITOPENIAS

Uma vez confirmada a presença de trombocitopenia através da observação do esfregaço de sangue periférico, é necessário proceder à avaliação da sua etiologia para estabelecer o respetivo tratamento. O estudo da trombocitopenia deve incluir a história clínica do doente, exame físico e exames laboratoriais efetuados [22, 24].

- História clínica

A história clínica detalhada do doente pode fornecer informações valiosas, orientando e facilitando desse modo o diagnóstico da etiologia da trombocitopenia [22].

Assim, os aspetos de particular relevância, que devem ser avaliados pelo clínico, incluem história familiar de trombocitopenia (não é raro o diagnóstico de trombocitopenia hereditária na fase adulta) e o perfil temporal das manifestações de hemorragia (agudas ou crónicas). O clínico deve considerar também a história de doenças hematológicas ou de outras doenças que cursem habitualmente com valores de plaquetas diminuídos (doenças autoimunes, infeções ou neoplasias); verificar também a história terapêutica, com especial atenção a algum tipo de fármaco adicionado recentemente ou que foi administrado de forma intermitente; histórico de imunizações, viagens recentes (áreas endémicas de malária, dengue ou rickettsiose), transfusão ou transplante de órgãos recente; histórico de consumo excessivo de álcool, deficiências nutricionais (ácido fólico e/ou vitamina B₁₂) e hospitalização recente com exposição à heparina [22, 23, 28].

- Exame físico

O exame físico deve avaliar a localização e a gravidade das hemorragias, com particular atenção para os locais críticos como o sistema neurológico, trato gastrointestinal e urinário; deve também avaliar-se a presença de hemorragias a nível da pele (petéquias, púrpura e/ou equimoses), mucosas (gengivorragia) e sistema respiratório (sangue na expetoração) [22].

O exame físico deve também verificar se existem alterações que possam auxiliar no diagnóstico da etiologia da trombocitopenia, tais como a presença de esplenomegalia e/ou hepatomegalia, sugestivas de uma infeção viral, doença autoimune ou doença hepática; linfadenopatias, associadas a doenças mieloproliferativas; e distúrbios neurológicos, presentes em alguns casos de PTT. A presença de hemorragia nas articulações e tecidos moles sugere a existência de alterações também a nível da hemostasia secundária, que

pode, em casos graves associar CID. A presença de regiões isquêmicas na pele deve levantar suspeitas de uma TIH [22, 23, 28].

- Observação do esfregaço sanguíneo

Apesar da utilização dos equipamentos laboratoriais automatizados, a observação do esfregaço de sangue periférico permanece como um teste laboratorial da maior importância para o diagnóstico de trombocitopenias [23].

Quando a trombocitopenia é encontrada de forma acidental durante as análises de rotina, sem existirem sintomas sugestivos de um baixo valor de plaquetas, deve realizar-se uma observação do esfregaço de sangue periférico, para exclusão de uma possível trombocitopenia artificial ou “pseudotrombocitopenia”, que resulta, na maior parte dos casos, da agregação plaquetária *in vitro*, em sangue colhido para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) [22, 29].

Confirmada a presença de trombocitopenia, a observação do esfregaço de sangue periférico deve prosseguir com a avaliação cuidadosa das 3 linhagens celulares (glóbulos brancos (GB), GV e plaquetas), pois existem alterações, que permitem uma avaliação rápida e presuntiva de algumas causas de trombocitopenia (tabela 4) [28, 71].

- Investigação adicional

Tendo em conta que existem múltiplas causas de trombocitopenia, deve proceder-se a diferentes estudos analíticos para esclarecimento da etiologia da mesma, de acordo com os achados clínicos e os resultados da observação do esfregaço de sangue periférico (tabela 4).

Na presença de esquistócitos no esfregaço sanguíneo, devem ser realizados exames específicos para efetuar a confirmação e o posterior diagnóstico diferencial entre as patologias que se manifestam com anemia hemolítica microangiopática, como a CID, PTT e SHU. Estes testes incluem principalmente a avaliação da hemostasia secundária, com a determinação do TP e TTPa e a determinação dos níveis de PDF e D-Dímeros, mas também a determinação dos níveis de bilirrubinas e LDH, atividade da metaloprotease ADAMTS-13 e pesquisa de anticorpos anti-ADAMTS-13.

Em caso de presença de microesferócitos e eritroblastos no esfregaço sanguíneo associado a níveis aumentados de LDH e bilirrubina indireta, número de reticulócitos aumentado e prova de Coombs direta positiva, a suspeita recai para a presença de Síndrome de Evans.

Quando a etiologia da trombocitopenia permanece desconhecida pode ser necessária a realização de aspirado e biópsia medular, de forma a excluir uma possível patologia a nível

da MO, auxiliando também na diferenciação de casos de trombocitopenia devido a uma produção inadequada ou a uma destruição periférica excessiva de plaquetas [22].

Tabela 4. Principais achados laboratoriais no esfregaço de sangue periférico, associados a trombocitopenia; diagnósticos possíveis e testes laboratoriais adicionais para a sua confirmação

Esfregaço sanguíneo	Possível diagnóstico	Testes laboratoriais
<i>Linfócitos atípicos</i>	Possível infecção viral (CMV, EBV).	Determinação de parâmetros de fase aguda (VS, PCR); Virologia – culturas sanguíneas.
<i>Trombocitopenia isolada Plaquetas gigantes</i>	Púrpura trombocitopénica imune; Macrotrombocitopenias hereditárias.	Exclusão de outras patologias com trombocitopenia associada; Testes genéticos.
<i>Eritroblastos e microesferócitos</i>	Síndrome de Evans	Prova de Coombs direta; Contagem de reticulócitos; Determinação dos níveis de haptoglobina, bilirrubina indireta e LDH.
<i>Blastos e precursores mieloides</i>	Patologia primária a nível da MO.	Aspirado e biópsia medular.
<i>Macrocitose oval e hipersegmentação dos neutrófilos</i>	Deficiência em vitamina B ₁₂ e/ou folatos.	Determinação dos níveis séricos destes nutrientes.
<i>Esquisitócitos – sugestivos de anemia microangiopática</i>	Coagulação intravascular disseminada; Púrpura trombocitopénica trombótica; Síndrome hemolítico urémico.	Determinação de parâmetros de avaliação do processo da coagulação; Determinação dos níveis de bilirrubina indireta e LDH; Determinação dos níveis de PDF e D-Dímeros; Determinação da atividade da enzima ADAMTS-13 e níveis de anticorpos anti-ADAMTS-13.

Abreviaturas: ADAMTS-13, metaloprotease plasmática que cliva o Fator de von Willebrand; CMV, citomegalovírus; EBV, vírus Epstein-Barr; LDH, lactato desidrogenase; MO, medula óssea; PCR, proteína C-reativa; PDF, produtos de degradação da fibrina; VS, velocidade de sedimentação (Figura adaptada de Gauer RL, et al. [28]).

Estes exames laboratoriais vão assim permitir uma avaliação geral do estado de saúde do doente, permitindo perceber se se trata de uma trombocitopenia isolada, que não afeta a

linhagem dos GV e GB, e decorre com ausência de sintomas e/ou sinais clínicos de doença sistêmica, ou se existe um conjunto de anormalidades laboratoriais e clínicas que podem sugerir um diagnóstico específico [22, 23].

Na figura 10 encontra-se representado um algoritmo de trabalho que pode ser utilizado para realizar o diagnóstico diferencial de trombocitopenias, sempre que se encontra um valor de plaquetas inferior a 150×10^9 plaquetas/L.

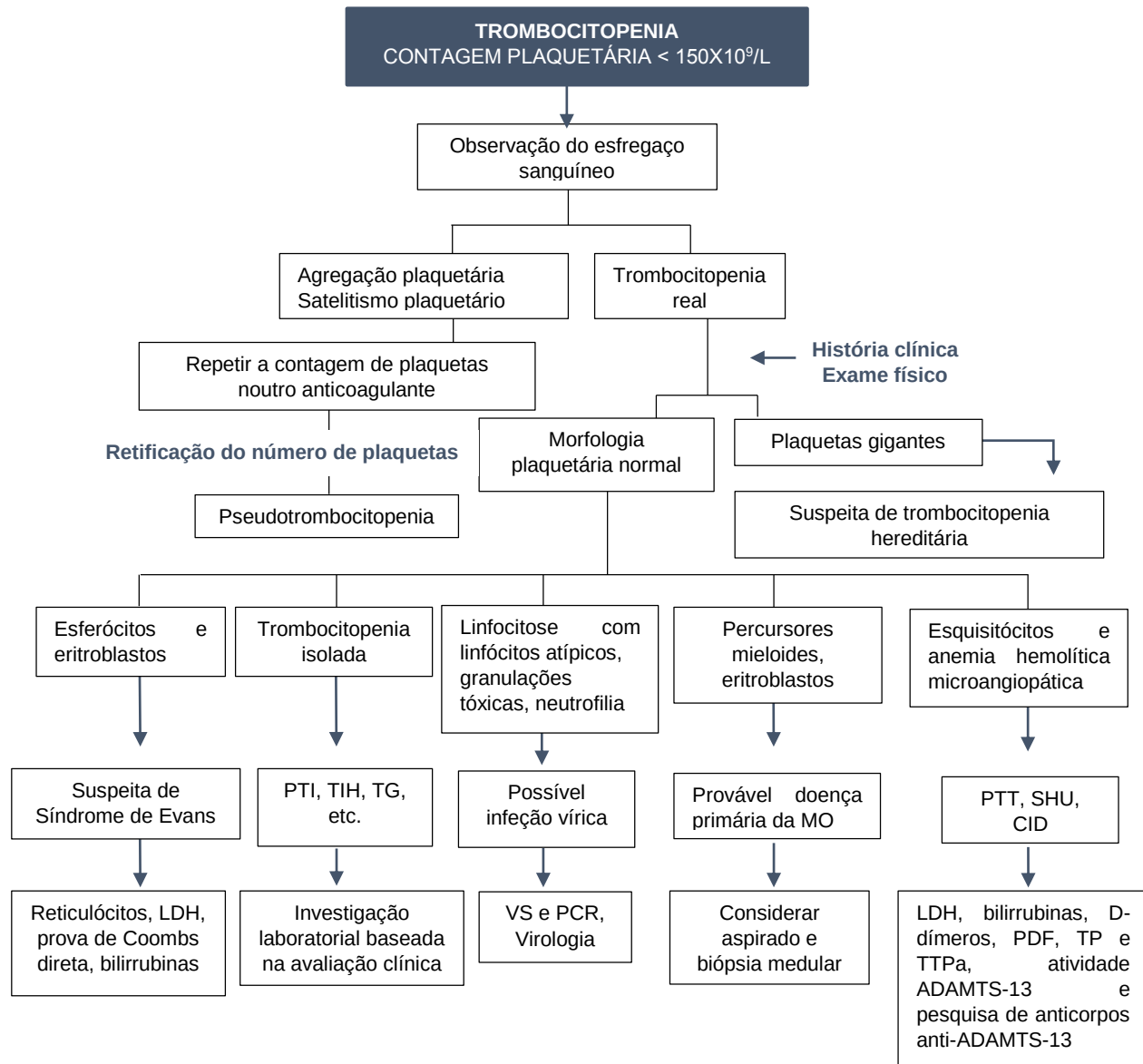


Figura 10. Algoritmo utilizado na realização do diagnóstico de trombocitopenias.

Abreviaturas: ADAMTS-13, metaloprotease plasmática que cliva o Fator de von Willebrand; CID, coagulação intravascular disseminada; LDH, lactato desidrogenase; MO, medula óssea; PCR, proteína C-reativa; PDF, produtos de degradação da fibrina; PTI, púrpura trombocitopénica imune; PTT, púrpura trombocitopénica trombótica; SHU, Síndrome hemolítico urémico; TG, trombocitopenia gestacional; TIH, trombocitopenia induzida pela heparina; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativado; VS, velocidade de sedimentação (Figura adaptada de Stasi R, *et al.* [23]).

3. PSEUDOTROMBOCITOPENIAS

Atualmente, o número de plaquetas circulantes pode ser determinado com rapidez e precisão através da utilização de analisadores automáticos de hematologia. No entanto, apesar destes equipamentos representarem um desenvolvimento tecnológico de extrema importância e de uso comum, podem ainda ocorrer artefactos laboratoriais, que podem conduzir a contagens incorretas, particularmente a valores de plaquetas falsamente diminuídos, ou seja, a pseudotrombocitopenia (PTCP). Um diagnóstico errado de trombocitopenia determinará a realização de testes laboratoriais adicionais dispendiosos e tratamentos desnecessários, tornando-se por isso a sua identificação de extrema importância [72, 73].

DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA SUA IDENTIFICAÇÃO

A PTCP é um artefacto laboratorial relativamente comum nos Laboratórios de Análises Clínicas, em que o número de plaquetas reportado pelo analisador automático é inferior ao número de plaquetas circulantes *in vivo* [74, 75].

As PTCP correspondem a cerca de 15 a 30% dos casos de trombocitopenias isoladas observadas nos laboratórios. A maioria destes casos é consequência de um fenómeno de agregação plaquetária *in vitro* na presença de determinados anticoagulantes [71]. O número real de plaquetas e a sua função são normais, pelo que os indivíduos que exibem este artefacto laboratorial não apresentam alterações hemorrágicas, nem história clínica, sintomas e/ou sinais de trombocitopenia [75].

A possibilidade de se tratar de um caso de PCTP deve ser confirmada antes da realização de uma avaliação extensiva, devido às implicações prognósticas e terapêuticas. Uma interpretação incorreta dos resultados da contagem plaquetária obtida pelos equipamentos de hematologia pode conduzir a um falso diagnóstico com consultas e solicitação de exames laboratoriais desnecessários, e eventualmente, a adiamento de procedimentos cirúrgicos, condutas terapêuticas totalmente inadequadas, incluindo a terapia com corticosteroides, transfusão de plaquetas e esplenectomia. A PTCP representa um problema laboratorial e clínico de grande importância, que deve ser cuidadosamente avaliada [73, 76, 77].

CAUSAS DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA

As PTCP correspondem maioritariamente a situações de agregação plaquetária e satelitismo plaquetário (SP), que ocorrem frequentemente na presença do anticoagulante EDTA, ou podem ainda ser secundárias a erros ocorridos nos procedimentos pré-analíticos. Durante a colheita de sangue ou como consequência de uma incorreta mistura

entre o anticoagulante e a amostra de sangue pode ocorrer ativação plaquetária, com agregação plaquetária *in vitro*.

A presença de um número elevado de plaquetas de grandes dimensões pode também conduzir a uma contagem plaquetária falsamente diminuída, por excederem o limite de detecção definido para as plaquetas [78, 79].

O reconhecimento destes artefactos laboratoriais pode prevenir o diagnóstico inapropriado de trombocitopenia.

ERROS PRÉ-ANALÍTICOS

Diferentes erros pré-analíticos podem estar relacionados com agregação plaquetária indesejada e consequente diminuição no valor da contagem de plaquetas reportado pelo analisador automático, ou seja, com o aparecimento de PTCP.

Estes erros pré-analíticos incluem a colheita inadequada da amostra de sangue, como pode acontecer, por exemplo, em colheitas mais demoradas com punção venosa difícil, em que ocorre a formação de microcoágulos sanguíneos, que aprisionam as plaquetas. Podem ainda surgir casos de PTCP quando não é respeitada a relação volume de sangue/concentração de anticoagulante, ou quando não se procede à correta homogeneização entre o anticoagulante e a amostra de sangue, favorecendo a agregação plaquetária pela inibição incompleta do processo de coagulação [80].

PSEUDOTROMBOCITOPENIA ASSOCIADA A PLAQUETAS GIGANTES

As plaquetas gigantes, associadas a situações de macrotrombocitopenias hereditárias ou PTI, podem ser contabilizadas erroneamente pelos analisadores automáticos como GV ou leucócitos, conduzindo a uma contagem de plaquetas falsamente diminuída [80].

PSEUDOTROMBOCITOPENIA INDUZIDA PELO ANTICOAGULANTE

A exposição da amostra de sangue de alguns indivíduos ao anticoagulante EDTA pode induzir a formação de agregados plaquetários ou, menos frequentemente, a agregação das plaquetas em torno de neutrófilos, por um processo que parece ser imuno-mediado. Também tem sido reportada, com menor frequência, a existência de agregação plaquetária na presença de outros anticoagulantes como o oxalato, a heparina e o citrato de sódio [81, 82].

Anticoagulantes

No campo do diagnóstico laboratorial hematológico, os anticoagulantes são utilizados para preservar as células sanguíneas e prevenir a coagulação e, ainda, para obtenção de

plasma para estudos de hemostasia sanguínea. O sangue completo não coagulado, permite, portanto, a realização de uma grande variedade de testes hematológicos [83]. Os anticoagulantes mais utilizados nas análises hematológicas de rotina são os sais de sódio e de potássio do EDTA, a heparina e o citrato de sódio (tabela 5).

Tabela 5. Características e aplicações clínicas dos anticoagulantes mais frequentemente utilizados nas análises hematológicas de rotina

Anticoagulante	Características	Aplicações clínicas
Heparina	Anticoagulante líquido, que inibe o processo de coagulação por impedir a conversão da protrombina a trombina ativa.	Determinação da fragilidade osmótica.
Citrato de sódio	Anticoagulante líquido, que inibe o processo de coagulação por quelatação do cálcio.	Anticoagulante de eleição para testes da hemostase sanguínea (TP, TTPa, fibrinogénio) e determinação da VS.
EDTA	Anticoagulante sólido, que inibe o processo de coagulação por quelatação do cálcio.	Anticoagulante utilizado na maioria dos testes hematológicos de rotina.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativado; VS, velocidade de sedimentação.

O EDTA é um ácido poliprótico que contém 4 grupos de ácido carboxílico e dois grupos amino com um par isolado de eletrões, capaz de quelatar ou complexar iões metálicos numa razão de 1:1, incluindo os iões cálcio (figura 11). É um anticoagulante sólido que pode ser encontrado sob a forma de sal disódico (Na_2EDTA), dipotássico (K_2EDTA), ou tripotássico (K_3EDTA), sendo este último o mais utilizado devido à sua maior solubilidade [83, 84].

O EDTA inibe o processo de coagulação, atuando sobre a forma não ionizada do cálcio plasmático, fixando-o por quelatação. Como o cálcio é necessário para uma grande variedade de reações enzimáticas da cascata de coagulação, a sua remoção irreversível efetuada pelo EDTA previne a coagulação do sangue [83, 85].

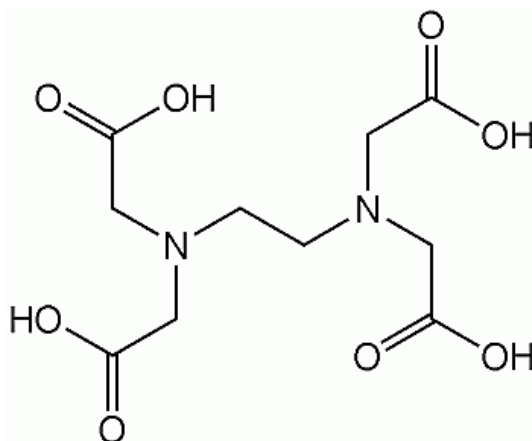


Figura 11. Estrutura bioquímica do ácido etilenodiamino tetra-acético (Figura adaptada de Banfi G, et al. [83]).

O EDTA é recomendado como o anticoagulante de eleição para a realização da maioria dos testes hematológicos de rotina, incluindo o hemograma com contagem de plaquetas, contagem de reticulócitos, determinação do grupo sanguíneo e fator Rh, pois permite uma boa preservação dos componentes celulares e da sua morfologia, prevenindo também a ativação/agregação plaquetária. No entanto, é de extrema importância respeitar a relação concentração de anticoagulante/volume de sangue, pois uma quantidade excessiva de EDTA pode provocar alterações morfológicas nas células, originando contração dos GV e GB, tumefação e eventual fragmentação das plaquetas, bem como agregação plaquetária com desenvolvimento de PTCP [76, 83].

SATELITISMO PLAQUETÁRIO NA PRESENÇA DE EDTA

O SP corresponde a um fenómeno laboratorial *in vitro* relativamente raro, que se caracteriza pela adesão das plaquetas a leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, e ocasionalmente a outras células, como monócitos e linfócitos (figura 12) [86]. Este fenómeno é observado exclusivamente nos esfregaços de sangue periférico preparados a partir de amostras de sangue colhidas para tubos com EDTA, sendo observado em pessoas saudáveis, independentemente da idade, mas também em indivíduos com diferentes patologias, incluindo vasculite, LES, linfomas e doença hepática crónica, não existindo no entanto evidências de uma relação causal [87, 88].

O SP é clinicamente relevante como possível causa de PTCP, não estando, no entanto, associado a disfunção plaquetária ou a distúrbios hemorrágicos [89].

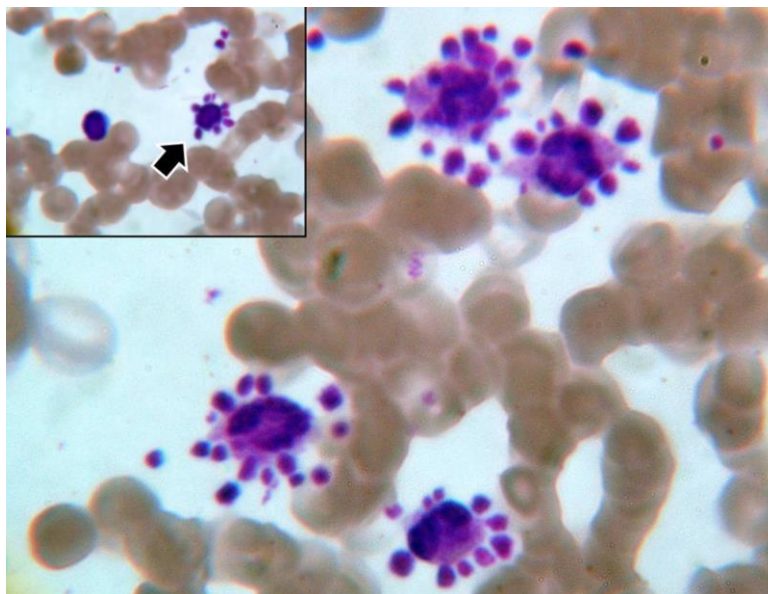


Figura 12. Satelitismo plaquetário observado numa amostra de sangue colhida em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (Figura adaptada de Chakrabarti I. [89]).

Mecanismo fisiopatológico

O mecanismo fisiopatológico do SP ainda não se encontra totalmente esclarecido. No entanto, existem evidências de que o EDTA, através do processo de quelatação do cálcio, induz alterações na membrana das plaquetas e dos neutrófilos, expondo epítomos geralmente ocultos que são posteriormente reconhecidos por autoanticorpos naturais específicos, que formam uma “ponte” entre as duas células sanguíneas. Esta ligação entre os neutrófilos e as plaquetas parece ser mediada por anticorpos com reatividade dupla contra o complexo plaquetário GPIIb/IIIa e o recetor FcγRIII dos neutrófilos [88, 89].

Foi também proposto um mecanismo não imunológico, no qual algumas proteínas libertadas dos grânulos α das plaquetas, especialmente a trombospondina e a P-selectina, são rapidamente expressas à superfície plaquetária após a presença de um evento ativante, induzindo a adesão das plaquetas aos neutrófilos [90].

AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA PRESENÇA DE EDTA

Como se referiu, os casos de agregação plaquetária são maioritariamente observados quando o sangue é colhido para tubos com o anticoagulante EDTA. Estima-se que aproximadamente 0,1% de toda a população possua anticorpos antiplaquetários naturais dependentes de EDTA [71].

Assim, segundo a literatura, cerca de 15 a 17% dos casos de trombocitopenia isolada detetados pelos analisadores automáticos correspondem na verdade a PTCP induzidas pelo EDTA. Esta prevalência parece não ser dependente do género, nem da idade, e aparece na maior parte das vezes em indivíduos saudáveis, embora possa também ocorrer

associada com uma grande variedade de patologias, incluindo trauma, sépsis, infeções víricas e bacterianas, doenças autoimunes, neoplasias, doenças cardiovasculares e outras desordens trombóticas [74, 84, 91].

Mecanismo fisiopatológico

Não se conhece o mecanismo fisiopatológico exato da PTCP induzida pelo EDTA, mas tem sido proposto que o efeito quelante do EDTA sob os iões cálcio, em conjunto com uma temperatura baixa, conduz a uma alteração conformacional no complexo glicoproteico GPIIb/IIIa. Ou seja, a remoção do cálcio pelo EDTA conduz à perda de função do recetor plaquetário GPIIb/IIIa, e a temperaturas inferiores a 25°C ocorre a dissolução deste complexo em subunidades individuais [82, 92].

O EDTA induz uma alteração na conformação dos recetores da membrana plaquetária, com exposição de epítomos geralmente escondidos na GPIIb, que se tornam desta forma acessíveis à ligação dos anticorpos. Se o indivíduo possuir autoanticorpos antiplaquetários naturais contra este “neoepítomo”, a sua ligação vai estimular a expressão de antigénios ativantes a nível da superfície plaquetária, incluindo a proteína membrana α -granular 140 (PMG140), a glicoproteína da membrana lisossomal (GPL) e a trombospondina, com consequente ativação da via de sinalização intracelular tirosina cinase e finalmente a agregação plaquetária (figura 13) [73, 81, 84].

A maioria dos autoanticorpos isolados destes indivíduos atua como aglutininas frias, num intervalo de temperatura ideal entre os 4 a 20°C, correspondendo geralmente a imunoglobulinas do tipo IgG e IgM, e menos frequentemente a IgA [73, 81, 93].

Pensa-se que estes autoanticorpos plaquetários não possuem um significado patológico relevante, dada a ausência de associação com uma doença específica e ao facto de existirem também em pessoas saudáveis. A hipótese mais provável é que estes anticorpos naturais são dirigidos contra antigénios plaquetários normalmente ausentes na superfície das plaquetas, podendo a sua origem estar relacionada com a *clearance* de plaquetas senescentes e/ou danificadas [94].

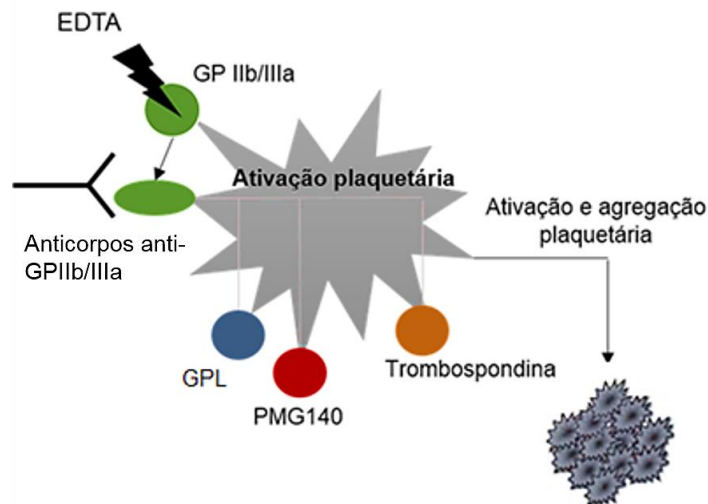


Figura 13. Mecanismo fisiopatológico da pseudotrombocitopenia com agregação plaquetária induzida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; GP, glicoproteína; GPL, glicoproteína da membrana lisossomal; PMG140, proteína membranar α -granular 140 (Figura adaptada de Lippi G, *et al.* [84]).

Identificação de uma PTCP induzida pelo EDTA

Como já referido, o conhecimento dos dados clínicos e laboratoriais do doente por parte do clínico é de extrema importância para evitar a valorização de resultados incorretos. Assim, quando um indivíduo apresenta uma trombocitopenia isolada, sem histórico de doenças hematológicas, histórico familiar de trombocitopenias ou manifestações de episódios hemorrágicos, deve suspeitar-se em primeiro lugar da presença de uma PTCP, que não deve ser confundida com outras condições clínicas graves, como a CID, PTI ou TIH [84]. Para evitar falsos diagnósticos de trombocitopenia, foram propostos diversos métodos, para o diagnóstico diferencial entre PTCP e verdadeira trombocitopenia.

Esses métodos incluem preferencialmente a observação microscópica do esfregaço sanguíneo, para pesquisa de agregados plaquetários, e a utilização de anticoagulantes alternativos ao EDTA, como o citrato de sódio, oxalato ou heparina; em alternativa poderá realizar-se a contagem de plaquetas imediatamente após a colheita de sangue em tubo com EDTA, para evitar a agregação plaquetária. Outros procedimentos menos utilizados incluem uma nova contagem plaquetária após aquecimento da amostra de sangue a uma temperatura de 37°C durante cerca de 30 minutos, para dissociar os possíveis agregados plaquetários; ou a suplementação da amostra de sangue colhida em tubo com EDTA, com determinados aminoglicosídeos, como a kanamicina ou amicacina (não sendo o mecanismo do efeito mediado por estes aminoglicosídeos conhecido). No entanto, algumas das opções anteriormente mencionadas não são suficientemente rápidas ou práticas para se realizarem por rotina nos Laboratórios de Análises Clínicas [73].

Assim, na maior parte dos laboratórios, quando se observa uma contagem de plaquetas diminuída num indivíduo sem histórico de trombocitopenia, a situação é em primeiro lugar confirmada através da repetição da contagem plaquetária na mesma amostra, de preferência noutro equipamento, se este existir. Se o número de plaquetas permanecer semelhante, começa-se por realizar a avaliação cuidadosa do esfregaço sanguíneo que é imprescindível e permanece como referência para a identificação e caracterização dos casos de PTCP induzida pelo EDTA. Nestes casos é possível observar agregados plaquetários que, em geral, são mais frequentes na porção final da cauda do esfregaço sanguíneo [73, 74].

Para além disso, é importante observar de forma criteriosa os dados emitidos pelo analisador automático, como o histograma plaquetário e os *flags*, que podem também ser sugestivos de um quadro de PCTP (figura 14) [74, 84].

Após confirmação da presença de agregados plaquetários, deve pedir-se uma nova colheita de sangue para tubos com um dos anticoagulantes anteriormente referidos e, se ocorrer a retificação do número de plaquetas, é realizado o diagnóstico de PTCP induzida pelo EDTA [73].

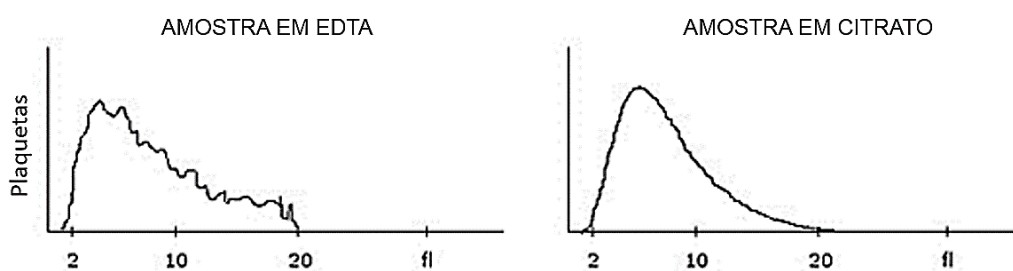


Figura 14. Histograma característico de uma pseudotrombocitopenia numa amostra obtida em tubo de colheita com ácido etilenodiamino tetra-acético (à esquerda) em contraste com um histograma normal obtido em tubo de colheita com citrato de sódio, de uma amostra do mesmo indivíduo (à direita).

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético [Nagler M, et al. [74]].

Resumindo, as principais características observadas numa PTCP induzida pelo EDTA, que auxiliam no seu diagnóstico, incluem uma diminuída contagem de plaquetas reportada pelo analisador automático, sem associação a sintomas e/ou sinais clínicos de trombocitopenia, valores normais de tempo de hemorragia e dos testes de coagulação e observação de agregados plaquetários no esfregaço de sangue periférico. Para além disto, o equipamento pode ainda contabilizar erroneamente os agregados plaquetários como leucócitos, conduzindo a uma contagem de GB falsamente elevada, designada de pseudoleucocitose [73, 75].

4. CASOS CLÍNICOS

Durante a realização do estágio curricular integrado no 2º ano do Mestrado em Análises Clínicas (MAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), que decorreu no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina, tive a oportunidade de verificar que uma significativa fração dos casos observados com trombocitopenia isolada, nas amostras obtidas em tubo com o anticoagulante EDTA e cuja determinação foi efetuada no analisador automático de hematologia Sysmex XT-1800iTM, era na realidade consequência da existência de um artefacto laboratorial, originando situações de PTCP.

No laboratório, de forma a identificar corretamente todos os casos com valores falsamente diminuídos de plaquetas, segue-se o algoritmo de trabalho que se encontra representado na figura 15.

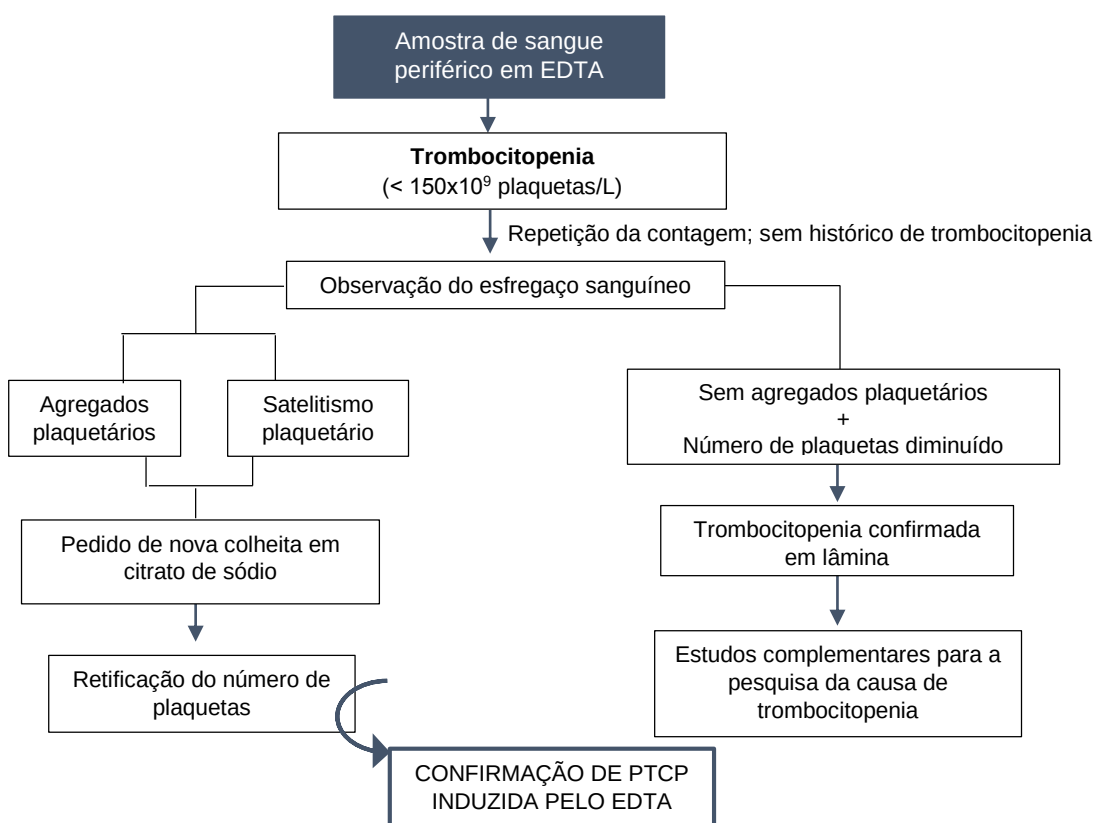


Figura 15. Algoritmo utilizado para a identificação de casos de pseudotrombocitopenia induzida pelo ácido etilenodiamino tetra-acético.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; PTCP, pseudotrombocitopenia.

Assim, sempre que surjam casos de uma contagem de plaquetas inferior a 150×10^9 plaquetas/L, sem associação a história clínica, sinais e/ou sintomas de trombocitopenia, procede-se à observação microscópica do esfregaço de sangue periférico. Se for possível observar agregados plaquetários ou SP no esfregaço sanguíneo, pede-se nova colheita de

sangue em tubo com citrato de sódio a 3,8%, para verificar se ocorre retificação do número de plaquetas ou se se trata de uma trombocitopenia verdadeira.

APRESENTAÇÃO DOS CASOS DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA

No período de tempo que permaneci no setor da hematologia, aproximadamente um mês, foi-me possível observar pelo menos 3 casos de PCTP. Neste capítulo vou apresentar mais detalhadamente estes casos clínicos, incluindo os hemogramas e histogramas plaquetários obtidos para as amostras colhidas em tubo com EDTA e citrato de sódio, e a visualização dos esfregaços de sangue periférico.

Nas tabelas 6 e 7 encontram-se mencionadas as contagens de plaquetas e leucócitos obtidas em EDTA, citrato de sódio e a respetiva correção, referentes aos 3 casos clínicos estudados. Todos os indivíduos eram do sexo feminino, sem histórico de trombocitopenia anterior, e apresentavam idades de 47, 51 e 81 anos.

Tabela 6. Valor de plaquetas nas amostras colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético e com citrato de sódio, nos 3 casos clínicos estudados

Casos clínicos	EDTA	Citrato de sódio	Após correção
CASO 1 Mulher - 81 anos	<u>82x10⁹plaquetas/L</u>	172x10 ⁹ plaquetas/L	215x10 ⁹ plaquetas/L
CASO 2 Mulher - 47 anos	<u>101x10⁹plaquetas/L</u>	188x10 ⁹ plaquetas/L	235x10 ⁹ plaquetas/L
CASO 3 Mulher - 51 anos	<u>35x10⁹plaquetas/L</u>	158x10 ⁹ plaquetas/L	198x10 ⁹ plaquetas/L

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético.

Tabela 7. Valor de leucócitos nas amostras colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético e com citrato de sódio, nos 3 casos clínicos estudados

Casos clínicos	EDTA	Citrato de sódio	Após correção
CASO 1 Mulher - 81 anos	<u>9,82x10⁹leucócitos/L</u>	8,60x10 ⁹ leucócitos/L	10,75x10 ⁹ leucócitos/L
CASO 2 Mulher - 47 anos	<u>6,18x10⁹leucócitos/L</u>	5,34x10 ⁹ leucócitos/L	6,67x10 ⁹ leucócitos/L
CASO 3 Mulher - 51 anos	<u>6,77x10⁹leucócitos/L</u>	5,40x10 ⁹ leucócitos/L	6,75x10 ⁹ leucócitos/L

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético.

CORREÇÃO DA CONTAGEM DE PLAQUETAS E LEUCÓCITOS EM CITRATO DE SÓDIO

A utilização do citrato de sódio, anticoagulante líquido empregue na proporção de 1:4 de sangue, introduz um erro por diluição na determinação da contagem de plaquetas e leucócitos reportada pelo analisador automático de hematologia, obtendo-se um valor inferior ao valor real *in vivo*. O número de plaquetas e leucócitos pode ser corrigido, tendo em conta o fator de diluição em causa, através da seguinte fórmula [73]:

$$\text{Número de plaquetas/leucócitos real} = \text{Número de plaquetas/leucócitos em citrato de sódio obtido pelo equipamento} \times 1,25 \text{ (fator de diluição)}$$

Os parâmetros eritrocitários não devem ser analisados em citrato de sódio, por este introduzir alterações morfológicas nos GV.

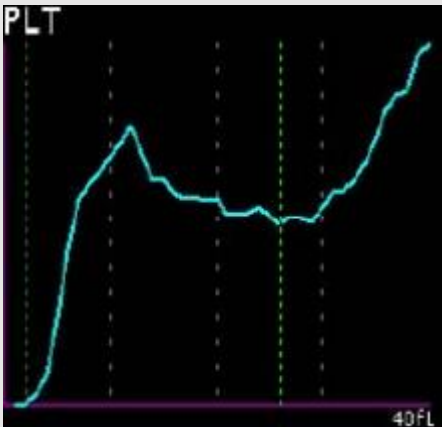
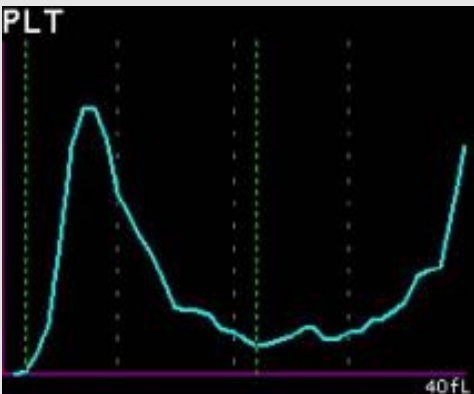
HEMOGRAMAS E “FLAGS” EMITIDOS PELO EQUIPAMENTO

Os analisadores automáticos de hematologia emitem determinados *flags* que alertam para a presença de alterações celulares específicas, o que pode auxiliar na interpretação dos resultados obtidos. Na tabela 8, encontram-se descritos os principais *flags* em relação à linhagem plaquetária emitidos pelo equipamento Sysmex XT-1800iTM, utilizado durante a realização do estágio curricular.

O aparecimento destes *flags* é frequentemente acompanhado por asteriscos (*) em parâmetros como WBC (glóbulos brancos), P-LCR (percentagem de plaquetas gigantes), PDW (amplitude de distribuição das plaquetas), MPV (volume plaquetário médio), PCT (plaquetócrito) e PLT (plaquetas), indicando que estes resultados são de baixa confiabilidade devido a anormalidades encontradas pelo equipamento.

Quando surgem estas mensagens, em conjunto com parâmetros alterados assinalados com asterisco, o procedimento indicado é a confirmação dos resultados pela observação do esfregaço de sangue periférico, procedendo-se à pesquisa de plaquetas gigantes, agregados plaquetários, fragmentos de GV ou GV microcíticos, que possam estar a originar valores falsos de WBC, PLT e restantes índices plaquetários.

Tabela 8. Mensagem e respetivo significado dos flags emitidos pelo equipamento, em relação à linhaagem plaquetária

Mensagem	Significado
PLT Abn Distribution (Distribuição anormal de plaquetas) 	Este parâmetro é determinado a partir da forma do histograma plaquetário e através de valores numéricos, tais como os parâmetros plaquetários PDW, PLT, P-LCR e MPV. Esta mensagem surge, geralmente, em consequência de um PDW e P-LCR anormais, indicando a existência de uma <u>distribuição anormal no tamanho das plaquetas</u>.
PLT Clumps (S)? (Agregados plaquetários?) 	Este parâmetro é determinado a partir do histograma plaquetário e através de valores numéricos, tais como os parâmetros plaquetários PDW, PLT, P-LCR e MPV. Esta mensagem surge em situações de <u>suspeita de agregados plaquetários</u>.
Thrombocytopenia (-)	Esta mensagem surge quando o número de plaquetas é inferior a $150 \times 10^9/L$.

Abreviaturas: MPV, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentagem de plaquetas gigantes; PLT, plaquetas.

Nas figuras 16 a 18 encontram-se os resultados dos hemogramas, obtidos em EDTA e citrato de sódio, para os 3 casos clínicos apresentados.

EDTA			CITRATO		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	9.82 *	$10^3/uL$	WBC	8.60 *	$10^3/uL$
RBC	4.41	$10^6/uL$	RBC	3.91	$10^6/uL$
HGB	12.7	g/dL	HGB	11.3	g/dL
HCT	39.3	%	HCT	35.5	%
MCV	89.1	fL	MCV	90.8	fL
MCH	28.8	pg	MCH	28.9	pg
MCHC	32.3	g/dL	MCHC	31.8	g/dL
PLT	82 *	$10^3/uL$	PLT	172	$10^3/uL$
RDW-SD		fL	RDW-SD	47.3	fL
RDW-CV		%	RDW-CV	14.3	%
PDW	20.9 *	fL	PDW	13.0	fL
MPV	13.3 *	fL	MPV	10.8	fL
P-LCR	47.9 *	%	P-LCR	30.7	%
PCT	0.11 *	%	PCT	0.18	%

Figura 16. Hemograma relativo ao caso 1.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentagem de plaquetas gigantes; PLT, plaquetas; WBC, glóbulos brancos.

EDTA			CITRATO		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	6.18 *	$10^3/uL$	WBC	5.34	$10^3/uL$
RBC	4.55	$10^6/uL$	RBC	4.14	$10^6/uL$
HGB	13.9	g/dL	HGB	12.5	g/dL
HCT	41.0	%	HCT	38.2	%
MCV	90.1	fL	MCV	92.3	fL
MCH	30.5	pg	MCH	30.2	pg
MCHC	33.9	g/dL	MCHC	32.7	g/dL
PLT	101 *	$10^3/uL$	PLT	188	$10^3/uL$
RDW-SD	42.6	fL	RDW-SD	43.8	fL
RDW-CV	13.0	%	RDW-CV	13.0	%
PDW	16.7 *	fL	PDW	12.1	fL
MPV	12.1 *	fL	MPV	10.1	fL
P-LCR	40.5 *	%	P-LCR	26.6	%
PCT	0.12 *	%	PCT	0.19	%

Figura 17. Hemograma relativo ao caso 2.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentagem de plaquetas gigantes; PLT, plaquetas; WBC, glóbulos brancos.

EDTA			CITRATO		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	6.77	* 10 ³ /uL	WBC	5.40	10 ³ /uL
RBC	4.50	10 ⁶ /uL	RBC	3.72	10 ⁶ /uL
HGB	14.2	g/dL	HGB	11.8	g/dL
HCT	40.8	%	HCT	34.1	%
MCV	90.7	fL	MCV	91.7	fL
MCH	31.6	pg	MCH	31.7	pg
MCHC	34.8	g/dL	MCHC	34.6	g/dL
PLT	35	* 10 ³ /uL	PLT	158	10 ³ /uL
RDW-SD	41.3	fL	RDW-SD	41.7	fL
RDW-CV	12.4	%	RDW-CV	12.4	%
PDW	14.0	* fL	PDW	11.0	fL
MPV	10.3	* fL	MPV	9.5	fL
P-LCR	29.4	* %	P-LCR	21.6	%
PCT	0.04	* %	PCT	0.15	- %

Figura 18. Hemograma relativo ao caso 3.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentagem de plaquetas gigantes; PLT, plaquetas; WBC, glóbulos brancos.

Interpretação dos hemogramas

Nos 3 casos clínicos apresentados foi possível observar uma trombocitopenia nas amostras obtidas em tubo com EDTA, que variou desde ligeira a severa, e normalizou posteriormente na amostra colhida em tubo com o anticoagulante citrato de sódio a 3,8%. Foi também possível verificar que o número de leucócitos se encontrou sempre ligeiramente superior nas amostras de sangue colhidas em EDTA, o que poderia indicar que o equipamento contabilizou erroneamente os agregados plaquetários existentes como leucócitos, conduzindo a uma contagem falsamente elevada destes. No entanto, após correção dos valores de leucócitos em citrato de sódio, utilizando a forma anteriormente mencionada, devido à presença de um anticoagulante líquido, o número de leucócitos acaba por ficar semelhante. Assim, para os casos apresentados, o equipamento provavelmente não confundiu agregados plaquetários com leucócitos.

Foi também possível observar nas amostras colhidas em EDTA, que o parâmetro P-LCR se encontrou sempre ligeiramente superior ao valor de referência, em conjunto com um PDW também aumentado, o que sugere a presença de plaquetas gigantes com anisocitose plaquetária, podendo, no entanto, significar que o equipamento contabilizou falsamente os agregados plaquetários como plaquetas gigantes.

HISTOGRAMAS PLAQUETÁRIOS

Interpretação dos histogramas plaquetários

A observação de uma distribuição anormal de PLT nos histogramas plaquetários obtidos para as amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA, corrigida nas amostras de sangue colhidas posteriormente em citrato de sódio, sugere a existência de agregados plaquetários ou outros possíveis interferentes (figura 19).

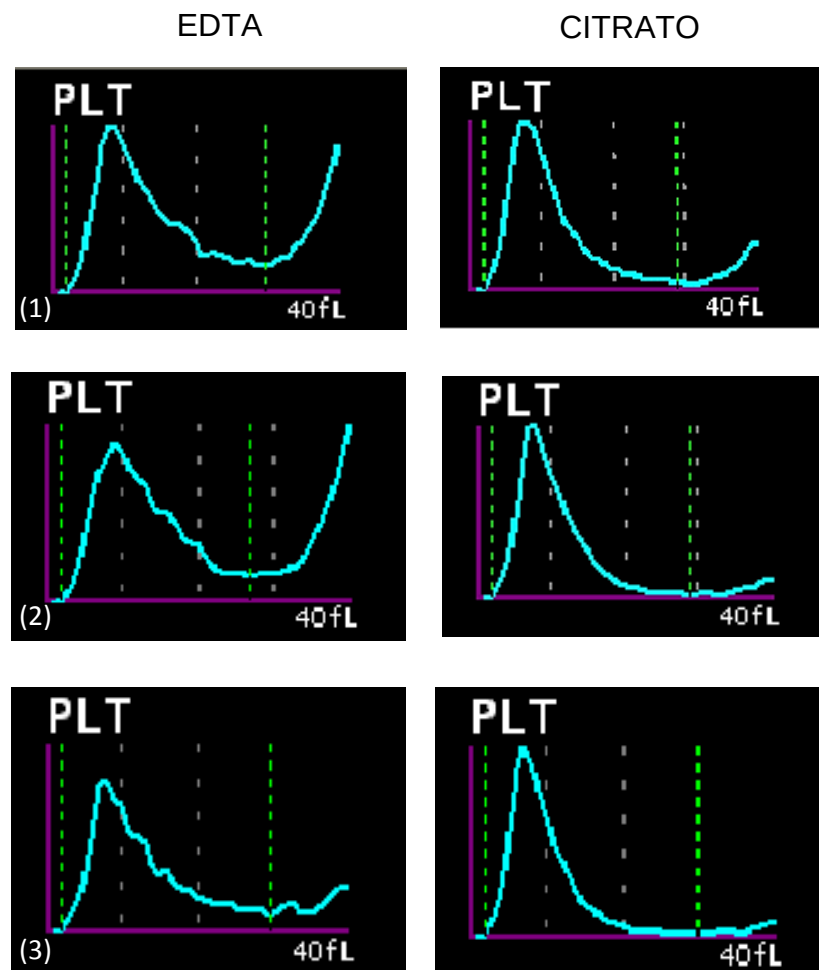


Figura 19. Histogramas plaquetários provenientes da contagem de plaquetas em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (à esquerda) e em citrato de sódio (à direita), referentes aos 3 casos clínicos em estudo.

Abreviaturas: EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; PLT, plaquetas.

A avaliação criteriosa do histograma referente ao volume de distribuição plaquetário possui uma particular importância nestes casos. Quando este apresenta uma forma normal, a contagem de plaquetas e os restantes parâmetros plaquetários obtidos refletem geralmente valores reais. Em contraste, quando a distribuição plaquetária for anormal, tanto os valores da contagem plaquetária como dos restantes índices plaquetários podem

resultar da presença de interferentes, como agregados plaquetários, SP, plaquetas gigantes ou GV fragmentados.

OBSERVAÇÃO DO ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Na observação do esfregaço de sangue periférico das amostras colhidas em tubo com o anticoagulante EDTA, foi possível confirmar a presença de numerosos agregados de plaquetas, principalmente na cauda do esfregaço de sangue periférico. As figuras 20 a 22 correspondem aos esfregaços de sangue periférico preparados a partir das amostras dos 3 casos clínicos estudados.

CASO 1

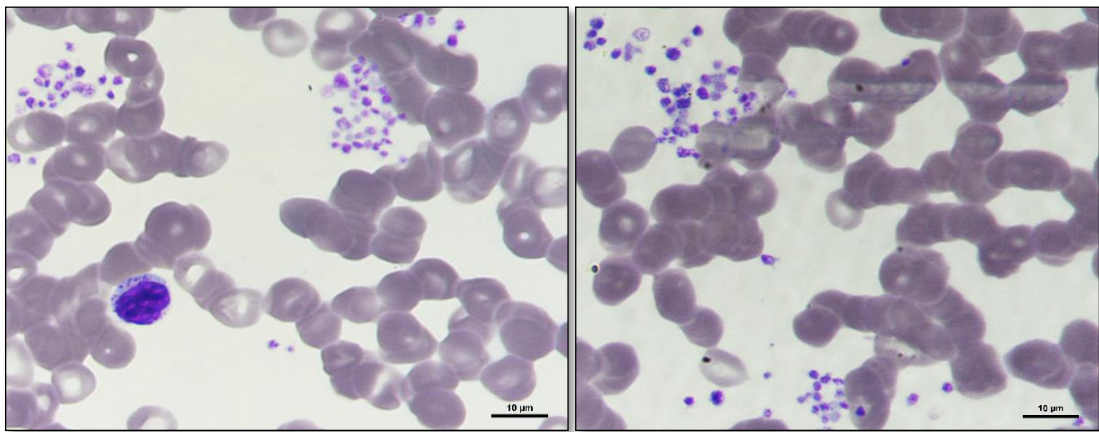


Figura 20. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 1) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).

CASO 2

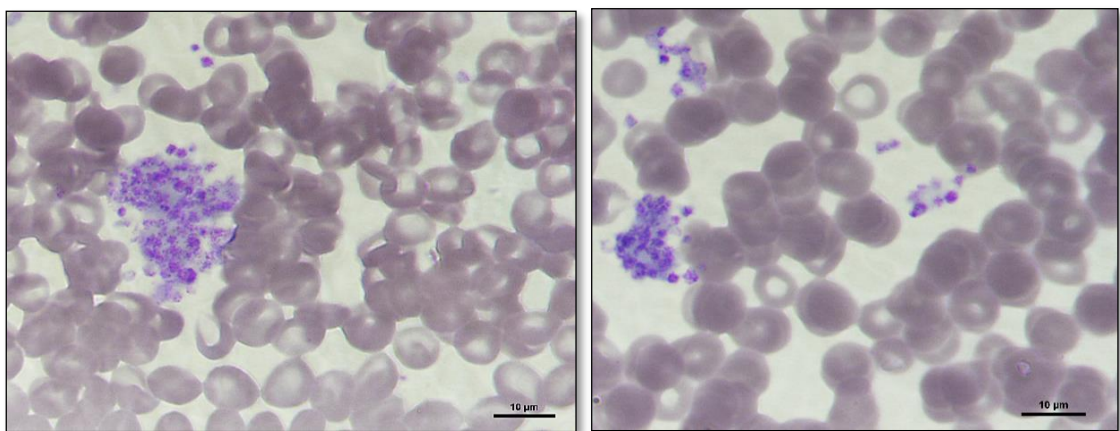


Figura 21. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 2) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).

CASO 3

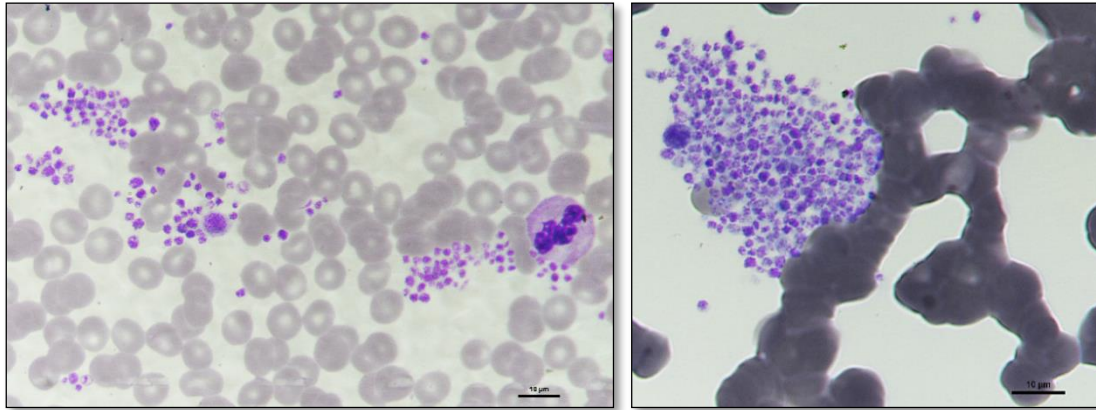


Figura 22. Agregados plaquetários no sangue periférico de uma amostra (caso 3) colhida em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (ampliação 400×).

5. CONCLUSÃO

O uso comum de analisadores automáticos de hematologia para a realização do estudo das células sanguíneas permitiu, por um lado, reconhecer a existência deste artefacto laboratorial, mas, por outro lado, diminuiu a frequência da observação microscópica do esfregaço sanguíneo, que corresponde ao único procedimento laboratorial que permite demonstrar, com certeza, a presença dos agregados plaquetários. Assim, a PTCP corresponde a um fenómeno laboratorial *in vitro* relativamente comum, que passa por vezes despercebido na prática clínica, resultando numa errada interpretação da contagem plaquetária com consequentes decisões clínicas inapropriadas e tratamentos desnecessários.

Tendo em conta que uma significativa fração dos casos de valores de plaquetas diminuídos observados nos Laboratórios de Análises Clínicas são atribuíveis a casos de PTCP induzidas pelo EDTA, estes adaptaram-se e seguem agora algoritmos de trabalho que permitem detetar este tipo de situações, permitindo realizar um correto diagnóstico e identificação da maioria dos casos de PTCP.

A observação microscópica do esfregaço de sangue periférico, para a pesquisa de agregados plaquetários ou SP, deve ser realizada sempre que se verifique um valor diminuído de plaquetas, reportado pelo analisador automático de hematologia, não associado a sintomas e/ou sinais clínicos de trombocitopenia. A colheita posterior de uma amostra de sangue em anticoagulantes alternativos deve ser efetuada para a obtenção de uma contagem plaquetária correta, de forma a excluir a presença de PTCP induzida pelo EDTA.

A realização deste trabalho possibilitou a percepção da existência de um grande número de casos de trombocitopenias “artificiais”, e, tendo em conta as consequências de um diagnóstico errado, que incluem exames laboratoriais desnecessários exaustivos, custos adicionais e desconforto do doente, é de máxima importância realizar a sua distinção em relação às trombocitopenias verdadeiras.

Concluindo, a avaliação do doente tendo em conta a sua história clínica, familiar e a observação do respetivo esfregaço sanguíneo, correspondem a passos essenciais para a pesquisa de trombocitopenia e devem corresponder aos primeiros passos da avaliação clínica e laboratorial realizados em caso de uma contagem diminuída de plaquetas reportada pelo analisador automático de hematologia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deutsch VR ,Tomer A. *Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside*. Br J Haematol 2013; 161(6): 778-93.
2. Wen Q , Goldenson B , Crispino JD. *Normal and malignant megakaryopoiesis*. Expert Rev Mol Med 2011; 13: e32.
3. Patel SR , Hartwig JH , Italiano JE, Jr. *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest 2005; 115(12): 3348-54.
4. Machlus KR ,Italiano JE, Jr. *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol 2013; 201(6): 785-96.
5. Szalai G , LaRue AC , Watson DK. *Molecular mechanisms of megakaryopoiesis*. Cell Mol Life Sci 2006; 63(21): 2460-76.
6. Kaushansky K. *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Blood 2008; 111(3): 981-6.
7. Martin JF , Kristensen SD , Mathur A , Grove EL , Choudry FA. *The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes*. Nat Rev Cardiol 2012; 9(11): 658-70.
8. Savoia A. *Molecular basis of inherited thrombocytopenias*. Clin Genet 2016; 89(2): 154-62.
9. Daly ME. *Determinants of platelet count in humans*. Haematologica 2011; 96(1): 10-3.
10. Eto K ,Kunishima S. *Linkage between the mechanisms of thrombocytopenia and thrombopoiesis*. Blood 2016; 127(10): 1234-41.
11. Kaushansky K. *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest 2005; 115(12): 3339-47.
12. Kaushansky K. *Thrombopoietin*. N Engl J Med 1998; 339(11): 746-54.
13. Sattler M , Durstin MA , Frank DA , Okuda K , Kaushansky K , Salgia R, et al. *The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases*. Exp Hematol 1995; 23(9): 1040-8.
14. Bacon CM , Tortolani PJ , Shimosaka A , Rees RC , Longo DL , O'Shea JJ. *Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3*. FEBS Lett 1995; 370(1-2): 63-8.
15. Kaushansky K. *Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009: 147-52.
16. Vannucchi AM ,Barbui T. *Thrombocytosis and thrombosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007: 363-70.

17. Schafer AI. *Thrombocytosis*. N Engl J Med 2004; 350(12): 1211-9.
18. Harrison P. *Platelet function analysis*. Blood Rev 2005; 19(2): 111-23.
19. George JN. *Platelets*. Lancet 2000; 355(9214): 1531-9.
20. Skoda RC. *Thrombocytosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009: 159-67.
21. Bleeker JS ,Hogan WJ. *Thrombocytosis: diagnostic evaluation, thrombotic risk stratification, and risk-based management strategies*. Thrombosis 2011.
22. Sekhon SS ,Roy V. *Thrombocytopenia in adults: A practical approach to evaluation and management*. South Med J 2006; 99(5): 491-8.
23. Stasi R. *How to approach thrombocytopenia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012: 191-7.
24. Smock KJ ,Perkins SL. *Thrombocytopenia: an update*. Int J Lab Hematol 2014; 36(3): 269-78.
25. Schafer AI. *Thrombocytosis and thrombocythemia*. Blood Rev 2001; 15(4): 159-66.
26. Cazzola M. *Molecular basis of thrombocytosis*. Haematologica 2008; 93(5): 646-8.
27. Harrison CN , Bareford D , Butt N , Campbell P , Conneally E , Drummond M, *et al*. *Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis*. Br J Haematol 2010; 149(3): 352-75.
28. Gauer RL ,Braun MM. *Thrombocytopenia*. Am Fam Physician 2012; 85(6): 612-22.
29. Veneri D , Franchini M , Randon F , Nichele I , Pizzolo G , Ambrosetti A. *Thrombocytopenias: a clinical point of view*. Blood Transfus 2009; 7(2): 75-85.
30. Johnson B , Fletcher SJ , Morgan NV. *Inherited thrombocytopenia: novel Insights into megakaryocyte maturation, proplatelet formation and platelet lifespan*. Platelets 2016: 1-7.
31. Pham A ,Wang J. *Bernard-Soulier syndrome: an inherited platelet disorder*. Arch Pathol Lab Med 2007; 131(12): 1834-6.
32. Sandrock K , Knofler R , Greinacher A , Furll B , Gerisch S , Schuler U, *et al*. *Novel Mutation in Bernard-Soulier Syndrome*. Transfus Med Hemother 2010; 37(5): 278-284.
33. Tomer A , Scharf RE , McMillan R , Ruggeri ZM , Harker LA. *Bernard-Soulier syndrome: quantitative characterization of megakaryocytes and platelets by flow cytometric and platelet kinetic measurements*. Eur J Haematol 1994; 52(4): 193-200.
34. Pecci A , Biino G , Fierro T , Bozzi V , Mezzasoma A , Noris P, *et al*. *Alteration of liver enzymes is a feature of the MYH9-related disease syndrome*. PLoS One 2012; 7(4): e35986.

35. Balduini CL , Pecci A , Savoia A. *Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias*. Br J Haematol 2011; 154(2): 161-74.
36. Bosticardo M , Marangoni F , Aiuti A , Villa A , Grazia Roncarolo M. *Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome*. Blood 2009; 113(25): 6288-95.
37. Thrasher AJ. *New insights into the biology of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009: 132-8.
38. Badour K , Zhang J , Siminovitch KA. *The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation*. Immunol Rev 2003; 192: 98-112.
39. Visentin GP ,Liu CY. *Drug-induced thrombocytopenia*. Hematol Oncol Clin North Am 2007; 21(4): 685-96.
40. Carey PJ. *Drug-induced myelosuppression : diagnosis and management*. Drug Saf 2003; 26(10): 691-706.
41. Arnold DM , Nazi I , Warkentin TE , Smith JW , Toltl LJ , George JN, et al. *Approach to the diagnosis and management of drug-induced immune thrombocytopenia*. Transfus Med Rev 2013; 27(3): 137-45.
42. Assinger A. *Platelets and infection - an emerging role of platelets in viral infection*. Front Immunol 2014; 5: 649.
43. Levy AS ,Bussel J. *Immune thrombocytopenic purpura: investigation of the role of cytomegalovirus infection*. Br J Haematol 2004; 126(4): 622-3.
44. Speth C , Loffler J , Krappmann S , Lass-Flörl C , Rambach G. *Platelets as immune cells in infectious diseases*. Future Microbiol 2013; 8(11): 1431-51.
45. Cines DB ,Blanchette VS. *Immune thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med 2002; 346(13): 995-1008.
46. Khan M ,Mikhael J. *A review of immune thrombocytopenic purpura: focus on the novel thrombopoietin agonists*. J Blood Med 2010; 1: 21-31.
47. Stasi R , Evangelista ML , Stipa E , Buccisano F , Venditti A , Amadori S. *Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management*. Thromb Haemost 2008; 99(1): 4-13.
48. Bakchoul T , Zollner H , Greinacher A. *Current insights into the laboratory diagnosis of HIT*. Int J Lab Hematol 2014; 36(3): 296-305.
49. Warkentin TE. *Heparin-induced thrombocytopenia*. Hematol Oncol Clin North Am 2007; 21(4): 589-607.
50. McKenzie SE ,Sachais BS. *Advances in the pathophysiology and treatment of heparin-induced thrombocytopenia*. Curr Opin Hematol 2014; 21(5): 380-7.

51. Greinacher A. *Heparin-Induced Thrombocytopenia*. N Engl J Med 2015; 373(19): 1883-4.
52. Krzych LJ , Nowacka E , Knapik P. *Heparin-induced thrombocytopenia*. Anaesthesiol Intensive Ther 2015; 47(1): 63-76.
53. Shtalrid M , Shvidel L , Vorst E , Weinmann EE , Berrebi A , Sigler E. *Post-transfusion purpura: a challenging diagnosis*. Isr Med Assoc J 2006; 8(10): 672-4.
54. Woelke C , Eichler P , Washington G , Flesch BK. *Post-transfusion purpura in a patient with HPA-1a and GPIIb/IIIa antibodies*. Transfus Med 2006; 16(1): 69-72.
55. Welling KL , Taaning E , Lund BV , Rosenkvist J , Heslet L. *Post-transfusion purpura (PTP) and disseminated intravascular coagulation (DIC)*. Eur J Haematol 2003; 71(1): 68-71.
56. Padhi P , Parihar GS , Stepp J , Kaplan R. *Post-transfusion purpura: a rare and life-threatening aetiology of thrombocytopenia*. BMJ Case Rep 2013.
57. George JN , Sadler JE , Lammle B. *Platelets: thrombotic thrombocytopenic purpura*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002: 315-34.
58. Sadler JE , Moake JL , Miyata T , George JN. *Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004: 407-23.
59. Sarig G. *ADAMTS-13 in the Diagnosis and Management of Thrombotic Microangiopathies*. Rambam Maimonides Med J 2014; 5(4): e0026.
60. Lowe EJ ,Werner EJ. *Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome in children and adolescents*. Semin Thromb Hemost 2005; 31(6): 717-30.
61. Crawley JT ,Scully MA. *Thrombotic thrombocytopenic purpura: basic pathophysiology and therapeutic strategies*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013: 292-9.
62. O'Keefe DA ,Couto CG. *Disseminated intravascular coagulation*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1988; 18(1): 270-1.
63. Gupte SC ,Jhaveri AG. *Blood Component Utilization for Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) Cases with Respect to Underlying Condition*. Indian J Hematol Blood Transfus 2016; 32(2): 202-7.
64. Bruchim Y , Aroch I , Saragusty J , Waner T. *Disseminated intravascular coagulation*. Compend Contin Educ Vet 2008; 30(10): E3.
65. Levi M. *Disseminated intravascular coagulation: What's new?* Crit Care Clin 2005; 21(3): 449-67.
66. Hancox SH ,Smith BC. *Liver disease as a cause of thrombocytopenia*. QJM 2013; 106(5): 425-31.

67. Bergmann F ,Rath W. *The Differential Diagnosis of Thrombocytopenia in Pregnancy*. Dtsch Arztebl Int 2015; 112(47): 795-802.
68. Jodkowska A , Martynowicz H , Kaczmarek-Wdowiak B , Mazur G. *Thrombocytopenia in pregnancy - pathogenesis and diagnostic approach*. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2015; 69: 1215-21.
69. Myers B. *Diagnosis and management of maternal thrombocytopenia in pregnancy*. Br J Haematol 2012; 158(1): 3-15.
70. Goldstein KH ,Abramson N. *Efficient diagnosis of thrombocytopenia*. Am Fam Physician 1996; 53(3): 915-20.
71. Greenberg EM ,Kaled ES. *Thrombocytopenia*. Crit Care Nurs Clin North Am 2013; 25(4): 427-34.
72. Bizzaro N. *EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up*. Am J Hematol 1995; 50(2): 103-9.
73. Ozcelik F , Arslan E , Serdar MA , Yiginer O , Oztosun M , Kayadibi H, et al. *A useful method for the detection of ethylenediaminetetraacetic acid- and cold agglutinin-dependent pseudothrombocytopenia*. Am J Med Sci 2012; 344(5): 357-62.
74. Nagler M , Keller P , Siegrist D , Alberio L. *A case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon*. BMC Clin Pathol 2014; 14: 19.
75. Carrillo-Esper R. *Pseudotrombocitopenia inducida por ácido etilenodiamino-tetracético en paciente con quemaduras*. Cir Ciruj 2004; 72(4): 335-338.
76. Shabnam I , D SC , B CJ. *Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) - dependent pseudothrombocytopenia: a case report*. J Clin Diagn Res 2014; 8(10): FL03-4.
77. Fromm P ,Barak M. *Prevalence and course of pseudothrombocytopenia in outpatients*. Clin Chem Lab Med 2011; 49(1): 111-4.
78. Makris PE. *Pseudothrombocytopenia: A Rare Phenomenon*. Clin Appl Thromb Hemost 1998; 4(3): 167-169.
79. Berkman N , Michaeli Y , Or R , Eldor A. *EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature*. Am J Hematol 1991; 36(3): 195-201.
80. Akinci S. *Evaluation of pseudothrombocytopenia causes*. Basic Res. J. Clin. Sci. 2014; 3(4): 24-27.
81. Fiorin F , Steffan A , Pradella P , Bizzaro N , Potenza R , De Angelis V. *IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb*. Am J Clin Pathol 1998; 110(2): 178-83.

82. Casonato A , Bertomoro A , Pontara E , Dannhauser D , Lazzaro AR , Girolami A. *EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gplIB-IIIa*. J Clin Pathol 1994; 47(7): 625-30.
83. Banfi G , Salvagno GL , Lippi G. *The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes*. Clin Chem Lab Med 2007; 45(5): 565-76.
84. Lippi G ,Plebani M. *EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact*. Clin Chem Lab Med 2012; 50(8): 1281-5.
85. Lima-Oliveira G , Salvagno GL , Danese E , Brocco G , Guidi GC , Lippi G. *Contamination of lithium heparin blood by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): an experimental evaluation*. Biochem Med (Zagreb) 2014; 24(3): 359-67.
86. Kopcinovic LM ,Pavic M. *Platelet satellitism in a trauma patient*. Biochem Med (Zagreb) 2012; 22(1): 130-4.
87. Mourad Sde C , Takihi IY , Sandes AF. *Platelet satellitism*. Rev Bras Hematol Hemoter 2013; 35(4): 293.
88. Padayatty J , Grigoropoulos N , Gilligan D , Follows GA. *Platelet satellitism*. Eur J Haematol 2010; 84(4): 366.
89. Chakrabarti I. *Platelet satellitism: a rare, interesting, in vitro phenomenon*. Indian J Hematol Blood Transfus 2014; 30(3): 213-4.
90. Morselli M , Longo G , Bonacorsi G , Potenza L , Emilia G , Torelli G. *Anticoagulant pseudothrombocytopenia with platelet satellitism*. Haematologica 1999; 84(7): 655.
91. Xiao Y , Yu S , Xu Y. *The Prevalence and Biochemical Profiles of EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia in a Generally Healthy Population*. Acta Haematol 2015; 134(3): 177-80.
92. Cohen AM , Cycowitz Z , Mittelman M , Lewinski UH , Gardyn J. *The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers*. Haematologia (Budap) 2000; 30(2): 117-21.
93. Akbayram S , Dogan M , Akgun C , Caksen H , Oner AF. *EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a child*. Clin Appl Thromb Hemost 2011; 17(5): 494-6.
94. von dem Borne AE , van der Lelie H , Vos JJ , van der Plas-van Dalen CM , Risseeuw-Bogaert NJ , Ticheler MD, et al. *Antibodies against cryptantigens of platelets. Characterization and significance for the serologist*. Curr Stud Hematol Blood Transfus 1986; (52): 33-46.

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA MARIA
ALBERTINA**

Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, sob orientação da Dr.^a Irene Gouveia, Diretora Técnica Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas

Patrícia Ferreira de Castro

Porto, julho de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu colega de Mestrado, Paulo Aguiar, por me ter proporcionado a oportunidade de estagiar no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina, e posteriormente me ter dado a oportunidade de lá exercer a minha profissão. Agradeço-lhe também toda a disponibilidade que demonstrou para me ajudar sempre que precisei.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório, e em especial à Dr.^a Irene Gouveia, minha orientadora de estágio, por toda a paciência, ensinamentos e boa disposição no local de trabalho. Agradeço-lhe também a confiança que depositou em mim e a oportunidade que me deu.

Agradeço a todos os docentes do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo conhecimento transmitido ao longo destes dois anos.

Por fim, quero ainda agradecer a todos os meus amigos e familiares, e em especial aos meus pais e ao meu namorado, porque sem a força deles nada disto teria sido possível.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. PLANO E OBJETIVOS DO ESTÁGIO.....	1
2. LABORATÓRIO.....	3
2.1. LOCALIZAÇÃO E ENQUADRAMENTO DO LABORATÓRIO	3
2.2. CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	3
2.3. COLABORAÇÕES COM OUTRAS ENTIDADES	4
2.4. SISTEMA INFORMÁTICO DO LABORATÓRIO	4
3. FASE PRÉ-ANALÍTICA	5
3.1. INFORMAÇÕES IMPORTANTES A FORNECER AOS PACIENTES	5
3.2. COLHEITA DE SANGUE	7
3.3. SETOR DA TRIAGEM	9
4. CONTROLO DE QUALIDADE.....	11
4.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	12
4.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE	12
5. VALÊNCIA DA HEMATOLOGIA	14
5.1. HEMOGRAMA	15
5.1.1. PARÂMETROS DO HEMOGRAMA	16
5.1.2. SYSMEX XT-1800i™	17
5.2. INTERPRETAÇÃO DOS HEMOGRAMAS, HISTOGRAMAS E GRÁFICOS DE DISPERSÃO	21
5.2.1. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM ERITROCITÁRIA	22
5.2.2. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM LEUCOCITÁRIA	25
5.2.3. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM PLAQUETÁRIA.....	29
5.3. ESFREGAÇO SANGUÍNEO	29
5.3.1. COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO SANGUÍNEO	31
5.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	32

5.4.1.	VES - MATIC 20®	34
5.5.	ESTUDO DA HEMOSTASIA SANGUÍNEA.....	34
5.5.1.	AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO HEMOSTÁTICA	36
	TEMPO DE PROTROMBINA.....	36
	TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO	37
5.5.2.	START® 4 COAGULATION ANALYZER	38
5.6.	HEMOGLOBINA GLICADA.....	39
5.6.1.	CAPILLARYS™ 2 FLEX-PIERCING.....	40
5.7.	IMUNOHEMATOLOGIA.....	43
5.7.1.	TIPAGEM SANGUÍNEA – GRUPOS ABO e Rh.....	43
	SISTEMA ABO E SISTEMA Hh	43
	SISTEMA RHESUS.....	44
	DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO	44
5.7.2.	PROVA DE COOMBS.....	45
	PROVA DE COOMBS INDIRETA.....	46
5.8.	CONTROLO DE QUALIDADE	47
5.8.1.	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	47
5.8.2.	AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	47
6.	VALÊNCIA DA BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA	48
6.1.	ARCHITECT® SYSTEM.....	48
6.1.1.	METODOLOGIAS	49
6.1.2.	PARÂMETROS DETERMINADOS	51
	METABOLISMO DOS HIDRATOS DE CARBONO	51
	METABOLISMO DOS LÍPIDOS	52
	IONOGRAMA SÉRICO	54
	METABOLISMO PROTEICO	54
	METABOLISMO ÓSSEO E MINERAL	55
	METABOLISMO RENAL	56
	FUNÇÃO HEPÁTICA E BILIAR	58
	MARCADORES DE ANEMIA.....	62
	FUNÇÃO TIROIDEIA	64
	FUNÇÃO PROSTÁTICA	66
	HORMONAS SEXUAIS/FERTILIDADE	67
	SEROLOGIA DAS INFECÇÕES VÍRICAS	70

6.2.	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	75
6.2.1.	HYDRASYS®	76
6.2.2.	PROTEÍNAS SÉRICAS.....	77
6.2.3.	ALTERAÇÕES NO PROTEINOGRAMA	79
6.3.	BIOMARCADORES DE NECROSE DO MIOCÁRDIO.....	81
6.3.1.	MINI VIDAS®	82
6.4.	TÉCNICAS MANUAIS.....	83
6.4.1.	TESTES MANUAIS PARA A DETEÇÃO DE SÍFILIS	84
	<i>PROVA NÃO TREPONÉMICA PARA A DETEÇÃO SEROLÓGICA DE SÍFILIS</i>	84
	<i>TREPONEMA PALLIDUM HAEMAGGLUTINATION</i>	85
6.4.2.	OUTROS TESTES MANUAIS.....	86
6.5.	CONTROLO DE QUALIDADE – BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA.....	86
6.5.1.	CALIBRAÇÕES	86
6.5.2.	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	87
6.5.3.	AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	88
7.	VALÊNCIA DA MICROBIOLOGIA	90
7.1.	EXAME BACTERIOLÓGICO	90
7.1.1.	EXAME DIRETO/MICROSCÓPICO	91
	<i>EXAME “A FRESCO”</i>	91
	<i>EXAME APÓS COLORAÇÃO</i>	91
7.1.2.	EXAME CULTURAL.....	93
	<i>MEIOS DE CULTURA</i>	93
	<i>PRINCIPAIS TÉCNICAS DE SEMEITEIRA UTILIZADAS</i>	93
7.1.3.	TESTES BIOQUÍMICOS DE IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA.....	95
7.2.	TESTES DE IDENTIFICAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	97
7.2.1.	MICROSCAN WALKAWAY 40SI	97
7.3.	URINAS	101
7.3.1.	URINA TIPO II – ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA.....	101
	<i>AUTION MAX™ AX-4280</i>	102
	<i>EXAME FÍSICO DA URINA</i>	103
	<i>EXAME QUÍMICO DA URINA</i>	104
7.3.2.	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SEDIMENTO URINÁRIO.....	106
7.3.3.	URINAS BACTERIOLÓGICAS - INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO	111
7.4.	TRATO GENITAL FEMININO	116

7.4.1.	EXSUDADO VAGINAL.....	117
7.4.2.	EXSUDADO VAGINAL E PERIANAL NA GRÁVIDA	119
7.5.	TRATO GENITAL MASCULINO	119
7.5.1.	EXSUDADO URETRAL	120
7.5.2.	PESQUISA DE MYCOPLASMA E UREAPLASMA UROGENITAIS	120
7.6.	INFECÇÕES DA PELE E TECIDOS MOLES.....	121
7.6.1.	EXSUDADO PURULENTO	122
7.7.	TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR	123
7.7.1.	EXSUDADO NASAL	124
7.7.2.	EXSUDADO FARÍNGEO	125
7.8.	TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR.....	126
7.8.1.	EXPETORAÇÃO.....	127
7.8.2.	PESQUISA DO BACILO DE KOCH	129
7.9.	TRATO GASTROINTESTINAL	130
7.9.1.	COPROCULTURA.....	131
7.9.2.	PESQUISA DE SANGUE OCULTO NAS FEZES.....	132
7.9.3.	EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES	133
7.9.4.	GRAU DE DIGESTÃO DE FEZES	134
7.10.	ESPERMA	135
7.10.1.	ESPERMOCULTURA	135
7.10.2.	ESPERMOGRAMA.....	136
7.11.	CONTROLO DE QUALIDADE	139
7.11.1.	CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	139
7.11.2.	AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE.....	139
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
9.	ANEXOS	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plano de estágio com a respetiva distribuição do tempo em cada setor.	1
Figura 2. Localização da Clínica da Cruz Verde.	3
Figura 3. Área destinada à preparação e à triagem das diferentes amostras biológicas provenientes da enfermaria.	9
Figura 4. Representação dos diferentes constituintes do sangue.	14
Figura 5. Equipamento utilizado na realização dos hemogramas.	17
Figura 6. Mecanismo de reação do método lauril sulfato de sódio.	18
Figura 7. (A) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, onde é possível observar as diferentes populações leucocitárias que se podem distinguir através deste canal (B) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, onde é possível observar a presença de granulócitos imaturos.	20
Figura 8. Gráfico de dispersão obtido no canal WBC/BASO.	20
Figura 9. Hemograma completo obtido pelo equipamento <i>Sysmex XT-1800i™</i> , relativo a uma amostra com parâmetros dentro dos intervalos de referência.	21
Figura 10. (A) Histograma eritrocitário obtido para uma pessoa com valores dentro dos intervalos de referência. (B) Histograma eritrocitário de um paciente que apresenta macrocitose (desvio à direita) (C) Hemograma do mesmo paciente, com alerta para a presença de uma anemia macrocítica.	23
Figura 11. (A) Histograma eritrocitário normal (B) Histograma eritrocitário com desvio à esquerda (C) Hemograma do mesmo paciente, com alterações associadas a uma anemia ferropénica.	24
Figura 12. Observação do esfregaço de sangue periférico na objetiva de 40x.	25
Figura 13. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido pelo canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente com leucocitose neutrofílica, obtido pelo canal DIFF (C) Hemograma do mesmo paciente em que se confirma o número absoluto de leucócitos e neutrófilos aumentado.	26
Figura 14. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido no canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente em que é evidente um número de linfócitos aumentado (C) Hemograma do mesmo paciente em que é possível verificar a presença de um valor absoluto de leucócitos e linfócitos aumentado.	27
Figura 15. Observação de Sombras de <i>Grumpchet</i> na objetiva de 40x (rodeadas a vermelho).	28
Figura 16. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido no canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente com uma nuvem de eosinófilos mais acentuada	

(rodeada a vermelho) (C) Hemograma do mesmo paciente, que evidencia a presença de uma contagem relativa e absoluta de eosinófilos aumentada.....	28
Figura 17. Exemplificação da realização correta de um esfregaço sanguíneo.....	31
Figura 18. Fluxograma correspondente ao processo de validação dos hemogramas.....	32
Figura 19. Analisador de bancada <i>Ves-Matic 20</i> [®]	34
Figura 20. Modelo clássico da cascata de coagulação.	35
Figura 21. <i>SStart</i> [®] 4 Coagulation Analyzer.....	38
Figura 22. Diferentes subtipos de hemoglobina A.....	39
Figura 23. Equipamento <i>Capillarys</i> TM 2 <i>Flex-Piercing</i>	40
Figura 24. Eletroferograma normal.	41
Figura 25. Eletroferograma alterado.	42
Figura 26. Sistema Hh e ABO.	43
Figura 27. <i>Card DG Gel Confirm P</i> [®] utilizado para a determinação dos grupos sanguíneos (ABO e Rhesus). Podemos observar a presença de um grupo sanguíneo do tipo A negativo (5) e de um grupo AB positivo (6).....	44
Figura 28. Evolução dos diferentes marcadores serológicos durante a fase aguda da infeção pelo vírus da hepatite B com sinais de recuperação.	70
Figura 29. Evolução dos diferentes marcadores serológicos na progressão da infeção crónica pelo vírus da hepatite B..	71
Figura 30. Principais componentes estruturais e não estruturais do vírus da imunodeficiência humana. Rodeadas a vermelho encontram-se as principais proteínas utilizadas no diagnóstico laboratorial desta patologia.	74
Figura 31. Cinética dos marcadores utilizados na deteção da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana.....	75
Figura 32. Equipamento <i>HYDRASYS</i> [®] utilizado na realização da eletroforese de proteínas séricas.....	76
Figura 33. (A) Proteinograma em gel de agarose obtido pelo equipamento <i>HYDRASYS</i> [®] com o kit <i>HYDRAGEL PROTEIN (E) 7</i> (B) Representação de um perfil electroforético normal e as respetivas frações proteicas.	77
Figura 34. Equipamento <i>Mini VIDAS</i> [®] utilizado na determinação dos biomarcadores cardíacos.	82
Figura 35. Representação esquemática da técnica <i>Enzyme linked fluorescent assay</i> , utilizada pelo equipamento <i>Mini VIDAS</i> [®]	83
Figura 36. Resultado obtido no controlo positivo, com visualização de agregados (à esquerda) e no controlo negativo (à direita).	84

Figura 37. Exemplo de uma placa com várias amostras para a detecção de sífilis pela técnica <i>Treponema pallidum haemagglutination</i>	85
Figura 38. Gráfico de <i>Levey-Jennings</i> referente aos diferentes níveis de controlo de qualidade utilizados para avaliar o analito colesterol.	87
Figura 39. (A) Gráfico que representa o número de amostras enviadas, os valores obtidos ao longo do tempo e o seu desvio em relação à média. (B) Representação do número de laboratórios, tipo de metodologia utilizada e a respetiva média obtida pelos laboratórios que entraram no estudo.	89
Figura 40. Coloração de <i>Ziehl-Neelsen</i> : presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (imagem obtida no microscópio ótico, na objetiva de imersão).....	93
Figura 41. Representação da técnica de sementeira por 4 quadrantes, utilizada na inoculação em meio de cultura sólido da maioria dos produtos biológicos que chegam ao laboratório.	94
Figura 42. Representação da técnica de sementeira utilizada na inoculação das amostras de urina de forma a obter unidades formadoras de colónia isoladas e contáveis.	94
Figura 43. Algoritmo para a utilização da prova da catalase na distinção de cocos Gram-positivos.	95
Figura 44. Algoritmo para a utilização do teste do indol na identificação direta de <i>Escherichia coli</i>	96
Figura 45. Equipamento <i>MicroScan WalkAway 40SI</i> utilizado na identificação bacteriana e respetivos testes de suscetibilidade aos antibióticos.	97
Figura 46. (A) Garrafa com a solução para a realização da suspensão bacteriana e o respetivo tabuleiro de sementeira (B) Varas de inoculação (C) Sistema <i>MicroScan RENOK</i> para a transferência da suspensão bacteriana para o respetivo painel.	100
Figura 47. Circuito efetuado pelas urinas tipo II e urinas bacteriológicas após a sua receção no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina.	101
Figura 48. Algoritmo utilizado no tratamento das urinas tipo II após a sua receção/triagem.	102
Figura 49. Analisador de bancada totalmente automatizado utilizado na análise sumária das urinas.	102
Figura 50. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de leucócitos (seta vermelha) e de glóbulos vermelhos (seta azul).	106
Figura 51. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas células epiteliais de descamação.....	107

Figura 52. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de cristais de ácido úrico sob diferentes formas.....	108
Figura 53. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de cristais de oxalato de cálcio.	109
Figura 54. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosos cristais de fosfato triplo de amônio e magnésio.	109
Figura 55. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas granulações amorfas. .	110
Figura 56. Cristais de tirosina (à esquerda) e de cistina (à direita).	110
Figura 57. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas bactérias e leucócitos (rodeados a preto).....	111
Figura 58. Interpretação dos resultados obtidos no meio de cultura UriSelect™4, de acordo com os substratos cromogénicos presentes no meio e a respetiva atividade enzimática..	113
Figura 59. Exsudado vaginal: (A) Presença de colónias β-hemolíticas no meio de gelose de sangue (rodeadas a preto) (B) Aparecimento de colónias de tamanho pequeno em gelose de chocolate (da mesma amostra) (C) Presença de colónias azuis em meio CandiSelect™, permitindo apenas a realização de uma identificação presuntiva (<i>Candida</i> spp.).....	118
Figura 60. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> – resultado positivo.	119
Figura 61. Exemplo dos resultados da incubação de uma galeria após 48 horas. Neste caso é possível verificar a presença de um resultado negativo para <i>Ureaplasma</i> spp. e <i>Mycoplasma hominis</i> , pois não ocorreu mudança de cor em nenhuma das cúpulas.	121
Figura 62. Cultura positiva para a pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente no exsudado nasal, em meio de MRSASelect™4.....	124
Figura 63. Exemplo de uma cassete do teste rápido <i>bioNexia® Strep A Plus</i> , em que é possível visualizar um resultado que apesar de ténue, é considerado positivo para a pesquisa de <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo A.	126
Figura 64. Expetoração: aparecimento de uma flora polimorfa em meio de gelose de sangue, sem evidenciar nenhum tipo de bactéria em específico – flora polimorfa de contaminação inerente à passagem pelo trato respiratório superior.	129
Figura 65. Fluxograma que ilustra os diferentes passos da realização de um exame cultural de fezes.	131

Figura 66. Aparecimento de colónias suspeitas no meio de <i>Salmonella-Shigella</i> – rodeadas com o círculo preto (lactose negativas, incolores e sem centro negro – possível <i>Shigella</i> spp.).....	132
Figura 67. Exemplo de um resultado positivo para a presença de hemoglobina nas fezes.	133
Figura 68. Presença de grãos de pólen nas fezes (rodeados a preto).....	134
Figura 69. Exame a fresco de fezes - presença de ovos de <i>Enterobius vermicularis</i> (rodeados com o círculo vermelho).	134
Figura 70. Representação esquemática da câmara de Neubauer (profundidade de 0,1 mm). A vermelho encontram-se os quadrantes onde se realiza a contagem dos espermatozoides.	138

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tubos de colheita utilizados consoante o tipo de análise requisitada	8
Tabela 2. Tempo de centrifugação aplicável aos diferentes produtos biológicos	10
Tabela 3. Triagem dos produtos referentes ao setor da Hematologia	10
Tabela 4. Diferentes parâmetros determinados no setor da Hematologia e a respetiva metodologia utilizada na sua determinação.....	15
Tabela 5. Principais parâmetros determinados pelo equipamento Sysmex XT-1800i™ ..	16
Tabela 6. Reagentes utilizados pelo canal DIFF para a diferenciação leucocitária	19
Tabela 7. Classificação morfológica das anemias.....	22
Tabela 8. Parâmetros determinados em conjunto com a realização do hemograma. A vermelho encontram-se os parâmetros alterados.....	24
Tabela 9. Diferentes parâmetros determinados em conjunto com o hemograma. A vermelho encontram-se os parâmetros alterados.....	25
Tabela 10. Fatores a ter em conta no estudo microscópico das diferentes linhagens celulares.....	30
Tabela 11. Diferentes fatores responsáveis pela alteração dos valores de velocidade de sedimentação e respetivas patologias associadas	33
Tabela 12. Interpretação dos possíveis resultados obtidos nos cards DG Gel Confirm P® para o sistema ABO	45
Tabela 13. Interpretação dos possíveis resultados obtidos nos cards DG Gel Confirm P® para o sistema Rhesus.....	45
Tabela 14. Monitorização e periodicidade do controlo de qualidade interno diário efetuado nos vários equipamentos presentes no setor da Hematologia.....	47

Tabela 15. Equipamentos presentes na valência da Bioquímica/Imunologia e a respetiva metodologia utilizada.....	48
Tabela 16. Diferentes parâmetros analíticos determinados no equipamento ARQUITECT® System ci8200.....	48
Tabela 17. Descrição do fundamento das diferentes metodologias aplicadas pelo equipamento ARQUITECT® System ci8200.....	50
Tabela 18. Situações associadas a alterações dos níveis séricos de glicose.....	51
Tabela 19. Critérios para a realização do diagnóstico de diabetes mellitus e diabetes gestacional.....	52
Tabela 20. Características e considerações clínicas das diferentes lipoproteínas determinadas no laboratório.....	53
Tabela 21. Características e considerações clínicas referentes aos eletrólitos incluídos no ionograma sérico.....	54
Tabela 22. Situações associadas a alterações nos níveis séricos de proteínas totais	55
Tabela 23. Características e considerações clínicas dos principais iões relacionados com o metabolismo ósseo e mineral.....	56
Tabela 24. Características e considerações clínicas de alguns parâmetros doseados no laboratório para a avaliação da função renal.....	57
Tabela 25. Parâmetros laboratoriais utilizados na avaliação da função hepática e biliar.	59
Tabela 26. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da lesão hepatocelular	59
Tabela 27. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da colestase hepática.....	60
Tabela 28. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da capacidade funcional do fígado	62
Tabela 29. Características e interpretação clínica dos diferentes parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro.....	63
Tabela 30. Características e interpretação clínica dos diferentes parâmetros utilizados no diagnóstico de anemias megaloblásticas	64
Tabela 31. Características e interpretação clínica dos níveis séricos de hormonas tiroideias	65
Tabela 32. Interpretação e aplicação clínica da determinação dos níveis de antigénio específico da próstata total e livre no soro	67
Tabela 33. Interpretação e aplicação clínica da determinação sérica da hormona gonadotrofina coriónica humana	68

Tabela 34. Características e interpretação clínica dos parâmetros determinados na avaliação da função reprodutora feminina e masculina	68
Tabela 35. Marcadores serológicos utilizados no diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B.....	71
Tabela 36. Principais perfis serológicos de uma infecção pelo vírus da hepatite C.....	73
Tabela 37. Composição das diferentes frações proteicas visualizadas na eletroforese de proteínas séricas em gel	77
Tabela 38. Características das diferentes frações separadas por eletroforese em gel e as diferentes situações clínicas que podem estar associadas a alterações na sua concentração.....	78
Tabela 39. Padrões eletroforéticos característicos de algumas patologias	80
Tabela 40. Descrição e aplicação clínica dos marcadores cardíacos determinados no laboratório.....	82
Tabela 41. Descrição e fundamento de outros testes serológicos manuais	86
Tabela 42. Periodicidade da calibração dos equipamentos utilizados no setor da Bioquímica/Imunologia	87
Tabela 43. Monitorização e periodicidade da realização dos controlos de qualidade diários efetuados nos diferentes equipamentos do setor da Bioquímica/Imunologia.....	88
Tabela 44. Equipamentos disponíveis no setor da Microbiologia	90
Tabela 45. Características morfológicas e aspeto das diferentes bactérias após realização da coloração de Gram (objetiva de imersão)	92
Tabela 46. Principais painéis MicroScan® utilizados no laboratório para a identificação bacteriana e respetivos testes de suscetibilidade aos antibióticos.....	98
Tabela 47. Informações importantes a introduzir no software LabPro de acordo com o painel MicroScan® utilizado	99
Tabela 48. Métodos e respetivos princípios de funcionamento utilizados na determinação dos vários parâmetros fornecidos pelo Aution MAX™ AX-4280	103
Tabela 49. Situações mais comuns associadas ao aparecimento das diferentes cores da urina.....	103
Tabela 50. Interpretação dos resultados obtidos para os parâmetros químicos determinados pelo equipamento Aution MAX™ AX-4280.....	104
Tabela 51. Classificação dos diferentes tipos de cristais, de acordo com o pH urinário	108
Tabela 52. Principais microrganismos envolvidos nas infeções do trato urinário de ambiente hospitalar e na comunidade em geral	112

Tabela 53. Aspeto dos microrganismos mais frequentemente isolados neste meio e respetivos painéis MicroScan® utilizados na confirmação da identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos	113
Tabela 54. Critérios de classificação das contagens de colónias nas amostras de urina semeadas no meio de cultura UriSelect™4	115
Tabela 55. Diversas situações clínicas possíveis e a respetiva interpretação clínica	115
Tabela 56. Microrganismos associados à flora comensal microbiana do trato genital feminino	116
Tabela 57. Microrganismos envolvidos nas infeções do trato genital feminino através de transmissão por via sexual	117
Tabela 58. Características dos principais microrganismos isolados nos diferentes meios de cultura utilizados para a sementeira do exsudado vaginal.....	118
Tabela 59. Alguns dos microrganismos pertencentes à flora normal da pele	122
Tabela 60. Principais microrganismos da flora bacteriana residente do trato respiratório superior	123
Tabela 61. Microrganismos mais frequentemente associados a infeções do trato respiratório inferior	127
Tabela 62. Classificação da qualidade da expetoração segundo Murray e Washington	128
Tabela 63. Características dos principais microrganismos encontrados na expetoração durante a realização do estágio	128
Tabela 64. Microrganismos pertencentes à flora comensal do trato gastrointestinal	130
Tabela 65. Características das colónias suspeitas no meio de Salmonella-Shigella e xilose-lisina-desoxicolato	131
Tabela 66. Diferentes elementos que podem ser encontrados durante a realização desta análise.....	134
Tabela 67. Principais microrganismos associados a infeção do trato genital masculino	135
Tabela 68. Características macroscópicas incluídas na avaliação do sémen.....	136
Tabela 69. Monitorização e periodicidade de realização dos controlos de qualidade internos diários no setor da Microbiologia	139
Tabela 70. Periodicidade, nº de amostras e tipo de material rececionado para a realização da avaliação externa da qualidade	139

LISTA DE ABREVIATURAS

↑ – Aumento

↓ – Diminuição

[] – Concentração

Ac – Anticorpos

Ac anti-HBc – Anticorpos anti-antigénio do *core* do vírus da hepatite B

Ac anti-HBe – Anticorpos anti-antigénio de replicação viral do vírus da hepatite B

Ac anti-HBs – Anticorpos anti-antigénio de superfície do vírus da hepatite B

AEQ – Avaliação externa da qualidade

Ag – Antigénios

AGH – Antiglobulina humana

AgHBc – Antigénio do *core* do vírus da hepatite B

AgHBe – Antigénio de replicação viral do vírus da hepatite B

AgHBs – Antigénio de superfície do vírus da hepatite B

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BASO – Basófilos

BK – Bacilo de *Koch*

Ca²⁺ – Iões cálcio

CAPM – Cininogénio de alto peso molecular

CK-MB – Isoenzima MB da creatina quinase (*creatine kinase MB isoenzyme*)

Cl⁻ – Iões cloreto

CMI – Concentração mínima inibitória

CMIA – Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (*chemiluminescent microparticles immunoassay*)

CQI – Controlo de qualidade interno

CT – Colesterol total

CTFF – Capacidade total de fixação do ferro

cTnI – Isoforma cardioespecífica da troponina I (*cardiac troponin isoform I*)

DCV – Doença cardiovascular

DG – Diabetes gestacional

DGS – Direção Geral de Saúde

DHRN – Doença hemolítica do recém-nascido

DMACA – Dimetilaminocinamaldeído

EAM – Enfarte agudo do miocárdio

EBV – Vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

EC – Eletroforese capilar

ELFA – *Enzyme linked fluorescent assay*

EO – Eosinófilos

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogénica (*enteropathogenic Escherichia coli*)

EZ – Espermatozoides

FA – Fosfatase alcalina

Fe²⁺ – Ferro na forma ferrosa

Fe³⁺ – Ferro na forma férrica

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FPC – Flora polimorfa de contaminação

FSC – Dispersão frontal (*forward scatter*)

FSH – Hormona folículo-estimulante (*follicle-stimulating hormone*)

FT – Fator tecidual

FUT-1 – Fucosiltransferase

GC – Gelose de chocolate

GGT – Gama-glutamil transferase

GI – Granulócitos imaturos

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas (*gonadotropin-releasing hormone*)

GS – Gelose de sangue

GV – Glóbulos vermelhos

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

H₂S – Sulfeto de hidrogénio

Hb – Hemoglobina

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

HbG – Hemoglobina

HBV – Vírus da hepatite B (*hepatite B virus*)

hCG – Gonadotrofina coriônica humana (*human chorionic gonadotropin*)

HCT – Hematócrito

HCV – Vírus da hepatite C (*hepatite C virus*)

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein*)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus*)

ICT – Tecnologia de chip integrado (*integrated chip technology*)

ID – Identificação

IFCC – *International Federation of Clinical Chemistry*

Ig – Imunoglobulinas

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISI – Índice de sensibilidade internacional

ITU – Infecções do trato urinário

K⁺ – Iões potássio

K₃EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (*tri-potassium ethylenediaminetetraacetic acid*)

LDH – Lactato desidrogenase

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

LH – Hormona luteína-estimulante (*luteinizing hormone*)

LPCMA – Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina

LYMPH – Linfócitos (*lymphocyte*)

MAC – Mestrado em Análises Clínicas

MCH – Hemoglobina globular média (*mean corpuscular hemoglobin*)

MCHC – Concentração de hemoglobina globular média (*mean corpuscular hemoglobin concentration*)

MCV – Volume globular médio (*mean corpuscular volume*)

Mo – Microscópico ótico

MO – Medula óssea

MONO – Monócitos

MPV – Volume plaquetário médio (*mean platelet volume*)

MRSA – *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

Na⁺ – Iões sódio

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

NEUT – Neutrófilos

NGSP/DCCT – *National Glycohemoglobin Standardization Program/Diabetes Control and Complications*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C-reativa

PCT – Plaquetócrito

PDW – Amplitude de distribuição das plaquetas (*platelet distribution width*)

P-LCR – Percentagem de plaquetas gigantes (*platelet large cell ratio*)

PLT – Plaquetas

PSA – Antígeno específico da próstata (*prostate-specific antigen*)

PSO – Pesquisa de sangue oculto

PT – Proteínas totais

PTGO – Prova de tolerância à glicose oral

PTH – Paratormona (*parathyroid hormone*)

PVS – Suplemento polivitamínico (*polyvitaminic supplement*)

RBC – Glóbulos vermelhos (*red blood cells*)

RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos (*red cell distribution width*)

Rh – Rhesus

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNI – Razão normalizada internacional

rpm – Rotações por minuto

RPR – *Rapid Plasma Reagin*

SFL – Fluorescência lateral (*side fluorescent light*)

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SLS – Lauril sulfato de sódio (*sodium lauryl sulfate*)

SS – *Salmonella-Shigella*

SSC – Dispersão lateral (*side scatter*)

T₃ – Triiodotironina

T₄ – Tiroxina

TDA – Triptofano deaminase

TFG – Taxa de filtração glomerular

Tg – Tioglobulina

TG – Triglicerídeos

TP – Tempo de protrombina

TPHA – *Treponema pallidum haemagglutination*

TPO – Peroxidase da tiroide (*thyroid peroxidase*)

TRH – Hormona libertadora da tireotrofina (*thyrotropin-releasing hormone*)

TRI – Trato respiratório inferior

TRS – Trato respiratório superior

TSA – Testes de suscetibilidade aos antibióticos

TSH – Hormona estimulante da tiroide (*thyroid-stimulating hormone*)

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativado

UFC – Unidades formadoras de colónias

UK NEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*)

VS – Velocidade de sedimentação

WBC – Glóbulos brancos (*white blood cells*)

XLD – Xilose-lisina-desoxicolato

ZN – *Ziehl-Neelsen*

1. PLANO E OBJETIVOS DO ESTÁGIO

No período compreendido entre 4 de janeiro de 2016 e 31 de março de 2016, realizei o estágio no âmbito da unidade curricular estágio profissional, integrada no MAC da FFUP. Durante cerca de 3 meses, e num total de 460 horas, passei pelas 3 valências existentes no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina (LPCMA) e também pelas colheitas, sob orientação da Diretora Técnica Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas, Dr.^a Irene Gouveia. A figura 1 representa o tempo aproximado que eu passei em cada um dos diferentes setores.

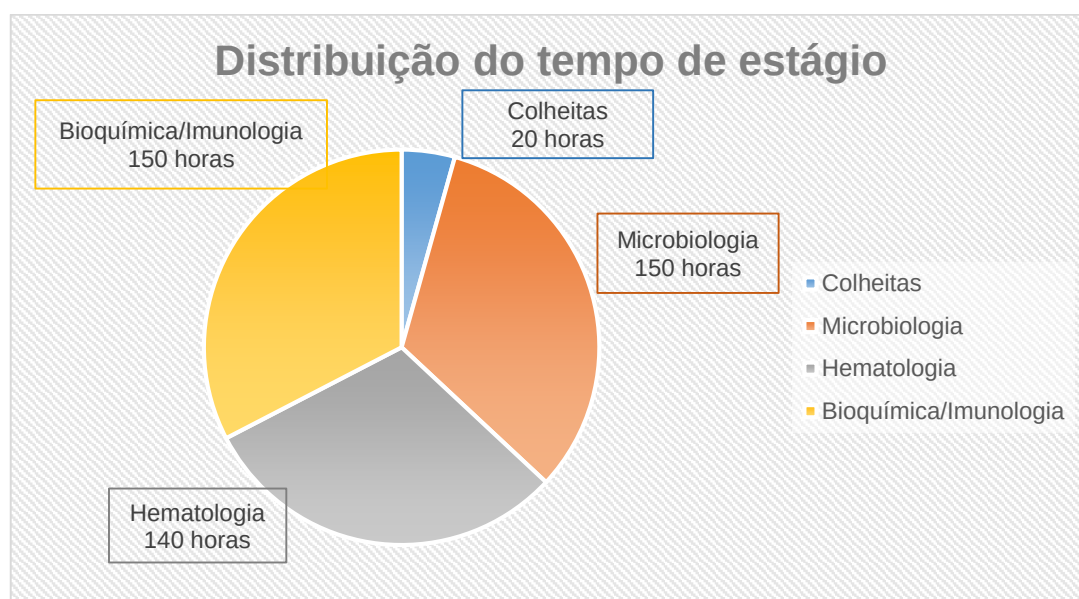


Figura 1. Plano de estágio com a respetiva distribuição do tempo em cada setor.

O presente Relatório de Estágio visa descrever todas as atividades laboratoriais que acompanhei e realizei durante os cerca de 3 meses de estágio profissional decorridos no LPCMA. Laboratório no qual, desde junho de 2016, exerço a atividade profissional de Técnica de Análises Clínicas. Durante o decorrer do estágio, acompanhei as valências da Bioquímica/Imunologia, Hematologia e Microbiologia, para além de ter tido a oportunidade de observar e realizar colheitas de sangue.

O Relatório de Estágio encontra-se dividido pelas diferentes áreas referidas, e em cada uma delas apresento o fundamento teórico, os princípios das técnicas utilizadas, os diferentes parâmetros analisados e também a interpretação dos dados laboratoriais.

A concretização deste estágio profissional permitiu-me consolidar os conceitos teóricos adquiridos ao longo do MAC, possibilitando-me aprofundar o fundamento das diferentes técnicas utilizadas, melhorando também a minha compreensão acerca do funcionamento dos variados equipamentos usados nas diferentes áreas laboratoriais. Este estágio

permitiu-me assim enriquecer de forma profissional e pessoal, na medida em que tive a oportunidade de contactar com outros profissionais de saúde, adquirir conhecimentos num contexto real de trabalho, desenvolver a capacidade de trabalho em grupo e também de trabalho autónomo, sendo que no final do estágio já me sentia capaz de realizar as tarefas diárias executadas num Laboratório de Análises Clínicas.

2. LABORATÓRIO

2.1. LOCALIZAÇÃO E ENQUADRAMENTO DO LABORATÓRIO

O LPCMA foi inaugurado recentemente, em março de 2015, encontrando-se inserido na Clínica da Cruz Verde, localizada na Alameda Dr. Alfredo Pimenta em Guimarães (figura 2).

Assim, a maioria das amostras processadas no laboratório são provenientes das colheitas efetuadas no contexto da Clínica, na sala dos Enfermeiros. Para além disso, o laboratório possui ainda um posto de colheitas associado, que se encontra localizado na freguesia de São Torcato, em Guimarães.

Apesar da Clínica se encontrar aberta 24 horas/dia, o laboratório encontra-se aberto ao público, de segunda a sexta-feira, das 9:00h às 18:00h, encerrando às 16h aos sábados. No entanto, as colheitas efetuadas na sala de Enfermagem iniciam-se às 8:00h.

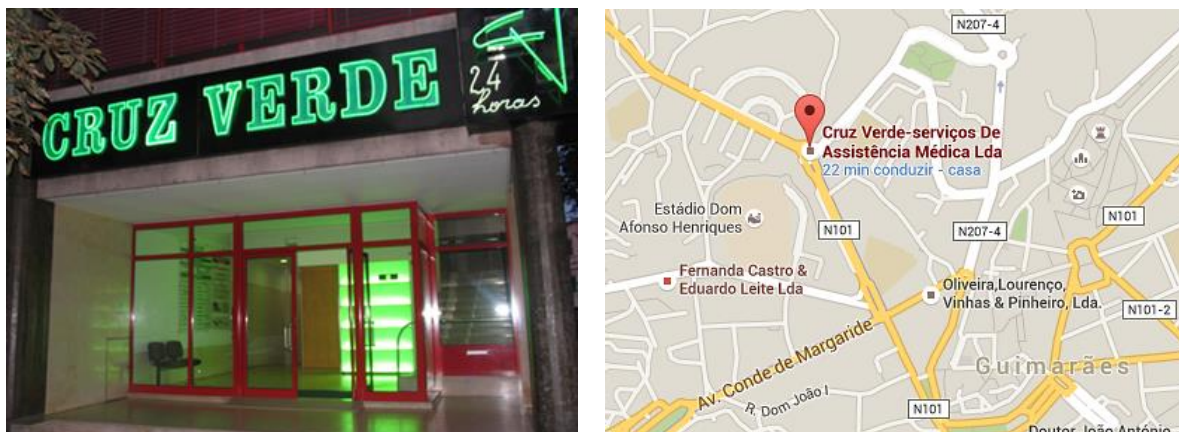


Figura 2. Localização da Clínica da Cruz Verde.

2.2. CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O LPCMA encontra-se em fase de expansão, rececionando em média cerca de 50 amostras diárias. A equipa do laboratório é constituída por 3 elementos, incluindo uma Diretora Técnica e duas Técnicas de Análises Clínicas.

O laboratório divide-se essencialmente em 4 zonas: sala da triagem; sala da Hematologia e da Bioquímica/Imunologia, onde se encontram os diferentes equipamentos utilizados nestas valências; sala da Microbiologia, onde se encontra a câmara de fluxo laminar e a estufa; e sala de apoio, onde se encontram os contentores para o lixo biológico e as bancas para a lavagem do material utilizado. A sala de colheitas e a zona da receção, onde se efetuam as colheitas e o atendimento dos utentes, encontram-se inseridas no contexto da Clínica.

No LPCMA encontra-se implementado um sistema de trabalho rotativo quadrimestral, que permite às pessoas do laboratório exercerem as suas funções em todas as áreas presentes no mesmo, de modo a permanecerem atualizadas ao longo do tempo.

2.3. COLABORAÇÕES COM OUTRAS ENTIDADES

Quando determinada análise laboratorial não é efetuada no LPCMA, ou no caso de haver impossibilidade por parte do laboratório em realizar algum teste ou análise laboratorial, essas amostras em questão são encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa em Penafiel ou para a CERBA *International* com sede em Espanha.

O laboratório assegura a qualidade final dos resultados através da realização do controlo de qualidade interno (CQI) e pela participação em programas de avaliação externa da qualidade (AEQ), como o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) e o UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

2.4. SISTEMA INFORMÁTICO DO LABORATÓRIO

Os serviços do laboratório encontram-se completamente informatizados, existindo ligações diretas entre os equipamentos e os computadores, o que possibilita a informatização dos serviços desde a abertura dos processos dos utentes até à emissão dos respetivos boletins analíticos. Atualmente, o laboratório possui diversos equipamentos automatizados que dispõem de programas informáticos de extrema importância para a rotina do laboratório.

O principal programa informático de apoio, denominado *APOLLO*®, é muito importante em todo o processo analítico, correspondendo a um sistema de gestão global do laboratório, que permite integrar em suporte informático todos os resultados analíticos gerados, possibilitando realizar o registo dos pacientes, realizar a entrada e referir as faltas dos diferentes produtos biológicos, realizar a gestão diária do trabalho com emissão de listas de trabalho e efetuar a validação biopatológica dos resultados, permitindo ainda o envio dos mesmos diretamente para os pacientes.

Em conjunto com este programa, o laboratório possui ainda o *software* MULTIQC que é muito útil, principalmente para a gestão do CQI diário.

3. FASE PRÉ-ANALÍTICA

A fase pré-analítica corresponde ao período que antecede o processamento e a análise laboratorial propriamente dita, compreendendo a solicitação da análise pelo paciente/clínico; o registo do paciente na receção e a sua preparação; a anamnese, para perceber se existem fatores que possam interferir nos resultados laboratoriais; a colheita da amostra e a respetiva identificação; o transporte das amostras biológicas ao laboratório; e, por fim, a realização da sua triagem. Para a identificação das amostras são utilizados códigos de barras que possuem o nome do paciente e a respetiva análise laboratorial a efetuar.

A fase pré-analítica é responsável por grande parte dos erros atribuídos aos Laboratórios de Análises Clínicas, devido ao fator humano associado, podendo originar resultados inexatos e imprecisos. Em seguida, são descritas algumas das principais etapas, procedimentos e cuidados a ter na fase pré-analítica.

3.1. INFORMAÇÕES IMPORTANTES A FORNECER AOS PACIENTES

ANÁLISES DE ROTINA

Uma grande parte das análises de rotina efetuadas, incluindo a determinação dos níveis de glicose, colesterol, lipoproteínas, triglicerídeos, entre outras, requer que os pacientes respeitem um jejum de 8 a 12 horas. Para além disso, deve informar-se o paciente para evitar realizar esforços físicos, fumar, consumir café ou bebidas alcoólicas, nas 2 a 4 horas que antecedem a colheita de sangue, pois estas condições podem originar alterações nos diferentes resultados analíticos.

URINA TIPO II

O doente deverá preferencialmente colher a 1ª urina da manhã, ou se não for possível, colher a urina após ter estado, pelo menos, 2 horas sem urinar. A sua entrega e análise deve ser efetuada o mais rapidamente possível, já que existem elementos na urina que sofrem alterações com o tempo.

URINA BACTERIOLÓGICA

É recomendado ao paciente que colha a 1ª urina da manhã, após realizar a higiene da região genital. O utente deve rejeitar o 1º jato de urina e colher o jato intermédio diretamente para um recipiente esterilizado, voltando a rejeitar a última parte do jato urinário. Se não for possível entregar de imediato no laboratório, a urina deve permanecer refrigerada.

URINA 24 HORAS

Para este tipo de análise laboratorial é fornecido ao paciente um recipiente próprio onde, tendo em conta o tipo de análise a efetuar, se encontra ou não um conservante específico. Para a determinação da microalbuminúria, creatinina urinária e proteínas totais na urina, utiliza-se o conservante azida sódica, enquanto que, para a realização do ionograma urinário, determinação dos níveis de ureia, ácido úrico e cortisol na urina, não é necessária a presença de qualquer conservante.

É indicado ao paciente que preferencialmente de manhã, para facilitar o procedimento, realize o esvaziamento da bexiga, desprezando este volume de urina e marcando a hora em que o fez. A partir deste momento, o paciente deve colher toda a urina da manhã, tarde e noite, colhendo por fim a urina do dia seguinte aproximadamente à mesma hora em que foi esvaziada, pela primeira vez, a bexiga no dia anterior. A urina deve ser mantida em local refrigerado até ser entregue no laboratório.

URINA OCASIONAL

Quando é utilizada uma urina ocasional para a determinação dos níveis de ureia, albumina, ácido úrico ou outros parâmetros determinados na urina, é recomendado ao paciente que entregue de preferência a 1ª urina da manhã num recipiente próprio fornecido pelo laboratório.

PESQUISA DE SANGUE OCULTO

Geralmente os clínicos pedem a colheita de 3 amostras fecais em 3 dias consecutivos, para aumentar a probabilidade de deteção de sangramentos intermitentes dos pólipos ou de uma distribuição não homogénea de sangue nas fezes.

Deve informar-se todos os pacientes que não devem fazer esta colheita em caso de hemorroides ou se estiverem a tomar anti-inflamatórios não esteroides. Deve indicar-se ainda às pacientes do sexo feminino, que não devem realizar esta colheita durante o período menstrual, para evitar contaminação da amostra e uma errada interpretação dos resultados.

COPROCULTURA

Geralmente o clínico pede a colheita de 3 amostras fecais, normalmente de dias consecutivos, que devem ser transportadas para o laboratório num recipiente próprio esterilizado, de preferência num período máximo de 24 horas.

Deve informar-se o paciente de que não deve usar laxantes para colher as fezes, e pedir informação acerca de possíveis antibióticos que esteja a tomar.

EXAME PARASITOLÓGICO

O clínico geralmente pede a colheita de três amostras fecais em dias consecutivos. Nalguns casos específicos, o clínico aconselha a recolha de fezes em dias não consecutivos, pois alguns parasitas apresentam uma excreção intermitente, com períodos negativos, como por exemplo, a *Giardia lamblia*.

OUTRAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A colheita de outras amostras biológicas, como exsudado vaginal, uretral, purulento, faríngeo, entre outras, são geralmente solicitadas para pesquisas específicas e a sua colheita é, geralmente, um ato médico.

3.2. COLHEITA DE SANGUE

A colheita de amostras sanguíneas é uma das atividades mais importantes efetuadas num Laboratório de Análises Clínicas, na medida em que pode afetar a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos. As amostras destinadas a exames laboratoriais no LPCMA, são colhidas na sala de Enfermagem da Clínica da Cruz Verde e no posto de colheitas existente em São Torcato.

Esta fase do estágio revelou-se muito interessante e importante, na medida em que me permitiu identificar os principais cuidados a ter na abordagem aos pacientes e na colheita propriamente dita.

TUBOS DE COLHEITA

Os tubos para a colheita de sangue utilizados no LPCMA são de plástico e possuem tampas com cores diferentes, que são padronizadas internacionalmente pela Norma ISO 6710:1995. No rótulo de cada tubo existe uma indicação do volume de amostra de sangue que deve ser colhido.

A cor da tampa permite identificar de imediato o tipo de anticoagulante ou tratamento que o tubo de colheita recebeu. Na tabela 1 encontram-se representados os principais tubos de colheita utilizados durante o estágio.

Tabela 1. Diferentes tubos de colheita utilizados consoante o tipo de análise requisitada

Cor da tampa	Anticoagulante	Amostra obtida	Setor e parâmetros
	K ₃ EDTA	Sangue total	Hematologia/Imunohematologia – hemograma, HbA _{1c} , grupos sanguíneos (ABO e Rhesus).
	Gel separador com ativador de coágulo	Soro	Bioquímica/Imunologia – metabolitos, eletrólitos, enzimas, proteínas, hormonas, serologia da hepatite e VIH, marcadores tumorais.
	Citrato de sódio, na proporção de 1:9	Plasma	Hematologia – estudo da coagulação (TP e TTPa).
	Citrato de sódio, na proporção de 1:4	Sangue total	Hematologia – confirmação da contagem de plaquetas (a pedido do laboratório).
	Oxalato de potássio/fluoreto de sódio	Soro	Bioquímica – PTGO.
	Ativador de coágulo	Soro	Imunohematologia – Prova de Coombs direta e indireta.
	Tubo Vacu-Tec Citrato de sódio na proporção de 1:4	Sangue total	Hematologia – velocidade de sedimentação.

Abreviaturas: HbA_{1c}, hemoglobina glicada; K₃EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico; PTGO, prova de tolerância à glicose oral; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativado; VIH, vírus da imunodeficiência humana.

TÉCNICA DE COLHEITA

A colheita das amostras de sangue é realizada por punção venosa, utilizando um sistema de *vacutainer* (sistema de vácuo).

Após colocar as luvas, o Técnico de Análises Clínicas ou o Enfermeiro, deve posicionar o garrote no braço do paciente acima da zona a puncionar, pedindo também que o utente feche a mão, de forma a limitar o fluxo venoso e seleccionar uma veia palpável. Depois de seleccionada a veia, desinfeta-se o local a puncionar com algodão embebido em álcool a 70%, e introduz-se a agulha com o bísel virado para cima num ângulo de 15 a 45°.

De seguida, procede-se à colheita do volume de sangue necessário à realização dos exames, para os respetivos tubos devidamente identificados, e antes de terminar a

colheita, alivia-se o garrote. Finda a colheita, deve retirar-se a agulha e pressionar com algodão a zona da punção.

A ordem aconselhada de introdução dos tubos de colheita para a extração de sangue, de forma a não existir interferência dos anticoagulantes nas determinações a efetuar, é: tubo de soro, tubo de coagulação, tubo de EDTA, tubo de oxalato de potássio/fluoreto de sódio e restantes tubos. À medida que forem preenchidos os tubos de colheita, deve proceder-se à sua homogeneização de forma suave, para que ocorra a mistura correta entre o anticoagulante e a amostra de sangue.

O braço do paciente não deve ficar garrotado por mais de um minuto, para evitar a estase sanguínea, que pode conduzir a hemoconcentração e por consequência a falsos resultados. É ainda importante referir que o respeito pela proporção volume de sangue/concentração de anticoagulante, que se verifica no ato da colheita, é essencial para a obtenção de resultados aceitáveis, pois uma alteração nas proporções corretas pode originar alterações morfológicas nas células sanguíneas.

3.3. SETOR DA TRIAGEM

No setor da triagem é efetuada a receção, preparação e separação das amostras biológicas para os diferentes setores (figura 3), nos quais se efetuam as análises laboratoriais que vão ser abordadas neste Relatório de Estágio.



Figura 3. Área destinada à preparação e à triagem das diferentes amostras biológicas provenientes da enfermaria.

As diferentes amostras biológicas chegam em malas térmicas, onde são transportadas da sala de colheitas até ao laboratório propriamente dito, que se encontra localizado no mesmo edifício da Clínica da Cruz Verde. De seguida, é realizada a sua triagem, ou seja, dá-se entrada dos diferentes produtos no sistema informático *APPOLO*[®], através do código de barras existente em todas as amostras. Após dada a entrada a todos os produtos

biológicos, estes são centrifugados, se necessário, (tabela 2) e/ou colocados nos respectivos suportes para seguirem para os diferentes setores.

Tabela 2. Tempo de centrifugação aplicável aos diferentes produtos biológicos

Tubo	Tempo de centrifugação	Rpm
	15 minutos	3800 rpm
		
		
	10 minutos	1500 rpm

Abreviaturas: rpm, rotações por minuto.

É ainda, neste setor, que se analisam as condições das amostras biológicas rececionadas antes de se iniciar o seu processamento. São rejeitadas as amostras que não estiverem devidamente identificadas, que cheguem indevidamente acondicionadas (recipientes não estéreis, amostras mal vedadas e com derramamento de produto), que apresentem hemólise e/ou lipemia acentuada, ou se as proporções de volume de sangue/concentração de anticoagulante não forem respeitadas.

HEMATOLOGIA

A separação dos diferentes tubos de colheita, no setor da Hematologia, é realizada de acordo com a determinação a efetuar, como se encontra representado na tabela 3.

Tabela 3. Triagem dos produtos referentes ao setor da Hematologia

Tubo	K ₃ EDTA			Citrato de sódio	Ves-Tec tube
Análise	Hemograma	HbA _{1c}	Hemograma + HbA _{1c}	Coagulação	VS
Centrifugação	Não			Sim	Não
Equipamento	Sysmex XT-1800i TM	Capillarys TM	1º) Sysmex XT-1800i TM 2º) Capiyllarys TM	STart [®] 4 Analyzer	Ves-Matic 20 [®]

Abreviaturas: HbA_{1c}, hemoglobina glicada; K₃EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico; VS, velocidade de sedimentação.

Os tubos com ativador de coágulo, que se destinem à realização da Prova de Coombs, são centrifugados, utilizando-se o soro para a realização do teste por uma técnica manual. Retira-se ainda uma lista de trabalho para verificar se existe algum grupo sanguíneo para determinar.

BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA

Depois de centrifugadas as amostras, e por uma questão de logística, entram primeiro no equipamento *ARCHITECT System ci8200*, os tubos de colheita que possuírem pedidos de Imunologia, visto que estas determinações têm um tempo de realização mais demorado. Retiram-se também as listas de trabalho para verificar se existem proteinogramas para efetuar, amostras para determinação de marcadores cardíacos ou técnicas manuais para realizar.

MICROBIOLOGIA

No setor da Microbiologia, separam-se as urinas tipo II das urinas bacteriológicas, entrando ambas no equipamento *Auxion MAX™ AX-4280*.

As fezes são também separadas de acordo com o tipo de determinação requisitada pelo clínico, que pode incluir a pesquisa de sangue oculto nas fezes, exame parasitológico, exame bacteriológico e/ou grau de digestão das fezes.

Os restantes produtos que chegam ao setor da Microbiologia, como exsudados vaginais, expetorações, zaragatoas nasais, entre outros, são colocados na câmara de fluxo laminar, para posteriormente se proceder à sementeira nos respetivos meios de cultura e, se necessário, efetuar um exame a fresco ou algum tipo de coloração diferencial.

A meio do dia, retira-se ainda uma lista de trabalho para efetuar a triagem dos produtos que seguem para os laboratórios externos (Laboratório Vale do Sousa e CERBA).

4. CONTROLO DE QUALIDADE

Um Laboratório de Análises Clínicas deve assegurar que os resultados obtidos reflitam, de forma fidedigna e consistente, a situação clínica apresentada pelos pacientes, assegurando que não representem o resultado de alguma interferência no processo.

A garantia da qualidade permite obter o domínio da organização de todas as tarefas que conduzam à qualidade, abrangendo obrigatoriamente as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, incluindo também os procedimentos de controlo.

O controlo de qualidade laboratorial é geralmente dividido em dois grupos, incluindo o CQI (intralaboratorial) e a AEQ (interlaboratorial). Ambos os processos têm como objetivo monitorizar continuamente os parâmetros de precisão e exatidão dos métodos

implementados no laboratório, de forma a assegurar que, em qualquer momento, os resultados apresentem níveis de qualidade compatíveis com a utilização clínica desejada.

4.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O CQI corresponde a um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório, com o objetivo de realizar o controlo de qualidade e monitorização dos resultados à medida que as análises laboratoriais são efetuadas. É um processo essencial para a deteção de anomalias, avaliação de erros e a sua imediata correção.

Esta monitorização dos procedimentos técnicos é realizada através da padronização correta dos diferentes procedimentos, incluindo todos os processos desde a solicitação médica até à libertação do respetivo boletim analítico.

Apesar dos fatores pré-analíticos serem difíceis de monitorizar, os erros nesta fase podem ser diminuídos pela instrução de colheita correta aos pacientes e pela existência de procedimentos escritos em relação à preparação do paciente, colheita da amostra e transporte da mesma até ao laboratório. Na fase analítica, o controlo de qualidade é assegurado pela utilização de amostras controlo, de forma a avaliar a precisão dos ensaios, permitindo ao laboratório manter a reprodutibilidade dos resultados, verificar a calibração dos sistemas analíticos e colocar em prática determinadas ações corretivas se surgir uma não-conformidade. Este CQI é realizado diariamente no laboratório depois da manutenção diária dos equipamentos e antes de se testarem as amostras.

O sistema de CQI utilizado no laboratório é baseado na construção de cartas de controlo, designadas de cartas de *Levey-Jennings*. Estas cartas controlo permitem avaliar a precisão dos resultados através da utilização das regras de *Westgard*.

Para a validação de um determinado parâmetro é necessário ter o controlo aceitável de acordo com as regras de *Westgard* estabelecidas, procedendo-se à análise das amostras após validação de todos os controlos. Pelo contrário, se um dos controlos for rejeitado, procede-se à identificação e resolução do problema, que pode ser o controlo fora de validade, reagentes que perderam a estabilidade, erros na calibração, falta de manutenções e/ou problema de programação pelo operador.

4.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

A AEQ corresponde a um processo de avaliação da qualidade dos resultados obtidos pelos laboratórios, tendo como principal objetivo atingir uma padronização dos resultados interlaboratoriais, a deteção de erros sistemáticos e a monitorização do nível de desempenho geral dos laboratórios.

A avaliação do desempenho do LPCMA em comparação com outros laboratórios que utilizam os mesmos procedimentos analíticos, é realizada através da participação em programas de AEQ internacionais, que nosso caso inclui o programa RIQAS e UK NEQAS. Neste sistema de avaliação, os diferentes laboratórios participantes, analisam as amostras de concentração desconhecida que lhes são enviadas pela entidade responsável pela AEQ. Esta entidade recebe depois os resultados, separa-os por grupos de metodologias idênticas e determina a média de cada grupo e o respetivo índice de desvio padrão. No final, envia um relatório ao laboratório, no qual é descrito o seu desempenho nos variados parâmetros determinados.

5. VALÊNCIA DA HEMATOLOGIA

A Hematologia compreende o estudo dos elementos figurados do sangue e dos órgãos hematopoéticos (medula óssea (MO), baço e gânglios linfáticos), que em conjunto, correspondem a um dos maiores sistemas orgânicos do Homem.

O processo de hematopoiese ocorre essencialmente ao nível da MO e inclui todos os fenómenos relacionados com a origem, multiplicação e maturação dos precursores das células sanguíneas, incluindo processos como a eritropoiese, linfocitopoiese, trombocitopoiese e mielocitopoiese.

O sangue constitui cerca de 6 a 8% da massa corporal total e consiste em células sanguíneas suspensas no líquido plasmático. Este, por sua vez, perfaz 55% do volume sanguíneo total e os glóbulos vermelhos (GV) ocupam grande parte do volume restante, aproximadamente 45%. Os leucócitos e as plaquetas (PLT), embora fisiologicamente importantes, ocupam um volume significativamente menor (<1%), como se pode observar pela figura 4.

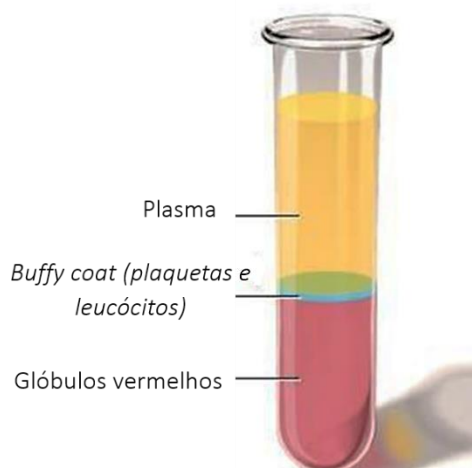


Figura 4. Representação dos diferentes constituintes do sangue.

Das análises mais requisitadas pelos clínicos, fazem parte a hematologia de rotina, que inclui o hemograma completo e a velocidade de sedimentação (VS).

No LPCMA, o sector da Hematologia está organizado de acordo com a natureza dos parâmetros efetuados, como se encontra representado na tabela 4. Os equipamentos e metodologias do âmbito da Hematologia com os quais tive a oportunidade de trabalhar durante o estágio serão descritos neste capítulo do relatório.

Tabela 4. Diferentes parâmetros determinados no setor da Hematologia e a respetiva metodologia utilizada na sua determinação

Parâmetros	Equipamento e metodologia	Método
Hemograma	<u>Sysmex XT-1800i™</u> -Método do SLS (espectrofotometria); -Impedância com focagem hidrodinâmica; -Citometria de fluxo fluorescente.	Automático
VS	<u>Ves-Matic 20®</u> -Realiza a leitura da coluna de GV, através de sensores de infravermelhos.	Semiautomático
TP TTPa	<u>STart® 4 Coagulation Analyzer</u> - Coagulometria.	Semiautomático
HbA_{1c}	<u>Capillarys™ 2 Flex-Piercing</u> - Eletroforese capilar.	Automático
Técnicas com cards	<u>Coombs direta e indireta</u> - Cards DG Gel Coombs. <u>Tipagem sanguínea</u> - Cards DG Gel Confirm P.	Manual

Abreviaturas: GV, glóbulos vermelhos; HbA_{1c}, hemoglobina glicada; SLS, lauril sulfato de sódio; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativado; VS, velocidade de sedimentação.

5.1. HEMOGRAMA

Para a realização do hemograma procede-se à colheita de sangue venoso para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (K₃EDTA). Este, corresponde ao anticoagulante de eleição para contagens de células sanguíneas, pois preserva a morfologia dos leucócitos e GV, funcionando também como anti-agregante plaquetário.

O hemograma completo possibilita a realização do estudo quantitativo e qualitativo das células sanguíneas, permitindo perceber se existem alterações na sua concentração e/ou na sua morfologia, sendo utilizado como auxiliar no rastreio, diagnóstico e na monitorização de diferentes patologias.

No LPCMA, os hemogramas são efetuados no equipamento *Sysmex XT-1800i™*, através da leitura do sangue total, pela associação de três métodos diferentes: citometria de fluxo, impedância com focagem hidrodinâmica e espectrofotometria.

5.1.1. PARÂMETROS DO HEMOGRAMA

Na tabela 5 encontram-se descritos os diferentes parâmetros obtidos pelo hemograma para as 3 linhagens celulares.

Tabela 5. Principais parâmetros determinados pelo equipamento Sysmex XT-1800i™

Índices eritrocitários	
Hematócrito	O HCT corresponde ao volume de GV por volume total de sangue, sendo expresso em %. É determinado diretamente pelo equipamento tendo em conta o volume individual de cada eritrócito.
Volume Globular Médio	Fornece o volume médio dos GV presentes na amostra de sangue, sendo expresso em fL; é determinado diretamente pelo equipamento. Corresponde a um dos parâmetros utilizados na classificação das anemias. - MCV diminuído: presença de GV de dimensão inferior ao normal – microcitose. - MCV aumentado: presença de GV de dimensão superior ao normal – macrocitose.
Hemoglobina Globular Média	Fornece a quantidade de Hb por GV, não tendo em conta o volume de cada um. É expressa em pg e obtém-se através da seguinte expressão: $MCH = \frac{[Hb] \left(\frac{g}{L}\right)}{n^{\circ} GV \left(\times \frac{10^{12}}{L}\right)}$
Concentração de Hemoglobina Globular Média	Fornece a concentração média de Hb por GV, obtendo-se uma relação entre a quantidade de Hb e o volume dos GV, o que permite perceber o seu estado de hemoglobinizacão. O resultado é expresso em g/dL e obtém-se pela seguinte expressão: $MCHC = \frac{Hb \left(\frac{g}{dL}\right)}{HCT (\%)} \times 100$ MCHC diminuída: presença de GV hipocrómicos. MCHC aumentada: presença de GV hipercrómicos, como em casos de esferocitose, por exemplo.
Amplitude de distribuição dos eritrócitos	O RDW fornece a distribuição das dimensões dos GV, indicando o seu grau de anisocitose. É expresso em percentagem e fL, e é obtido diretamente a partir do histograma de distribuição de volumes dos GV.

Continuação da **tabela 5**

Índices plaquetários	
Percentagem de plaquetas gigantes	Este parâmetro fornece a percentagem de plaquetas gigantes no sangue periférico.
Volume plaquetário médio	O MPV reflete o volume médio das PLT em circulação, sendo expresso em fL.
Amplitude de distribuição das plaquetas	O PDW indica a heterogeneidade dos volumes plaquetários. Um valor aumentado deste parâmetro indica a presença de anisocitose plaquetária.
Plaquetócrito	Corresponde ao volume de PLT no volume total de sangue, e é expresso em percentagem.
Avaliação leucocitária	
Leucócitos	O equipamento fornece a quantificação leucocitária total e diferencial, em % e em valor absoluto.
Granulócitos imaturos	Este equipamento fornece a quantificação, em % e valor absoluto, de células imaturas da linha mieloide, resultando do somatório de metamielócitos, mielócitos e promielócitos presentes na amostra, não diferenciando entre eles e não incluindo os mieloblastos nem os neutrófilos em banda.

Abreviaturas: GV, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina; HCT, hematócrito; MCH, hemoglobina globular média; MCHC, concentração de hemoglobina globular média; MCV, volume globular médio; MPV, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentagem de plaquetas gigantes; PLT, plaquetas; RDW, amplitude de distribuição dos eritrócitos.

5.1.2. SYSMEX XT-1800i™



Figura 5. Equipamento utilizado na realização dos hemogramas.

O Sysmex XT-1800iTM é um analisador hematológico automatizado, utilizado no diagnóstico *in vitro* em Laboratórios de Análises Clínicas (figura 5).

Este equipamento permite a obtenção do hemograma completo dos pacientes, recorrendo a diferentes técnicas para realizar a determinação dos variados parâmetros hematológicos. Uma vez dentro do equipamento, a amostra é dividida em 4 partes, prosseguindo para os respectivos canais diferenciados, que se encontram descritos a seguir.

- **CANAL RBC/PLT**

Os eritrócitos e as PLT são detetados e contabilizados neste canal específico, que usa o método de impedância elétrica combinado com a tecnologia de focagem hidrodinâmica, minimizando os fenómenos de coincidência e de recirculação. Antes de introduzida neste canal, uma parte da amostra de sangue é separada da restante e misturada com um diluente (reagente CELLPACK) numa razão pré-estabelecida, que causa a lise dos leucócitos para que não ocorram interferências na contagem dos GV e PLT.

- **CANAL DA HEMOGLOBINA**

O método utilizado para a determinação da concentração de hemoglobina ([Hb]) é o que recorre ao uso do reagente livre de cianeto, lauril sulfato de sódio (SLS).

Neste método é utilizado um reagente de lise – *Sulfolyser* – que provoca a rutura dos GV. Assim, após libertação da Hb do interior dos GV e exposição ao reagente SLS, ocorre a alteração da conformação da molécula de globina, com a oxidação do ferro, e finalmente a formação do complexo colorido SLS-Hb (figura 6). A determinação da [Hb] é realizada no final por um método fotométrico, medindo-se a absorção de luz pelo composto colorido a um λ específico.

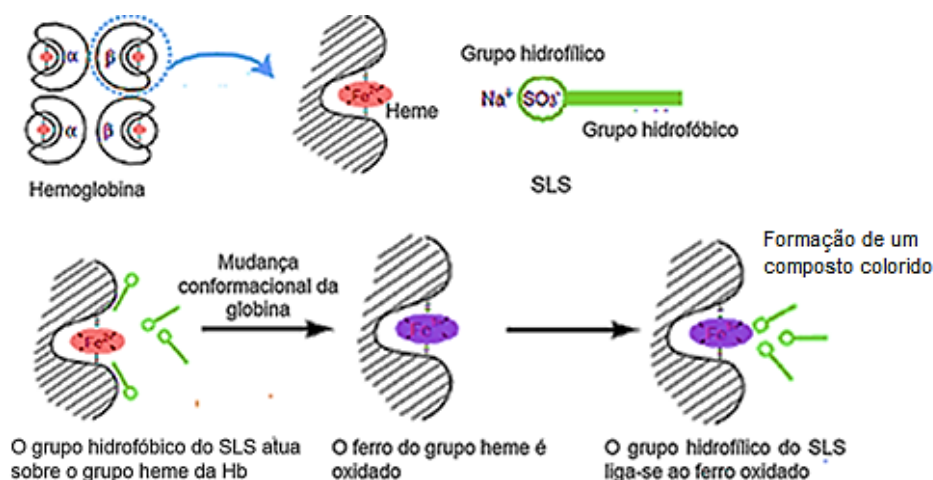


Figura 6. Mecanismo de reação do método lauril sulfato de sódio. **Abreviaturas:** Hb, hemoglobina; SLS, lauril sulfato de sódio.

- **CANAL 4 DIFF**

Este canal permite a realização da contagem total e diferencial dos leucócitos, distinguindo entre neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.

A técnica utilizada para a determinação destes parâmetros é a citometria de fluxo acoplada à fluorescência, que analisa as características químicas e físicas das células em suspensão, à medida que estas passam num fluxo laminar e são intercetadas uma a uma por um feixe de luz semicondutor, ocorrendo dispersão da luz em várias direções. Consoante o tipo de dispersão de luz, diferentes características celulares são detetadas:

- Dispersão frontal (FSC) - deteta o tamanho celular;
- Dispersão lateral (SSC) - fornece a complexidade da célula;
- Fluorescência lateral (SFL) - indica a quantidade de ácidos nucleicos (RNA/DNA) no interior da célula.

Os diferentes reagentes utilizados por este canal estão mencionados na tabela 6.

Tabela 6. Reagentes utilizados pelo canal DIFF para a diferenciação leucocitária

Reagente	Mecanismo de ação
STROMATOLYSER-4DL	- Provoca a lise dos GV e das PLT, de forma a eliminar possíveis interferências na contagem dos leucócitos. - Abre poros ultramicroscópicos na membrana dos leucócitos.
STROMATOLYSER-4DS	- Contém um marcador fluorescente que se fixa aos ácidos nucleicos e organelos citoplasmáticos. - A intensidade de fluorescência vai ser proporcional ao conteúdo em ácidos nucleicos permitindo assim a diferenciação leucocitária.

Abreviaturas: GV, glóbulos vermelhos; PLT, plaquetas.

A informação proveniente dos diferentes detetores de luz é agrupada, formando as características de cada célula, que são expressas num gráfico de dispersão e permitem a sua diferenciação (figura 7A).

Este equipamento fornece ainda, através do canal DIFF, informação acerca da presença de granulócitos imaturos (GI), emitindo um *flag* (figura 7B).

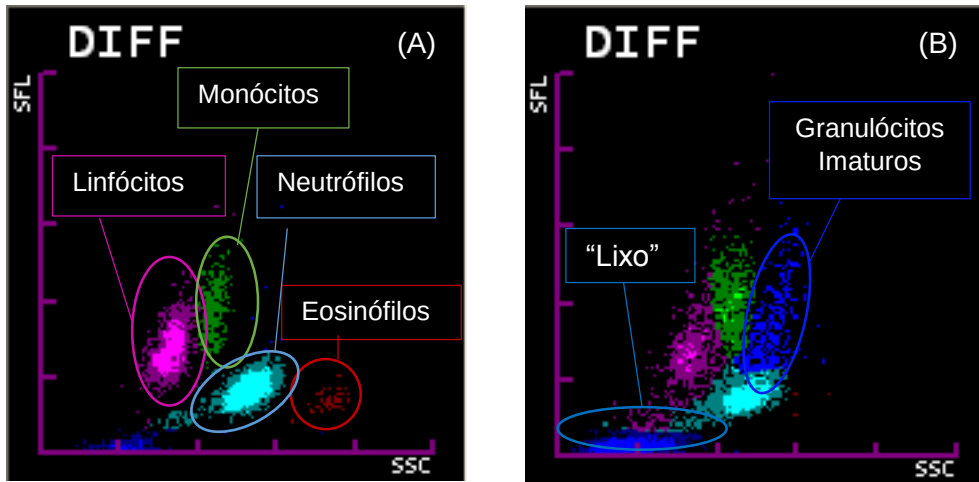


Figura 7. (A) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, onde é possível observar as diferentes populações leucocitárias que se podem distinguir através deste canal (B) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, onde é possível observar a presença de granulócitos imaturos. **Abreviaturas:** SFL, fluorescência lateral; SSC, dispersão lateral.

- **CANAL WBC/BASO**

Neste canal ocorre a diferenciação dos basófilos em relação aos restantes glóbulos brancos (WBC), através da utilização de um reagente ácido (*Stromatolyser-FB*) que produz a lise celular dos GV e reduz os leucócitos apenas ao seu núcleo, com exceção dos basófilos, que resistem a este reagente. Posteriormente, as diferenças resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas utilizando a informação proveniente do FSC e SSC (figura 8).

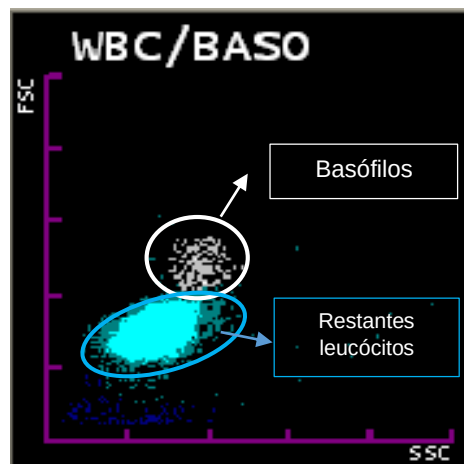


Figura 8. Gráfico de dispersão obtido no canal WBC/BASO. **Abreviaturas:** BASO, basófilos; FSC, dispersão frontal; SSC, dispersão lateral; WBC, glóbulos brancos.

5.2. INTERPRETAÇÃO DOS HEMOGRAMAS, HISTOGRAMAS E GRÁFICOS DE DISPERSÃO

Os parâmetros obtidos no hemograma são úteis para a avaliação e o acompanhamento de alterações eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias. Desta forma, a sua realização, em conjunto com outros parâmetros clínicos, pode auxiliar no diagnóstico de diversas patologias.

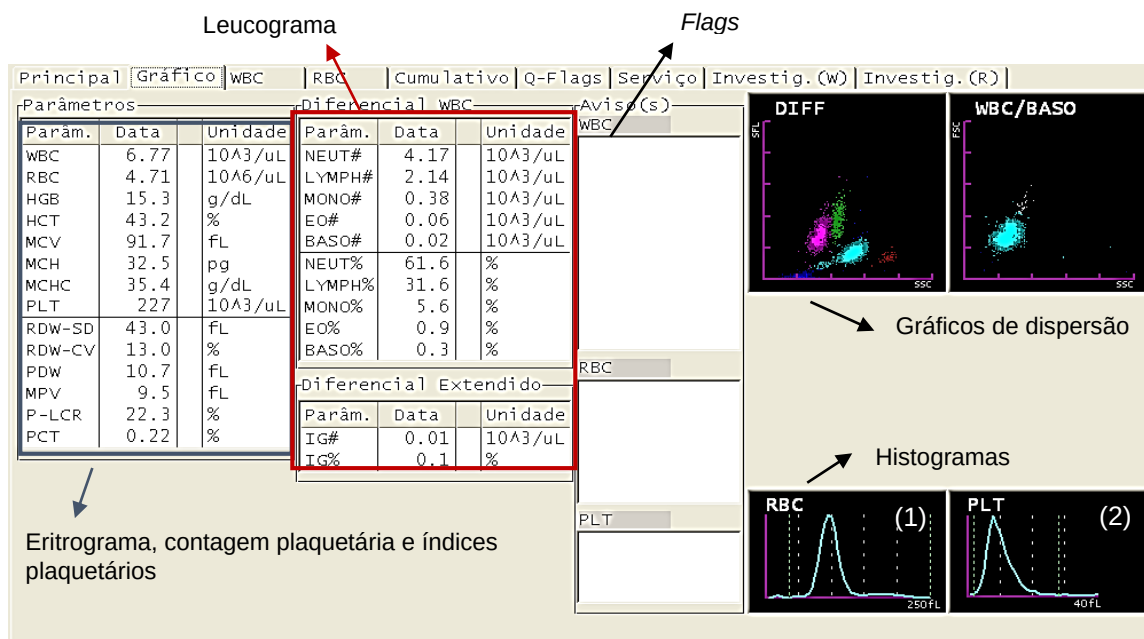


Figura 9. Hemograma completo obtido pelo equipamento Sysmex XT-1800i™, relativo a uma amostra com parâmetros dentro dos intervalos de referência.

Incluído no hemograma, como podemos observar pela figura 9, aparecem 2 histogramas, que correspondem a representações gráficas do número de células *versus* o seu tamanho (em fL), fornecendo informação acerca da população eritrocitária (1) e plaquetária (2). Estes histogramas podem retratar a presença de subpopulações celulares, sendo que a presença de desvios num sentido ou outro da média pode ser importante para o diagnóstico clínico. Para além destes histogramas, aparecem também dois gráficos de dispersão (DIFF e WBC/BASO), que representam a população leucocitária do paciente, tendo em conta o seu tamanho, complexidade interna e quantidade de ácidos nucleicos.

Este equipamento apresenta ainda um sistema de alertas para a presença de células precursoras e alterações morfológicas e/ou quantitativas nas diferentes populações celulares.

5.2.1. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM ERITROCITÁRIA

Em relação à linhagem eritrocitária, a patologia mais frequentemente detetada durante a realização do estágio foi a anemia, sendo esta patologia confirmada quando a [Hb] se encontra abaixo dos valores de referência (mulheres, [Hb] < 12g/dL e homens, [Hb] < 13 g/dL). A sua classificação morfológica é realizada tendo em conta a concentração de hemoglobina globular média (MCHC) e o volume globular médio (MCV) (tabela 7).

Tabela 7. Classificação morfológica das anemias

Classificação morfológica	Exemplos
<u>Anemia normocrômica macrocítica</u> Não megaloblásticas: MCV entre 90 a 110 fL Megaloblásticas: MCV entre 100 a 130 fL	- A anemia macrocítica não megaloblástica está associada a situações de eritropoiese acelerada, com reticulocitose; não existe uma alteração na síntese de DNA. - A anemia macrocítica megaloblástica pode resultar de uma deficiência em vitamina B₁₂ e/ou ácido fólico, alterações hereditárias na síntese de DNA, alcoolismo ou tratamento com citostáticos; nestes casos existe uma interferência na síntese de DNA.
<u>Anemia hipocrômica microcítica</u> MCHC < 31,5 g/dL MCV < 81 fL	Neste tipo de anemia, a síntese de Hb encontra-se afetada. Pode resultar de uma deficiência em ferro (dieta inadequada, hemorragias, aumento das necessidades em ferro), alteração na síntese das cadeias globínicas (talassemias e hemoglobinopatias) ou alteração na síntese do grupo heme e da porfirina (anemia sideroblástica).
<u>Anemia normocrômica normocítica</u>	Nestas anemias não existe uma alteração nos índices hematimétricos, podendo resultar de: - Perda recente de sangue; - Expansão do volume plasmático (gravidez, por exemplo); - Doenças hemolíticas; - Doenças crónicas.

Abreviaturas: Hb, hemoglobina; MCHC, concentração de hemoglobina globular média; MCV, volume globular médio.

EXEMPLO 1

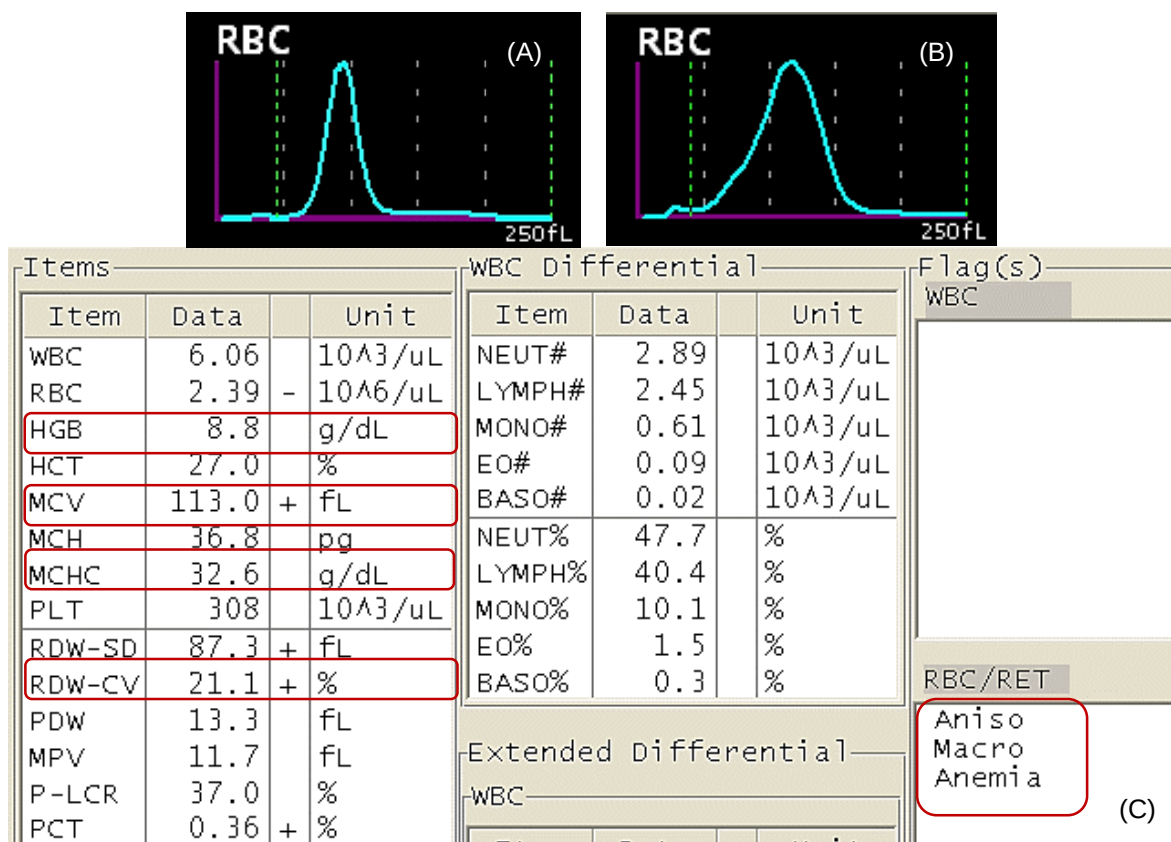


Figura 10. (A) Histograma eritrocitário obtido para uma pessoa com valores dentro dos intervalos de referência. (B) Histograma eritrocitário de um paciente que apresenta macrocitose (desvio à direita) (C) Hemograma do mesmo paciente, com alerta para a presença de uma anemia macrocítica. **Abreviaturas:** HGB, hemoglobina; MCHC, concentração de hemoglobina globular média; MCV, volume globular médio; RDW, amplitude de distribuição dos eritrócitos.

Na figura 10 é possível observar um histograma eritrocitário (B), em que é bem visível a presença de uma população de GV com tamanho superior ao normal, verificando-se um desvio da curva para a direita em relação ao histograma normal. Para além disso, o paciente apresenta uma [Hb] diminuída, com um MCV bastante aumentado e um MCHC normal, indicando a presença de uma anemia normocrômica macrocítica megaloblástica. Como análises complementares, o paciente apresentava requisição para a determinação dos níveis de ácido fólico, vitamina B₁₂, ferro e ferritina, cujos valores se encontram na tabela 8. Tendo em conta os diferentes resultados, trata-se provavelmente de uma anemia macrocítica megaloblástica por deficiência em vitamina B₁₂.

Tabela 8. Parâmetros determinados em conjunto com a realização do hemograma. A vermelho encontram-se os parâmetros alterados

Parâmetro	Resultado	Intervalo de referência
Vitamina B₁₂	88 pg/mL (↓)	[187-883 pg/mL]
Ácido fólico	16,8 ng/mL	[3,1 -20,5 ng/mL]
Ferro	64 mcg/dL	[50 – 170 mcg/dL]
Ferritina	133 ng/mL	[5 – 204 ng/mL]

Abreviaturas: ↓, diminuição.

EXEMPLO 2

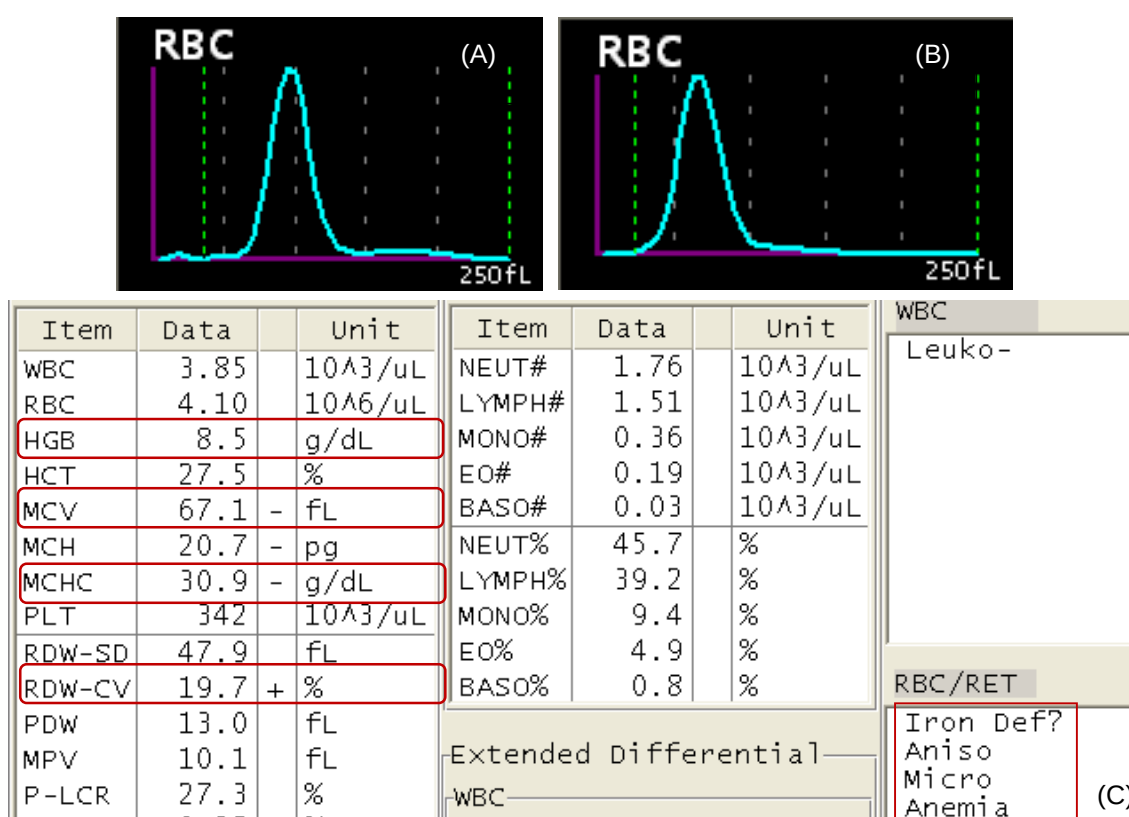


Figura 11. (A) Histograma eritrocitário normal (B) Histograma eritrocitário com desvio à esquerda (C) Hemograma do mesmo paciente, com alterações associadas a uma anemia ferropénica. **Abreviaturas:** HGB, hemoglobina; MCHC, concentração de hemoglobina globular média; MCV, volume globular médio; RDW, amplitude de distribuição dos eritrócitos.

Na figura 11 é possível observar um hemograma típico de uma anemia por deficiência em ferro. O paciente apresenta uma [Hb] diminuída, em conjunto com microcitose, hipocromia e anisocitose eritrocitária. Para além disso, nas análises complementares requisitadas pelo clínico, o paciente apresentava valores do metabolismo do ferro alterados, concordantes com os resultados do hemograma (tabela 9).

Na observação do esfregaço sanguíneo foi possível confirmar a presença de GV hipocrômicos, microcíticos e anisocitose eritrocitária (figura 12).

Tabela 9. Diferentes parâmetros determinados em conjunto com o hemograma. A vermelho encontram-se os parâmetros alterados

Parâmetro	Resultado	Intervalo de referência
Ácido Fólico	7,8 ng/mL	[3,1 – 20,5 ng/mL]
Vitamina B₁₂	348 pg/mL	[187 – 883 pg/mL]
Ferro	22 mcg/dL (↓)	[50 – 170 mcg/dL]
Ferritina	5 ng/mL	[5 – 204 ng/mL]
CTFF	400 µg/dL (↑)	[70 – 310 µg/dL]
Transferrina	327 mg/dL	[180 – 382 mg/dL]

Abreviaturas: ↓, diminuição; ↑, aumento; CTFF, capacidade total de fixação do ferro.

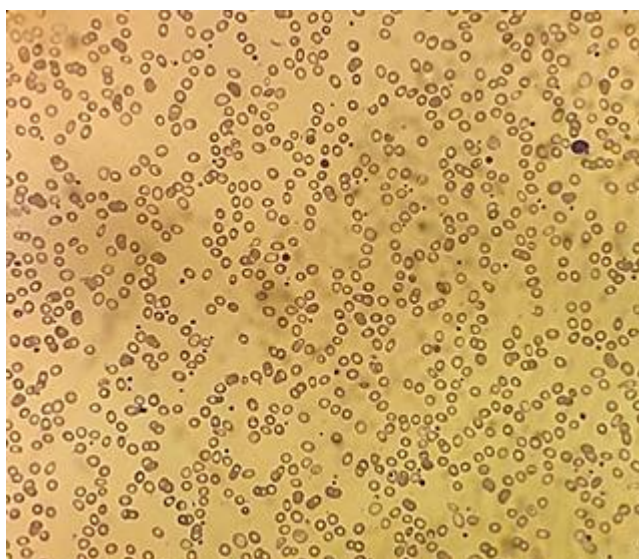


Figura 12. Observação do esfregaço de sangue periférico na objetiva de 40x.

5.2.2. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM LEUCOCITÁRIA

O leucograma diferencial fornece as proporções dos diferentes tipos celulares que constituem o número total de leucócitos. Deve-se ter sempre em atenção a idade e o género do paciente, pois os valores de referência variam.

A fórmula leucocitária pode encontrar-se alterada em diversas situações como inflamações, diferentes infeções e neoplasias, ou em determinadas situações fisiológicas, como a gravidez. De seguida, descrevo alguns exemplos das principais alterações que encontrei durante a realização do estágio.

LEUCOCITOSE NEUTROFÍLICA

Esta situação cursa com um valor absoluto de leucócitos aumentado, devido ao aumento do número de neutrófilos, podendo ocorrer em casos de lesão tecidual, inflamação, infecção ou mesmo em casos mais graves, como na leucemia mieloide crônica.

Por vezes, a leucocitose neutrofílica é acompanhada do aparecimento de precursores mielóides na circulação sanguínea.

Na figura 13 encontra-se um exemplo de uma situação de leucocitose neutrofílica observada no laboratório.

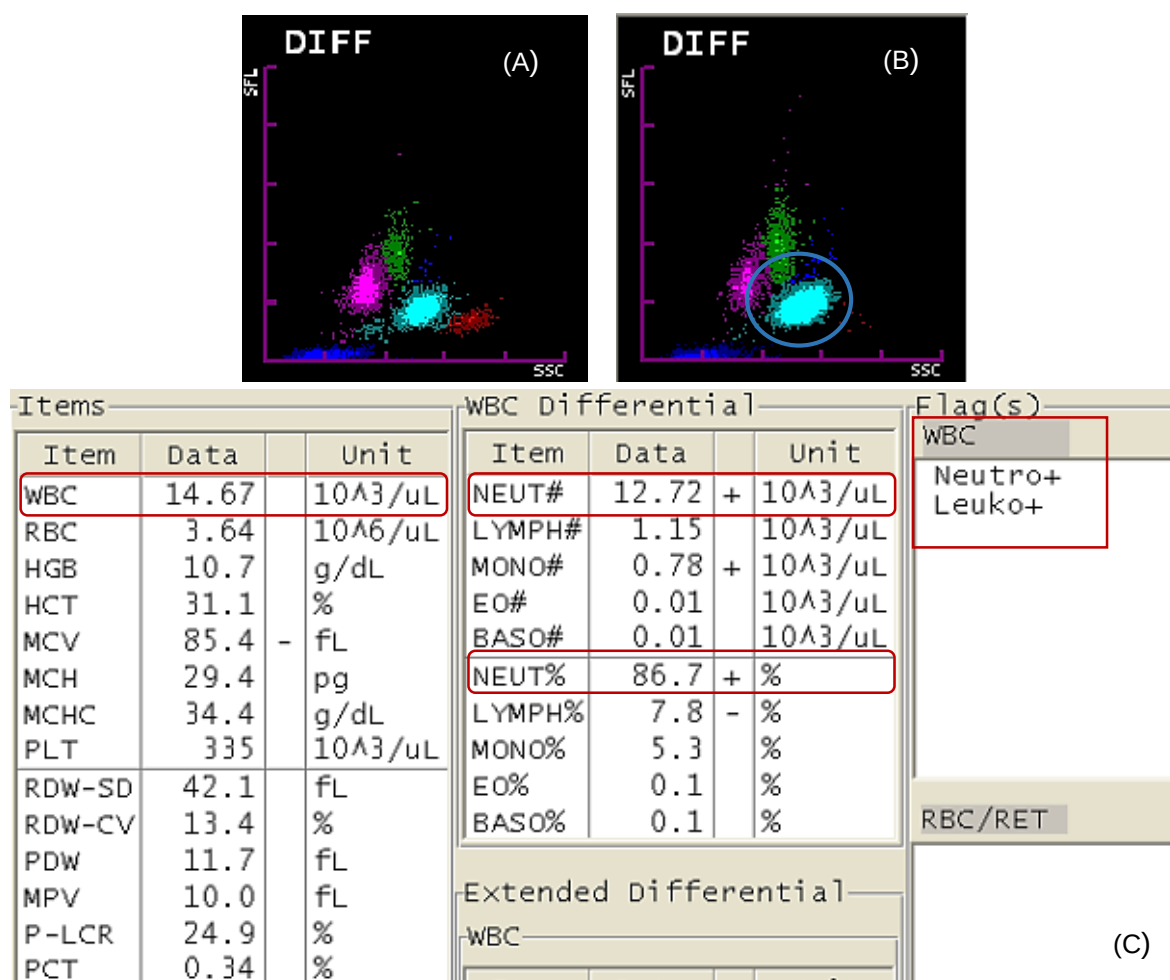


Figura 13. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido pelo canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente com leucocitose neutrofílica, obtido pelo canal DIFF (C) Hemograma do mesmo paciente em que se confirma o número absoluto de leucócitos e neutrófilos aumentado. **Abreviaturas:** NEUT%, percentagem de neutrófilos; NEUT#, valor absoluto de neutrófilos; WBC, glóbulos brancos.

LEUCOCITOSE LINFOCÍTICA

Valores aumentados de linfócitos estão geralmente associados a processos inflamatórios/infecciosos agudos e crônicos. Outras situações associadas a linfocitose são a leucemia linfóide aguda e crônica, e alguns tipos de linfomas.

Na figura 14 encontra-se um exemplo de uma situação de leucocitose linfocítica observada no laboratório.

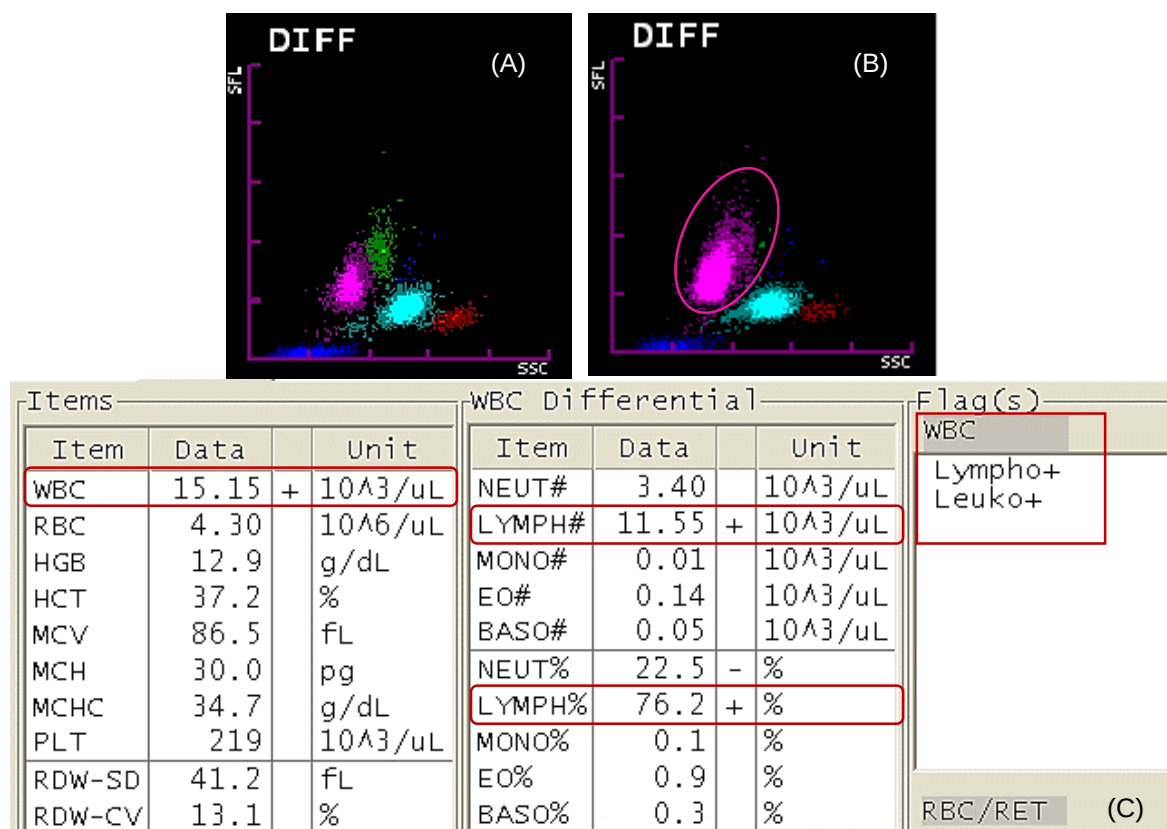


Figura 14. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido no canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente em que é evidente um número de linfócitos aumentado (C) Hemograma do mesmo paciente em que é possível verificar a presença de um valor absoluto de leucócitos e linfócitos aumentado. **Abreviaturas:** LYMPH%, percentagem de linfócitos; LYMPH#, valor absoluto de linfócitos; WBC, glóbulos brancos.

O hemograma deste paciente apresenta uma leucocitose com uma linfocitose exagerada. Na observação do esfregaço sanguíneo foi possível verificar a presença de pró-linfócitos e Sombras de *Grumpchet* (figura 15), que sugerem a possível presença de uma leucemia linfóide crônica. Nestes casos, aconselha-se o estudo fenotípico dos linfócitos.

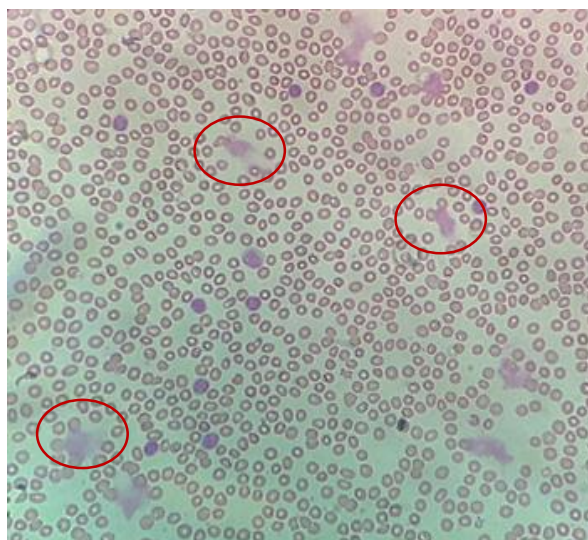


Figura 15. Observação de Sombras de Grumpchet na objetiva de 40x (rodeadas a vermelho).

EOSINOFILIA

Um aumento do número de eosinófilos na circulação sanguínea, pode ocorrer, principalmente, em casos de infecções parasitárias, doenças dermatológicas (eczemas, psoríase, dermatites) e reações alérgicas (asma, urticária). Na figura 16 encontra-se um exemplo de uma situação de eosinofilia observada no laboratório.

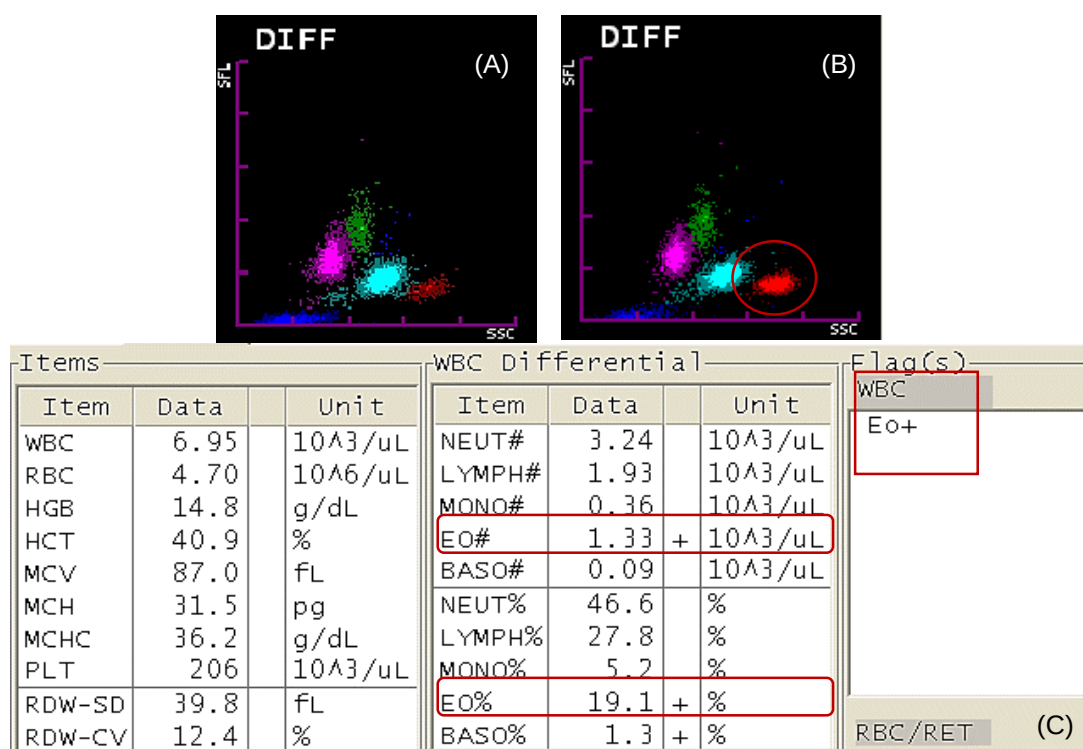


Figura 16. (A) Gráfico de dispersão de um paciente normal, obtido no canal DIFF (B) Gráfico de dispersão de um paciente com uma nuvem de eosinófilos mais acentuada (rodeada a vermelho) (C) Hemograma do mesmo paciente, que evidencia a presença de uma contagem relativa e absoluta de eosinófilos aumentada.

Abreviaturas: EO%, percentagem de eosinófilos; EO#, valor absoluto de eosinófilos.

5.2.3. ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À LINHAGEM PLAQUETÁRIA

As PLT possuem um papel muito importante na manutenção da hemostasia sanguínea, permitindo a manutenção da integridade de todo o sistema vascular. Um aumento ou uma diminuição do número de PLT, pode conduzir a estados trombóticos ou hemorrágicos, respetivamente.

Uma contagem de PLT superior a 450×10^9 plaquetas/L, designa-se por trombocitose, e uma contagem de PLT inferior a 150×10^9 plaquetas/L, designa-se como trombocitopenia, ocorrendo hemorragias anormais apenas quando os valores se encontram abaixo das 100×10^9 plaquetas/L.

Quando o número de PLT é inferior ou superior aos valores de referência mencionados, deve ser efetuada uma avaliação microscópica do esfregaço sanguíneo, com o objetivo de retificar/confirmar a contagem fornecida pelo equipamento automático. Muitas vezes, um valor baixo de plaquetas pode ocorrer por agregação plaquetária, conduzindo a uma falsa trombocitopenia. Nesses casos, pede-se nova colheita de sangue total, mas desta vez em tubo com o anticoagulante citrato de sódio, na proporção de 1:4, sendo esta nova amostra reanalisada quanto à contagem de plaquetas. O resultado final deve ser corrigido para o efeito de diluição do citrato de sódio, de acordo com a seguinte fórmula:

$$n^{\circ} PLT \text{ corrigido em citrato} = n^{\circ} PLT_{\text{tubo citrato}} \times 1,25 \text{ (fator de diluição)}$$

5.3. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Um resultado fora dos intervalos de referência definidos para os diferentes elementos sanguíneos, ativa alarmes no equipamento *Sysmex XT-1800i*TM. Assim, a execução do esfregaço sanguíneo, com posterior realização da contagem celular e observação da respetiva morfologia, é efetuada sempre que surjam esses alarmes, mas também sempre que seja necessário complementar os resultados fornecidos pelo método automático, ou ainda, quando existe solicitação expressa por parte do clínico.

Algumas das situações que necessitam de confirmação através da visualização do esfregaço de sangue periférico, incluem os casos de trombocitopenia, com número de plaquetas $< 150 \times 10^9$ /L; eosinofilia; linfocitose; [Hb] diminuída associada a microcitose, para o despiste de anemia ferropénica; e presença de linfócitos atípicos. Deve também efetuar-se um esfregaço sanguíneo quando existe um alerta para a presença de GI, de forma a confirmar a sua presença e realizar a contagem diferencial dos leucócitos e dos seus precursores.

De modo a confirmar os resultados obtidos no hemograma, a visualização microscópica de um esfregaço sanguíneo deve ter em atenção as 3 linhagens celulares (tabela 10).

Tabela 10. Fatores a ter em conta no estudo microscópico das diferentes linhagens celulares

Eritrócitos
Alterações numéricas; Alterações morfológicas – presença de células em alvo, esferócitos, <i>burr cell</i>, acantócitos, etc; Alterações na cor – hipocromia, anisocromia, policromatofilia; Alterações no volume – micrócitos, macrócitos, anisocitose, dimorfismo; Presença de inclusões eritrocitárias – corpos de <i>Heinz</i>, corpos de <i>Howell-Jolly</i>, siderócitos, pontuado basófilo e inclusões parasitárias; Alterações no estado de maturação – presença de eritroblastos.
Leucócitos
Alterações numéricas ou morfológicas – granulação tóxica e vacuolização dos neutrófilos, citoplasma hiperbasófilo e formas atípicas do núcleo nos linfócitos; Alterações no estado de maturação – presença de granulócitos imaturos; Presença de linfócitos atípicos.
Plaquetas
Presença de agregados plaquetários; Alterações numéricas ou morfológicas; Alterações no estado de maturação, com presença de células imaturas.

Para a realização do esfregaço sanguíneo, o ideal seria utilizar sangue total sem anticoagulante, de forma a evitar possíveis interferências na visualização correta dos elementos figurados do sangue. No entanto, como o esfregaço sanguíneo se realiza essencialmente para a confirmação dos resultados obtidos no hemograma, utilizamos o sangue presente no tubo de colheita com K₃EDTA, no máximo, até 1 hora após a colheita, para minimizar os efeitos de exposição ao anticoagulante.

A realização do esfregaço de sangue periférico consiste na obtenção de uma camada fina dos constituintes sanguíneos sobre uma lâmina de vidro para a realização da observação microscópica. Assim, o esfregaço deve apresentar-se regular e homogêneo, com bordos bem definidos, devendo apresentar uma redução progressiva da espessura no sentido cabeça-cauda (figura 17).

O exame cuidadoso de um esfregaço sanguíneo bem preparado fornece informações valiosas no diagnóstico e tratamento de muitas patologias, sendo assim um procedimento de extrema importância.

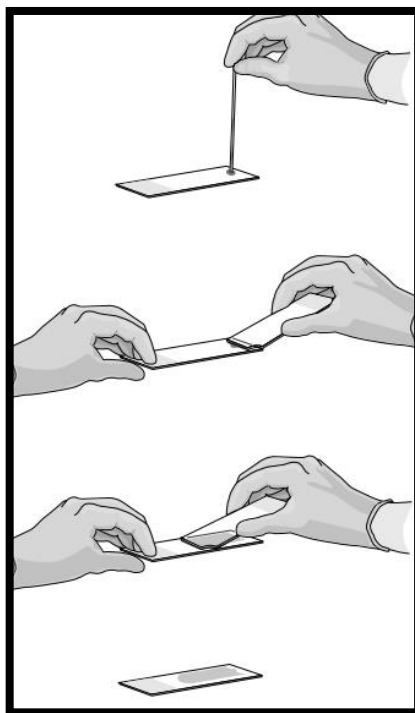


Figura 17. Exemplificação da realização correta de um esfregaço sanguíneo (Bain BJ. *Blood Cells – A Practical Guide*. 5thed. Blackwell Publishing; 2015).

5.3.1. COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Para a observação microscópica dos elementos figurados do sangue periférico, procede-se à coloração de *Wright*. O método baseia-se na afinidade seletiva dos elementos celulares frente ao corante neutro *Wright*, o qual corresponde a uma mistura de azul-de-metileno e eosina.

Este corante hematológico faz parte dos corantes designados genericamente de corantes do tipo *Romanowsky*, que correspondem a soluções alcoólicas com componentes básicos e ácidos, que vão permitir corar de forma distinta os componentes nucleares e citoplasmáticos das células.

O esfregaço sanguíneo corado deve começar por visualizar-se numa objetiva de pouca ampliação (10x), para auxiliar a avaliação da densidade de células, e dessa forma encontrar a melhor área de contagem. De seguida, a contagem é efetuada na objetiva de 40x, sendo a análise detalhada das células sanguíneas realizada na objetiva de imersão (100x).

Tendo em conta o alarme emitido pelo equipamento, devemos ter em atenção as diferentes linhagens celulares e, se necessário, realizar a contagem leucocitária diferencial, na qual se incluem, se existirem, os GI observados. Se forem observados eritroblastos no esfregaço sanguíneo, estes não são incluídos na contagem diferencial, mas devem ser contabilizados e referidos por cada cem leucócitos.

A figura 18 corresponde a um algoritmo de trabalho utilizado na validação dos hemogramas.

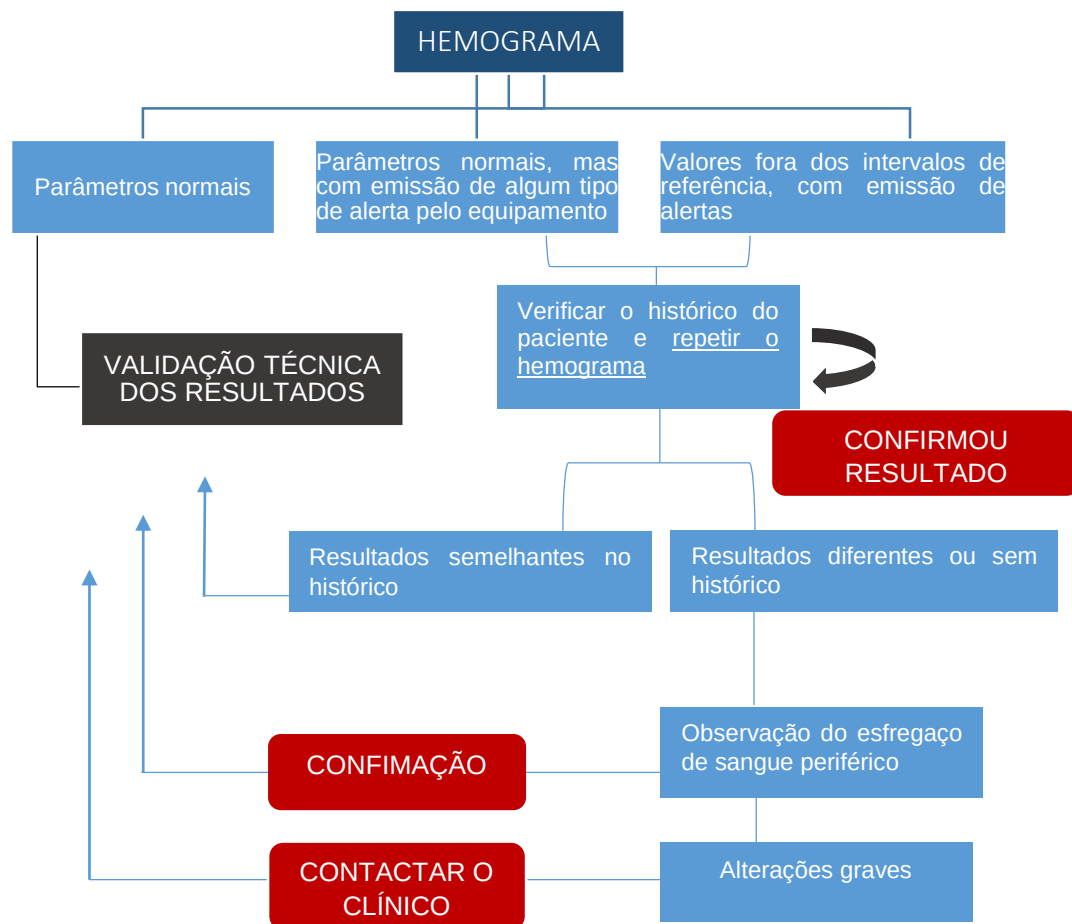


Figura 18. Fluxograma correspondente ao processo de validação dos hemogramas.

5.4. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A VS corresponde à velocidade à qual os GV se separam do plasma e se agregam em condições laboratoriais controladas, sendo expressa em mm/h. Este parâmetro é afetado por diversos fatores, que podem conduzir a valores diminuídos ou, na maior parte das patologias, a valores aumentados da VS (tabela 11). Os valores de referência variam dentro de limites que dependem essencialmente da faixa etária e género do paciente.

A determinação da VS é uma técnica que constitui uma análise de rotina, permitindo avaliar o estado de saúde geral do paciente. No entanto, corresponde a uma análise de valor inespecífico, pois uma alteração no seu valor não está associada à presença de uma patologia em concreto.

Este parâmetro é principalmente utilizado como indicador de um processo inflamatório ou infeccioso, podendo ainda ser útil na monitorização de doenças inflamatórias de carácter prolongado e na monitorização da resposta à terapêutica instituída. Atualmente, este

parâmetro é muitas vezes efetuado em conjunto com a determinação dos níveis de proteína C-reativa (PCR), devido à baixa sensibilidade e especificidade da determinação isolada da VS.

Tabela 11. Diferentes fatores responsáveis pela alteração dos valores de velocidade de sedimentação e respetivas patologias associadas

Fatores globulares		
Forma	GV com forma alterada: dificulta o empilhamento dos GV, diminuindo a VS.	- Esferocitose. - Anemia falciforme.
Dimensão	GV macrocíticos apresentam uma relação superfície/volume menor, diminuindo a sua carga elétrica em relação à sua massa, facilitando deste modo a sua agregação – VS aumentada.	- Anemia macrocítica.
Número	Uma [GV] mais elevada conduz a uma VS diminuída, pois ocorre uma maior repulsão eritrocitária, sendo mais difícil a formação do <i>rouleaux</i> de GV. Uma [GV] diminuída, por aumento do volume plasmático, por exemplo, conduz a VS aumentadas.	- Policitemia vera: VS diminuída. - Condições fisiológicas, como a gravidez, que se encontra associada a hemodiluição: VS aumentada.

Fatores plasmáticos

↑ Fibrinogénio ↑ Globulinas plasmáticas ↓ Albumina	Numerosas proteínas plasmáticas são carregadas positivamente, sendo capazes de neutralizar a carga negativa da superfície eritrocitária, favorecendo a formação de <i>rouleaux</i> – VS aumentada. A diminuição da quantidade de albumina plasmática favorece também um aumento da VS, pois trata-se de uma proteína carregada negativamente.	- Patologias associadas a inflamação ou infeção, que ocorrem com produção de proteínas plasmáticas de fase aguda positiva e diminuição dos níveis de albumina.
---	--	--

Fatores mecânicos e técnicos

Altura, diâmetro e limpeza do tubo; Posição do tubo; Temperatura e tempo de espera; Proporção volume de sangue/concentração de anticoagulante; Vibrações na bancada de trabalho.
--

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração; GV, glóbulos vermelhos; VS, velocidade de sedimentação.

5.4.1. VES - MATIC 20®

O Ves-Matic 20® (figura 19) é um analisador de bancada que permite a determinação simultânea da VS em 20 amostras de sangue, sendo o procedimento realizado de forma semiautomática e os resultados obtidos são comparáveis ao método de referência de Westergren, a 25°C. São utilizadas amostras de sangue total colhidas para tubos especialmente projetados para este fim, *Ves-Tec Tubes*, que contêm o anticoagulante citrato de sódio na proporção de 1:4.



Figura 19. Analisador de bancada *Ves-Matic 20®*.

Depois de introduzidas as amostras no equipamento, este procede à homogeneização das mesmas, efetuando a primeira leitura quando o prato volta à sua posição original. O leitor ótico, constituído por sensores ótico-eletrônicos, realiza a leitura automática do nível de sangue antes de iniciar a sedimentação, detetando a opacidade da coluna de sangue no tubo de colheita. Cerca de vinte minutos depois é efetuada a última leitura, sendo o resultado final obtido pela diferença de opacidade da coluna de sangue observada entre leituras.

Ou seja, este equipamento determina o nível de sedimentação globular e calcula automaticamente o valor da VS em mm/h.

5.5. ESTUDO DA HEMOSTASIA SANGUÍNEA

A hemostasia sanguínea corresponde a um processo biológico complexo, que pode ser definido como uma série de fenómenos biológicos que ocorrem em imediata resposta à lesão de um vaso sanguíneo, tendo como objetivo deter a hemorragia e confinar a resposta hemostática ao local de lesão. Assim, uma resposta hemostática normal ao dano vascular depende da interação íntima entre a parede vascular, as PLT circulantes e os fatores de coagulação e fibrinólise.

O sistema hemostático engloba, dessa forma, quatro processos fundamentais, que incluem a resposta vascular, hemostasia primária (formação do coágulo plaquetário), hemostasia

secundária (formação do coágulo de fibrina) e fibrinólise. Estes processos têm, em conjunto, a finalidade de manter a fluidez necessária do sangue, sem haver extravasamento pelos vasos ou obstrução do fluxo pela presença de trombos.

Vou-me focar essencialmente no processo da hemostasia secundária, pois foi este processo que tive a oportunidade de avaliar durante o estágio, através da determinação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa).

HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

A hemostasia secundária compreende um sistema biológico de amplificação, composto por uma cascata enzimática complexa na qual os seus componentes, que estão normalmente num estado inativo, são ativados por proteólise. É um processo autocatalítico e autolimitado, que culmina com a produção de trombina em quantidades suficientes para a conversão do fibrinogénio em fibrina (figura 20).

Na cascata da coagulação estão envolvidos vários fatores de coagulação, maioria dos quais são proenzimas sintetizadas pelo fígado, sendo que alguns deles necessitam de vitamina K para a sua síntese (protrombina, fatores VII, IX e X). Os iões cálcio (Ca^{2+}) têm também um papel fundamental no processo de coagulação, sendo essenciais ao seu correto funcionamento.

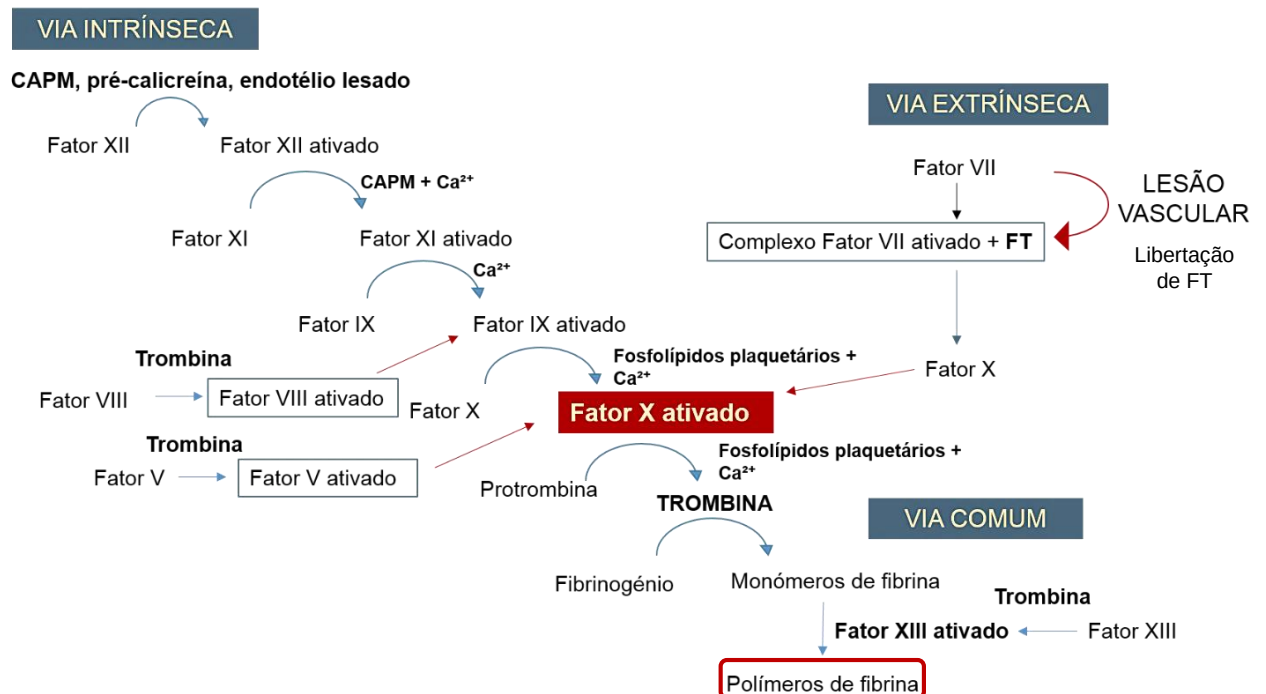


Figura 20. Modelo clássico da cascata de coagulação. **Abreviaturas:** Ca^{2+} , iões cálcio; CAPM, cininogénio de alto peso molecular; FT, fator tecidual.

5.5.1. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO HEMOSTÁTICA

Ainda que, *in vivo*, a ativação da cascata de coagulação não se dê exatamente pelas vias extrínseca e intrínseca, esta designação e este modelo clássico da coagulação continua a ser útil, e é aquele que se utiliza na avaliação laboratorial da hemostasia sanguínea.

O objetivo da avaliação laboratorial da hemostasia sanguínea é identificar as possíveis causas de patologia e definir a intensidade do defeito da hemostasia responsável pelas doenças hemorrágicas ou trombóticas, para além de ser útil na monitorização da terapêutica antitrombótica.

Os principais testes de avaliação da hemostasia secundária incluem a determinação do TP e TTPa.

TEMPO DE PROTROMBINA

O TP avalia a via extrínseca da cascata da coagulação, bem como a subsequente via comum. Reflete, desse modo, alterações em três dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (protrombina, fatores VII e X), fator V e fibrinogénio. Os resultados da medição do TP podem ser reportados em segundos, atividade enzimática (%) e/ ou razão normalizada internacional (RNI). Os valores de referência variam com o lote de reagente utilizado.

O princípio deste teste consiste em determinar, em presença de tromboplastina cálcica completa (equivalente ao fator tecidual (FT) *in vivo*), o tempo de coagulação do plasma a estudar. A tromboplastina cálcica, presente no reagente *Neoplastine® CI Plus*, vai ser responsável pela ativação da via extrínseca e posterior produção de fibrina.

De forma a reduzir a variabilidade de resultados que se registava devido à utilização de reagentes, protocolos e equipamentos diferentes, e de modo a estabelecer uma zona terapêutica comum e utilizável por todo o mundo, foi instituída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a RNI, que serve para a padronização das diferenças de resultado do TP entre os vários laboratórios presentes pelo mundo. Assim, todos os fabricantes de tromboplastina devem determinar o ISI (índice de sensibilidade internacional), em que procedem à comparação da sua tromboplastina com uma tromboplastina de referência internacional, que define a sensibilidade do reagente e vai permitir o cálculo da RNI.

O cálculo do RNI é feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$RNI = \left(\frac{TP \text{ do doente (seg)}}{TP \text{ controlo (seg)}} \right)^{ISI}$$

Em que o ISI é facultado pelo fornecedor para cada lote de tromboplastina utilizado pelo laboratório, e o TP controlo corresponde à média geométrica do valor de TP de pelo menos 20 adultos saudáveis.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A determinação do TP é realizada principalmente nos doentes com propensão a estados trombóticos, que realizam por isso uma terapêutica com anticoagulantes orais.

A toma de anticoagulantes orais, que consistem maioritariamente em antagonistas da vitamina K, conduz a um prolongamento do TP, na medida em que provocam uma redução da taxa plasmática de fatores de coagulação dependentes de vitamina K, prolongando assim o tempo de formação de coágulo e permitindo desse modo a prevenção de fenómenos trombóticos.

O prolongamento do TP pode também ser observado noutras situações como:

- Deficiências congénitas ou adquiridas nos fatores V, VII, X, protrombina ou fibrinogénio;
- Insuficiência hepática (como cirrose ou hepatite);
- Hipovitaminose K.

Para doentes a utilizar o anticoagulante *Varfine*®, que atua no ciclo da vitamina K impedindo a sua conversão na forma ativa, os resultados da RNI devem variar entre 2.0 e 3.0, em casos de trombose venosa profunda recorrente. Nalguns casos, incluindo doentes com próteses valvulares cardíacas e embolismo sistémico recorrente, o valor de RNI deve manter-se entre 3.0 e 4.5.

No LPCMA os “trombotestes” efetuam-se regularmente, de forma a estabelecer uma terapêutica anticoagulante adequada a cada paciente, visto que a dose de anticoagulante varia de indivíduo para indivíduo, variando até no mesmo indivíduo ao longo do tempo e de acordo com a sua alimentação.

TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO

O TTPa é um teste de triagem que permite o estudo global da atividade dos fatores de coagulação da via intrínseca (pré-caliceína, cininogénio de alto peso molecular (CAPM), fatores XII, XI, IX e VIII), bem como dos fatores da via comum (fatores X, V, protrombina e fibrinogénio), sendo os resultados obtidos expressos em segundos.

O princípio deste teste consiste em determinar o tempo de recalcificação plasmática em presença de cefalina, que corresponde a uma substância carregada negativamente, sendo um substituto dos fosfolípidos plaquetários, que funciona como uma tromboplastina parcial; de caulino, correspondente a um ativador da fase de contacto que permite a ativação do fator XII, sendo equivalente ao ativador de superfície que existe *in vivo*; e de iões Ca^{2+} ,

desencadeando em conjunto a formação do coágulo sanguíneo. Todas estas substâncias encontram-se no reagente *C.K. Prest*[®] utilizado na determinação do TTPa.

A tromboplastina parcial, utilizada na determinação do TTPa, é incapaz de ativar a via extrínseca, que requer uma tromboplastina completa, isto é, o FT.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A determinação do TTPa é realizada maioritariamente em conjunto com a determinação do TP, com o objetivo de realizar um estudo pré-cirúrgico e verificar se o processo de coagulação se encontra a funcionar normalmente, de forma a prevenir fenómenos hemorrágicos durante a cirurgia. No entanto, a determinação do TTPa corresponde também ao teste de eleição para a monitorização da terapia anticoagulante com heparina, sendo também utilizada como teste de triagem para a pesquisa de uma deficiência em determinados fatores de coagulação, ou para a pesquisa de inibidores.

O prolongamento do TTPa pode ocorrer devido:

- À presença de défices congénitos de determinado fator da via intrínseca ou comum;
- A anomalias ou défices adquiridos como as afeções hepáticas e coagulopatias de consumo.

5.5.2. START[®] 4 COAGULATION ANALYZER

O *STart*[®] 4 Coagulation Analyzer (figura 21) é um equipamento semiautomático utilizado no laboratório para a realização do estudo da coagulação. No LPCMA determina-se neste equipamento o TP e TTPa, apesar de o equipamento ser capaz de determinar outros parâmetros menos requisitados pelos clínicos, como o fibrinogénio e outros fatores da cascata de coagulação. A adição dos reagentes é realizada de forma manual e a determinação do tempo de formação do coágulo é fornecida de forma automática pelo equipamento.



Figura 21. *STart*[®] 4 Coagulation Analyzer.

Para a realização do estudo da coagulação utiliza-se como amostra o plasma do paciente, obtido após centrifugação do sangue presente no tubo de colheita com citrato de sódio na proporção de 1:9.

Este equipamento compreende um sistema eletromecânico, que lhe permite a detecção do coágulo e a determinação do tempo de formação do mesmo. O sistema de detecção utilizado para os ensaios de determinação do tempo de coagulação baseia-se no aumento da viscosidade do plasma testado à medida que se vai formando o coágulo. Este aumento de viscosidade é determinado através do movimento pendular de uma pequena esfera metálica que se adiciona à cuvete de leitura.

5.6. HEMOGLOBINA GLICADA

A Hb apresenta-se sob três formas distintas: HbA (> 96,5%), HbA₂ (< 3,5%) e HbF (níveis vestigiais <1%).

A HbA é a forma principal e nativa da Hb, sendo a HbA₀ o seu principal componente; na prática corresponde à chamada fração não-glicada da HbA. Por outro lado, a fração HbA₁, corresponde à forma carregada mais negativamente, devido à adição de glicose ou outros carboidratos, como a frutose-1,6-difosfato/glicose-6-fosfato e o ácido pirúvico. Existem, assim, vários subtipos de HbA₁ cromatograficamente distintos, tais como HbA_{1a}, HbA_{1b} e HbA_{1c} (hemoglobina glicada).

Dos diferentes subtipos de HbA₁, a fração HbA_{1c}, é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita, cujo terminal valina de uma ou das duas cadeias β está ligado à glicose através de uma reação não-enzimática, originando uma ligação estável e irreversível, que corresponde a cerca de 80% da HbA₁ total (figura 22). Do ponto de vista clínico, corresponde ao componente que deve ser avaliado nos portadores de *diabetes mellitus*.

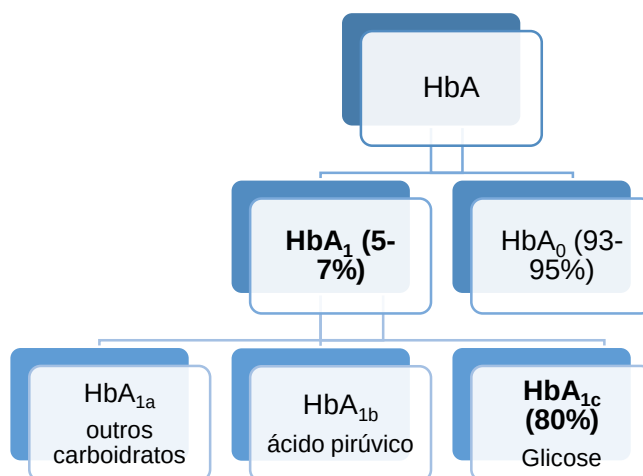


Figura 22. Diferentes subtipos de hemoglobina A. **Abreviaturas:** Hb, hemoglobina; HbA_{1c}, hemoglobina glicada.

Como os GV são permeáveis à glicose, a Hb presente no seu interior incorpora as moléculas de glicose em excesso, em função da sua concentração no sangue e também em função do tempo de semivida dos GV (aproximadamente 120 dias), pelo que a HbA_{1c} reflete a glicemia média das últimas 8 a 12 semanas. Este parâmetro tem como vantagens não depender de flutuações diárias da glicose sanguínea, da prática de exercício físico recente, da recente digestão de alimentos, nem da medicação que o paciente possa estar a efetuar.

A HbA_{1c} é determinada, principalmente, por rotina em todas as pessoas com *diabetes mellitus*, de forma a avaliar o grau de controlo glicémico, devendo ser realizada no mínimo de forma semestral. Deve ser efetuada, com maior frequência, em indivíduos com diabetes cujo tratamento mudou recentemente ou que não alcançaram os objetivos terapêuticos preconizados.

Deve ter-se em conta que outros fatores, para além dos níveis de glicose, podem conduzir a alterações nos valores de HbA_{1c}. Nessas situações incluem-se as seguintes condições clínicas:

- Hemoglobinopatias e anemias hemolíticas de diferentes etiologias, que devido ao elevado *turnover* eritrocitário conduzem geralmente a valores diminuídos de HbA_{1c};
- Anemia por deficiência em ferro, vitamina B₁₂ e/ou ácido fólico, que devido a uma diminuição no processo de eritropoiese conduzem a um aumento do tempo de semivida dos GV, levando a valores falsamente elevados de HbA_{1c}.

5.6.1. CAPILLARYS™ 2 FLEX-PIERCING

O doseamento da HbA_{1c} é realizado com recurso ao equipamento totalmente automatizado, *Capillarys™ 2 Flex-Piercing* (figura 23), que procede por eletroforese capilar (EC) em tampão alcalino, à separação e quantificação da fração de HbA_{1c} a partir de amostras de sangue total.



Figura 23. Equipamento *Capillarys™ 2 Flex-Piercing*.

PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Na EC em solução livre, as diferentes moléculas carregadas são separadas de acordo com a sua mobilidade eletroforética em tampão alcalino com pH específico.

Os capilares são preenchidos com uma solução hemolisante na sua extremidade anódica, sendo de seguida aplicado um campo elétrico de alta voltagem, que vai gerar uma corrente no interior do capilar e permitir a separação das diferentes frações de Hb presentes na amostra de sangue.

A deteção direta e a quantificação das diferentes frações de Hb é efetuada na parte catódica do capilar, através de um detetor espectrofotométrico de absorção na região UV/Vis, que mede a absorvância a 415nm (correspondente ao λ de absorção específico das hemoglobinas). Esta técnica permite assim a deteção das diferentes frações da Hb, na seguinte ordem, do cátodo para o ânodo, HbA₂, HbA₀, outras frações de HbA e HbA_{1c}, como se pode observar pelas figuras 24 e 25.

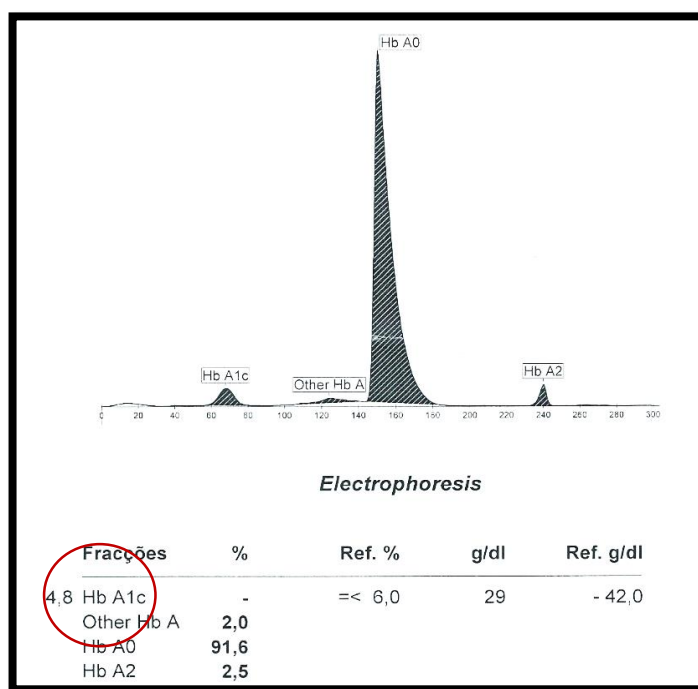


Figura 24. Eletroferograma normal.

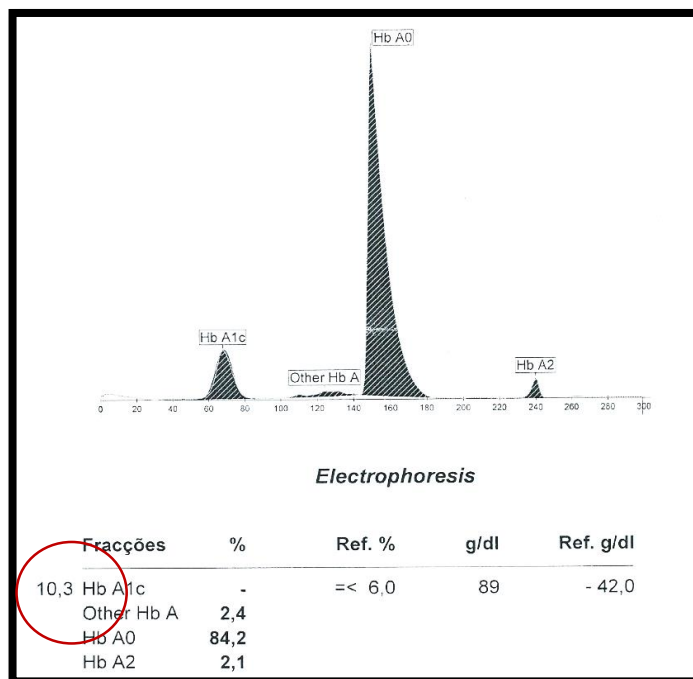


Figura 25. Eletroferograma alterado.

Os resultados da HbA_{1c} devem ser expressos em concentração (mmol/mol), de acordo com as recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*, e em % (1), segundo a *National Glycohemoglobin Standardization Program e Diabetes Control and Complications (NGSP/DCCT)*. Para além disso, deve ainda ser referida a glicemia média estimada, em mmol/L (2), obtida por cálculo a partir do valor da HbA_{1c}, em %. A concentração da fração individual de HbA_{1c} (mmol/mol) é quantificada diretamente pelo equipamento.

$$(1) \% HbA_{1c} = 0,09148 \times [HbA_{1c}] \left(\frac{mmol}{mol} \right) + 2,152$$

$$(2) \text{Glicemia média estimada} \left(\frac{mmol}{L} \right) = 1,59 \times HbA_{1c}(\%) - 2,59$$

Os valores de referência para a HbA_{1c} encontram-se entre 4% a 6%. Níveis de HbA_{1c} > 7% estão associados a um risco progressivamente superior de complicações crónicas, como a retinopatia diabética.

5.7. IMUNOHEMATOLOGIA

5.7.1. TIPAGEM SANGUÍNEA – GRUPOS ABO e Rh

A determinação do grupo sanguíneo é um dos parâmetros de maior importância na área da imunohematologia, apresentando implicações a nível das transfusões sanguíneas e dos processos de transplantação.

Apesar de existirem muitos grupos sanguíneos, apenas alguns é que apresentam uma maior importância clínica, pois são esses que podem originar casos de incompatibilidade ou processos de imunização. Esses grupos incluem o sistema ABO e o sistema Rhesus (Rh).

SISTEMA ABO E SISTEMA Hh

O sistema ABO é definido por 3 genes alelos - A, B, e O - e a sua expressão fenotípica é dependente do sistema de genes Hh, responsável pela produção da substância básica H à superfície dos GV, sobre a qual ocorre a ação das glicosiltransferases para a produção dos antígenos A e B. O sistema ABO permite assim a classificação do sangue humano num dos 4 fenótipos possíveis - A, B, AB ou O.

Os genes A e B são então responsáveis pela produção dos antígenos (Ag) a nível da membrana das células eritroides, controlando a síntese das enzimas responsáveis pela adição de um resíduo de carboidrato específico - N-acetilgalactosamina no caso do gene A e D-galactose na presença do gene B - à substância básica H existente a nível da membrana eritrocitária. O gene O é amorfo, pelo que em indivíduos deste grupo sanguíneo não ocorre a adição de nenhum carboidrato específico à substância H, não existindo, portanto, Ag A e/ou B à superfície eritrocitária (figura 26).

O sistema ABO caracteriza-se ainda pela presença de anticorpos (Ac) naturais dirigidos especificamente contra o(s) Ag(s) ausente(s) na membrana eritrocitária de um indivíduo.

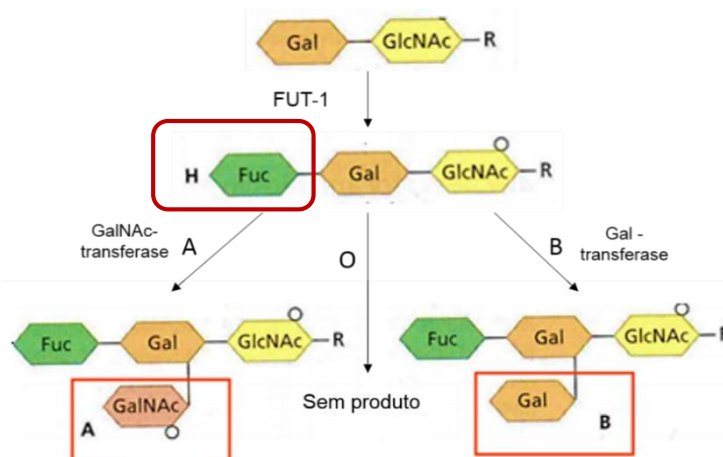


Figura 26. Sistema Hh e ABO. **Abreviaturas:** FUT-1, fucosiltransferase.

SISTEMA RHESUS

O sistema Rh caracteriza-se pela presença de um mosaico de Ag que são encontrados apenas na membrana eritrocitária. É definido por dois grupos de genes homólogos, RhD e RhCE, determinantes da produção dos Ag *D*, *C*, *c*, *E*, e *e* na membrana eritrocitária. No entanto, por possuir uma maior capacidade imunogénica, apenas o antígeno *D* possui maior relevância clínica.

Este sistema caracteriza-se ainda pela ausência de Ac naturais no soro, surgindo os Ac irregulares na sequência de processos de imunização. Assim, quando um indivíduo não possui Ag do sistema RhD, o sistema imunitário é facilmente estimulado produzindo Ac quando na presença de GV com antígeno *D*. Estas situações podem ocorrer numa gravidez ou transfusão, podendo dar origem à doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) ou a outras reações hemolíticas graves.

DETERMINAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO

Durante o estágio, para a determinação dos grupos sanguíneos, recorremos ao método de classificação direta, em que se procede à identificação dos Ag presentes na membrana eritrocitária (*A*, *B* e/ou *D*), testando os GV do paciente contra Ac específicos para os Ag eritrocitários. Utilizamos para isso os cards *DG Gel Confirm P*[®], que permitem a deteção da reação de aglutinação dos GV (figura 27).

As amostras utilizadas para este tipo de determinação são amostras de sangue total recentemente colhidas com o anticoagulante habitual, *K₃EDTA*.

Estes cards são constituídos por 8 microtubos, permitindo a realização simultânea de 2 testes. Cada microtubo contém um reagente com os Ac específicos ou um tampão. Assim, no microtubo *A* estão presentes Ac anti-*A*; no microtubo *B* Ac anti-*B*; no microtubo *D* Ac anti-*D*; e no microtubo controlo não está presente nenhum dos Ac, apenas uma solução tampão.



Figura 27. Card *DG Gel Confirm P*[®] utilizado para a determinação dos grupos sanguíneos (ABO e Rhesus). Podemos observar a presença de um grupo sanguíneo do tipo A negativo (5) e de um grupo AB positivo (6).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- **Resultado positivo:** durante a centrifugação, os aglutinados de GV são capturados de acordo com o seu tamanho na superfície ou extensão da coluna de gel, originando uma banda vermelha na parte superior do microtubo ou aglutinados pequenos na extensão da coluna.

- **Resultado negativo:** GV não aglutinados descem até ao fundo do microtubo, originando um botão de GV.

A leitura do card é muito simples, e encontra-se detalhada nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Interpretação dos possíveis resultados obtidos nos cards DG Gel Confirm P® para o sistema ABO

Sistema ABO			
Microtubo A	Microtubo B	Microtubo controlo	Grupo sanguíneo
0	0	0	Grupo O
+	0	0	Grupo A
0	+	0	Grupo B
+	+	0	Grupo AB

Abreviaturas: (+), aglutinação; (0), ausência de aglutinação

Tabela 13. Interpretação dos possíveis resultados obtidos nos cards DG Gel Confirm P® para o sistema Rhesus

Sistema Rhesus (antigénio D)		
Microtubo D	Microtubo controlo	Interpretação
+	0	D positivo
0	0	D negativo

Abreviaturas: (+), aglutinação; (0), ausência de aglutinação

5.7.2. PROVA DE COOMBS

A prova de Coombs é um teste imuno-hematológico que permite a deteção de Ac incompletos ligados à superfície dos GV, sendo que a reação Ag-Ac pode ter ocorrido *in vivo* ou *in vitro*, dependendo tratar-se de uma prova de Coombs direta ou indireta, respetivamente. Esta prova utiliza um reagente de antiglobulina humana (AGH) polivalente, que permite a deteção da aglutinação dos GV cobertos por imunoglobulinas (Ig) ou frações de complemento.

Na atividade diária do laboratório chegam maioritariamente pedidos de realização da prova de Coombs indireta.

PROVA DE COOMBS INDIRETA

A prova de Coombs indireta permite a detecção dos Ac eritrocitários irregulares clinicamente relevantes presentes no soro do paciente, por sensibilização *in vitro* dos GV. A ocorrência de aglutinação indica que o soro em estudo contém Ac que revestiram os GV comerciais durante a incubação *in vitro*.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A prova de Coombs indireta é particularmente importante na pesquisa de Ac irregulares na grávida, principalmente anticorpos anti-D, que se desenvolvem mais frequentemente. Assim, todas as mulheres grávidas e aquelas que pretendam engravidar, devem determinar o seu grupo sanguíneo (ABO e Rh), e devem ser testadas quanto à presença de aloanticorpos que possam estar direcionados contra Ag de origem paterna. Esta prova é realizada principalmente com o objetivo de evitar uma possível situação de DHRN.

Para além desta situação, a prova de Coombs indireta é ainda utilizada como teste pré-transfusional em todos os doentes candidatos a transfusões de sangue e/ou componentes sanguíneos específicos.

PROCEDIMENTO

Durante o estágio, para a realização da prova de Coombs indireta, recorreremos a um método manual através da utilização dos cards *DG Gel Coombs®*, que contêm nos seus 8 microtubos uma solução tampão com AGH polivalente. A amostra utilizada é o soro obtido após centrifugação do sangue total colhido sem anticoagulante e com ativador de coágulo. Após adição do soro do paciente e dos GV comerciais, os cards incubam durante 15 minutos na estufa, para que ocorra a ligação dos Ac aos Ag correspondentes presentes nos GV comerciais.

Os GV comerciais *SeraScan Diana 2/2P* adicionados correspondem a GV humanos com fenótipos distintos conhecidos, ambos pertencendo ao grupo sanguíneo O, para que as reações não sejam mascaradas por uma possível incompatibilidade ABO entre as células comerciais e o grupo da amostra em estudo. Estes GV apresentam à sua superfície os determinantes antigénicos mais significativos da maior parte dos sistemas dos grupos sanguíneos.

As AGH presentes nos microtubos atuam como ponte, unindo-se aos anticorpos que estão ligados à membrana eritrocitária, promovendo dessa forma a ligação entre os GV. Assim, se existirem Ac irregulares no soro materno, estes vão ligar-se aos Ag presentes na superfície dos GV comerciais adicionados, conduzindo a uma aglutinação que se torna visível graças à presença das AGH.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura e interpretação dos cards é realizada após a centrifugação dos mesmos.

- **Resultado negativo:** ausência de Ac no soro. Não ocorre aglutinação e os GV aparecem no fundo da coluna.

- **Resultado positivo:** presença de aglutinação eritrocitária. Aparecimento de uma banda de GV à superfície da coluna ou na sua extensão.

Um resultado positivo é seguido da realização de várias titulações do soro do paciente, para se verificar qual é a maior diluição a que ainda ocorre um resultado positivo; é esse valor que sai no boletim analítico do utente.

Sempre que o resultado é positivo, fica ao critério do clínico pedir a realização de uma identificação dos Ac irregulares encontrados.

5.8. CONTROLO DE QUALIDADE

5.8.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

No setor da Hematologia todos os equipamentos estão sujeitos a um CQI (tabela 14).

Tabela 14. Monitorização e periodicidade do controlo de qualidade interno diário efetuado nos vários equipamentos presentes no setor da Hematologia

Equipamento	CQI
Sysmex XT-1800iTM	Requer um controlo diário, que é alternado de forma sucessiva entre os diferentes níveis de controlo disponíveis: baixo, normal e alto.
Ves-Matic 20[®] STart[®] 4 Coagulation Analyzer	Requerem um controlo diário, utilizando-se simultaneamente os níveis de controlo disponíveis – normal e patológico.
CapillarysTM 2 Flex Piercing	Requer um controlo diário, utilizando-se de forma alternada os 2 níveis de controlo disponíveis – normal e patológico.

Abreviaturas: CQI, controlo de qualidade interno.

5.8.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

Em termos de AEQ, o laboratório participa no esquema de avaliação internacional de qualidade RIQAS. Estes controlos de qualidade são recebidos quinzenalmente e são efetuados nos equipamentos *Sysmex XT-1800iTM*, *CapillarysTM 2 Flex Piercing* e *STart[®] 4 Coagulation Analyzer*.

Para além disso, o laboratório participa ainda no programa UK NEQAS para avaliação de esfregaços sanguíneos. Uma vez por mês são avaliadas duas lâminas observando a morfologia e realizando a diferenciação leucocitária manual. É realizada ainda a observação de mais duas lâminas para pesquisa e identificação de parasitas sanguíneos.

6. VALÊNCIA DA BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA

As valências da Bioquímica e da Imunologia vão ser descritas em simultâneo neste capítulo do relatório, já que no LPCMA estas partilham o mesmo espaço físico e até alguns equipamentos. Os diferentes equipamentos e a respetiva metodologia encontram-se sumariados na tabela 15.

Tabela 15. Equipamentos presentes na valência da Bioquímica/Imunologia e a respetiva metodologia utilizada

Equipamento	Metodologia	Parâmetros
ARCHITECT® System i2000 ARCHITECT® System c8000	- Quimioluminescência	Parâmetros imunológicos
	- Fotometria	Parâmetros bioquímicos
	- Potenciometria	
Hydrasys®	- Eletroforese em gel	Proteinograma
Mini Vidas®	- ELFA	Marcadores cardíacos

Abreviaturas: ELFA, *Enzyme linked fluorescence assay*.

6.1. ARCHITECT® SYSTEM

Durante o tempo que permaneci na valência da Bioquímica/Imunologia, tive a oportunidade de trabalhar com os diferentes equipamentos, participando na realização da sua manutenção e controlo de qualidade, assim como no processamento das respetivas amostras.

Os parâmetros determinados no estudo imunoquímico pelos dois módulos do equipamento **ARCHITECT® System** estão representados na tabela 16.

Tabela 16. Diferentes parâmetros analíticos determinados no equipamento **ARCHITECT® System ci8200**

Parâmetros bioquímica (módulo c8000)		
Metabolismo dos lípidos	Equilíbrio hidroeletrolítico	Marcadores de anemia
Colesterol Total Triglicerídeos Lipoproteínas (HDL, LDL)	Ionograma sérico: Iões Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺	Ferro Capacidade total de fixação do ferro
Metabolismo ósseo e mineral	Função hepática e biliar	Função renal
Cálcio Fósforo Magnésio	Aminotransferases (ALT e AST) Fosfatase alcalina Gama-glutamyl transferase Bilirrubina direta e total Lactato desidrogenase	Ácido úrico Ureia Creatinina Microalbuminúria Clearance da creatinina

Continuação da **tabela 16**

Parâmetros bioquímica (módulo c8000)		
Metabolismo dos hidratos de carbono	Metabolismo proteico	
Glicose	Proteínas totais	
Prova de tolerância à glicose oral	Proteína C-reativa	
	Albumina sérica	
Parâmetros imunologia (módulo i2000)		
Função tiroideia	Hormonas sexuais/fertilidade	Marcadores víricos
T ₃ livre e total	Hormona folículo-estimulante	Hepatite C
T ₄ livre e total	Hormona luteína-estimulante	Hepatite B
Hormona estimulante da tiroide	Estradiol	Vírus da imunodeficiência humana
Anticorpos anti-tiroglobulina	Progesterona	
Anticorpos anti-peroxidase da tiroide	β-hCG total	
Marcadores de anemia	Função prostática	
Ferritina		
Transferrina	PSA livre	
Vitamina B12	PSA total	
Ácido Fólico		

Abreviaturas: ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; Cl⁻, iões cloreto; hCG, gonadotrofina coriônica humana; HDL, lipoproteína de alta densidade; K⁺, iões potássio; LDL, lipoproteína de baixa densidade; Na⁺, iões sódio; PSA, antígeno específico da próstata; T₃, triiodotironina; T₄, tiroxina.

6.1.1. METODOLOGIAS

O **ARQUITECT® System ci8200** é um analisador completamente automatizado, constituído por dois módulos de processamento, **c8000** e **i2000**, utilizados na determinação dos parâmetros bioquímicos e imunológicos, respetivamente. A deteção e o doseamento dos analitos é realizada através da tecnologia fotométrica, potenciométrica ou por quimioluminescência, encontrando-se estes métodos descritos na tabela 17.

Tabela 17. Descrição do fundamento das diferentes metodologias aplicadas pelo equipamento ARQUITECT® System ci8200

Método	Princípio de funcionamento
Fotometria	Consiste na medição da absorvância da amostra de forma a determinar a concentração de um determinado analito. A absorvância da solução altera-se à medida que uma reação progride, sendo a medição efetuada quando os reagentes acabam e a absorvância se torna estável (denominados ensaios de ponto final), ou quando as reações atingem uma atividade estável em que a modificação na absorvância das leituras é constante (denominados ensaios cinéticos).
Quimioluminescência (CMIA)	A quimioluminescência corresponde à emissão de luz quando um eletrão passa de um estado excitado para um nível energético inferior. Essa excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante. O CMIA é utilizado para a deteção e determinação dos níveis de antigénios ou anticorpos específicos presentes nas amostras em estudo. Os reagentes envolvidos nesta metodologia incluem: - Micropartículas paramagnéticas revestidas com uma molécula de captura; pode ser um antigénio ou um anticorpo, dependendo da determinação a efetuar. - Conjugado marcado com a acridina - marcador quimioluminescente. - Agente oxidante da acridina. A luz quimioluminescente produzida durante a reação é direta ou indiretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra, dependendo do tipo de ensaio efetuado.
Potenciometria	Consiste na utilização de um módulo ICT para a quantificação simultânea de iões Na^+, K^+ e Cl^- no soro ou urina humanos, através da medição do potencial elétrico por potenciometria indireta. A voltagem desenvolvida no eletrodo seletivo para o ião a determinar, corresponde à atividade do ião e está diretamente relacionada com a sua concentração na solução, sendo obtida através da equação de <i>Nernst</i>.

Abreviaturas: Cl^- , iões cloro; CMIA, imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência; ICT, integrated chip technology; K^+ , iões potássio; Na^+ , iões sódio.

6.1.2. PARÂMETROS DETERMINADOS

METABOLISMO DOS HIDRATOS DE CARBONO

GLICOSE

A glicose é um substrato energético fundamental para o funcionamento de muitos tecidos, e apesar das alterações agudas causadas pela ingestão de alimentos ou por períodos de jejum, os níveis de glicose sanguíneos são mantidos constantes (70-110 mg/dL), por ação de um sistema de controlo neuro-hormonal que protege o organismo contra amplas variações da sua concentração.

A determinação dos níveis de glicose no sangue constitui assim o procedimento laboratorial mais frequentemente utilizado para auxiliar no diagnóstico e tratamento de *diabetes mellitus*. Para isso, a glicemia é doseada maioritariamente após 8 horas de jejum ou como parte de uma PTGO.

Na tabela 18 encontram-se mencionadas as principais situações associadas a alterações nos níveis séricos de glicose.

Tabela 18. Situações associadas a alterações dos níveis séricos de glicose

Hipoglicemia	Hiperglicemia
Terapêutica excessiva com insulina	Diabetes
Determinadas doenças hepáticas	Neoplasma pancreático
Jejum prolongado	Hipertiroidismo

PROVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL

O diagnóstico de *diabetes mellitus* é realizado quando os níveis de glicemia em jejum são ≥ 126 mg/dL; quando os níveis de glicemia ocasionais são ≥ 200 mg/dL, em conjunto com sintomas clássicos, como poliúria, polidipsia e polifagia; quando os níveis de HbA_{1c} são $\geq 6,5\%$; ou, quando os níveis de glicemia às 2h são ≥ 200 mg/dL, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO). Esta prova é também realizada como parte do controlo de diabetes gestacional (DG), em todas as mulheres grávidas entre a 24^a e 28^a semana de gestação, que na 1^a consulta de gravidez apresentem valores de glicemia em jejum < 92 mg/dL. (tabela 19).

A PTGO avalia a *clearance* da glicose em circulação, após uma sobrecarga oral de glicose em condições controladas. Para a sua realização, é feita inicialmente a determinação dos níveis de glicose em jejum, que não podem ser superiores a 140 mg/dL, sendo de seguida efetuada a ingestão de 75gr de glicose diluída em 300 mL de água; solução que deve ser ingerida num período máximo de 5 minutos.

Tabela 19. Critérios para a realização do diagnóstico de diabetes mellitus e diabetes gestacional

Diagnóstico	
Diabetes mellitus	É critério para o diagnóstico de <i>diabetes mellitus</i> uma das seguintes condições: - Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL, em pelo menos duas determinações; ou - Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL; ou - HbA1c $\geq 6,5\%$, em pelo menos duas determinações; ou - Glicemia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na PTGO com 75gr de glicose.
Diabetes gestacional	É critério para o diagnóstico de DG pela PTGO, a confirmação de um ou mais dos valores abaixo mencionados. - Às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dL - À 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dL - Às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dL

Abreviaturas: DG, diabetes gestacional; HbA_{1c}, hemoglobina glicada; PTGO, prova de tolerância à glicose oral.

METABOLISMO DOS LÍPIDOS

Alterações na função e/ou nos níveis das lipoproteínas plasmáticas originam as dislipidemias, que por sua vez podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV).

Assim, a determinação laboratorial dos marcadores do metabolismo lipídico possui grande importância na identificação e caracterização de doentes com risco de desenvolvimento de DCV e na monitorização e orientação terapêutica das dislipidemias.

O diagnóstico das dislipidemias realiza-se pela avaliação laboratorial, no soro e em jejum de 12 horas, do colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo recomendável o rastreio de doença coronária a todos os adultos a partir dos 20 anos de idade, pelo menos de 5 em 5 anos.

TRIGLICERÍDEOS

Os TG são obtidos essencialmente por via exógena e constituem cerca de 95% das reservas tecidulares lipídicas, que são mobilizadas em condições de falta do substrato energético principal, a glicose.

Concentrações aumentadas de TG podem surgir em casos de hipertrigliceridemia primária (fatores hereditários) ou hipertrigliceridemia secundária, em consequência da existência de hipotireoidismo, alcoolismo, *diabetes mellitus*, doença renal ou de uma dieta não equilibrada.

COLETEROL TOTAL

O colesterol é um lípido esteroide sintetizado maioritariamente pelo próprio organismo, no fígado; encontra-se associado essencialmente à produção de hormonas esteroídes e à síntese das paredes celulares.

Níveis aumentados de CT podem surgir devido a uma hipercolesterolemia primária (fatores hereditários) ou hipercolesterolemia secundária, em consequência da existência de hipotireoidismo, dieta não equilibrada, *diabetes mellitus*, obesidade ou consumo excessivo de álcool. O aumento dos níveis de CT tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de DCV, devendo, no entanto, ser avaliado em conjunto com os níveis de colesterol HDL, colesterol LDL e TG.

LIPOPROTEÍNAS

Os lípidos insolúveis são transportados sob a forma de lipoproteínas, constituídas por uma fração lipídica e outra proteica. Estas lipoproteínas contêm quantidades variadas de colesterol, TG, proteínas e fosfolípidos, funcionando como meios de transporte e de troca destas substâncias entre o sangue e os diversos tecidos do nosso organismo.

As proporções relativas de proteínas e lípidos determinam a densidade destas lipoproteínas e fornecem uma base para a sua classificação. Assim, as diferentes classes de lipoproteínas incluem os quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), LDL e HDL, possuindo cada uma delas efeitos distintos no risco de desenvolvimento de uma DCV.

Tabela 20. Características e considerações clínicas das diferentes lipoproteínas determinadas no laboratório

Parâmetros	Características	Considerações clínicas
Colesterol HDL	- A sua principal função é a captação e o transporte reverso do colesterol; - Tem um papel cardioprotetor, evitando a deposição de lípidos na parede arterial e posterior processo arteriosclerótico.	↓ [colesterol HDL]: está associado a um maior risco de desenvolvimento de DCV.
Colesterol LDL	- Corresponde à principal forma de distribuição de ésteres de colesterol aos vários tecidos, onde são utilizados na síntese das membranas e hormonas; - Partícula lipídica altamente aterogénica.	↑ [colesterol LDL]: está associado a um maior risco de desenvolvimento de um processo arteriosclerótico. A sua determinação é realizada pelo equipamento através da fórmula de <i>Friedewald</i>, se os valores de TG forem inferiores a 400 mg/dL (anexo 1).

Abreviaturas: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; [], concentração; DCV, doença cardiovascular; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos.

IONOGRAMA SÉRICO

O ionograma sérico consiste na determinação da concentração dos principais eletrólitos encontrados no organismo, incluindo os íons Na^+ (sódio), K^+ (potássio) e Cl^- (cloreto), permitindo desta forma realizar uma avaliação geral do equilíbrio hidroeletrolítico do organismo.

Na tabela 21 encontram-se as características dos íons doseados como parte do ionograma sérico.

Tabela 21. Características e considerações clínicas referentes aos eletrólitos incluídos no ionograma sérico

Íons	Características	Considerações clínicas
Íons Na^+	- Catião predominante no líquido extracelular; - Possui um papel essencial na distribuição hídrica e na manutenção da pressão osmótica nos compartimentos do líquido extracelular.	↑ [íons Na^+]: Desidratação, <i>diabetes insipidus</i> (perda de água superior à perda de Na^+), sobrecarga de sódio. ↓ [íons Na^+]: diminuição da ingestão de sódio pela dieta, perdas a nível renal (uso excessivo de diuréticos) ou gastrointestinal.
Íons K^+	- Principal catião intracelular, encontrando-se em baixas concentrações a nível sanguíneo; - Regula a excitabilidade neuromuscular e a contratilidade muscular.	↑ [íons K^+]: Desidratação grave, rabdomiólise, insuficiência renal. ↓ [íons K^+]: Diminuição da ingestão de potássio, perdas aumentadas a nível renal ou gastrointestinal.
Íons Cl^-	- Principal anião extracelular; - Contribui para a regulação e manutenção do equilíbrio da distribuição do fluído extracelular, auxiliando também na regulação do pH sanguíneo.	↑ [cloro]: Desidratação grave, insuficiência renal. ↓ [cloro]: Perdas de sal em consequência de doença renal ou gastrointestinal.

Abreviaturas: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; [], concentração; Cl^- , íons cloreto; K^+ , íons potássio; Na^+ , íons sódio.

METABOLISMO PROTEICO

PROTEÍNAS TOTAIS

As diferentes proteínas existentes a nível sérico possuem variadas funções biológicas, podendo funcionar como proteínas de transporte, proteínas de defesa, proteínas com função enzimática e proteínas de regulação da pressão osmótica, entre outras funções.

Em situações de patologia, tanto o nível plasmático das proteínas totais (PT), como a concentração individual das diferentes proteínas, pode estar bastante alterado em relação aos valores de referência. Alterações nos níveis das PT séricas apresentam uma

correlação clínica variada e o interesse da sua determinação é, essencialmente, o uso como teste de *screening* para avaliar o estado de saúde geral do paciente.

No LPCMA também se efetua o doseamento de PT urinárias, no entanto essa análise é menos frequentemente requisitada pelos clínicos.

Na tabela 22 encontram-se mencionadas as principais situações associadas a alterações nos níveis de proteínas totais.

Tabela 22. Situações associadas a alterações nos níveis séricos de proteínas totais

Hipoproteinemia	Hiperproteinemia
- Síndrome nefrótica - Perdas sanguíneas extensas - Deficiente absorção proteica	- Desidratação severa - Mieloma múltiplo - Processos inflamatórios/infecciosos

ALBUMINA

A determinação da concentração de albumina no soro é realizada através do proteinograma (onde se obtém a % de albumina) e da concentração de PT obtida no módulo c8000 do equipamento ARCHITECT® System, através da seguinte expressão:

$$[albumina]\left(\frac{mg}{dL}\right) = \frac{\text{concentração de PT}\left(\frac{mg}{dL}\right) \times \% \text{ albumina (proteinograma)}}{100}$$

PROTEÍNA C-REATIVA

A PCR é uma proteína de fase aguda, sintetizada a nível hepático, cuja concentração sobe inespecificamente em resposta a um processo infeccioso ou inflamatório. É, deste modo, utilizada como auxiliar de diagnóstico no controlo terapêutico farmacológico e acompanhamento de diversas patologias, sendo um dos marcadores precoces mais sensíveis de inflamação/infeção.

METABOLISMO ÓSSEO E MINERAL

O metabolismo ósseo e mineral é essencialmente regulado pela ação conjunta das hormonas paratormona (PTH), calcitonina e vitamina D.

A PTH promove o aumento do cálcio sérico por estimular a desmineralização óssea e por diminuir a sua excreção a nível renal, estimulando também a síntese de vitamina D. Esta, por sua vez promove a reabsorção de cálcio, fósforo e magnésio a nível intestinal. Contrabalançando estes efeitos, a calcitonina diminui a reabsorção de cálcio e fósforo a

nível dos túbulos renais, e inibe a liberação de cálcio pelo tecido ósseo, diminuindo assim os seus níveis séricos.

Na tabela 23 encontram-se descritas as características dos principais íons associados ao metabolismo ósseo e mineral.

Tabela 23. Características e considerações clínicas dos principais íons relacionados com o metabolismo ósseo e mineral

Parâmetro	Características	Considerações clínicas
Cálcio	- Principal catião divalente do organismo, encontrando-se concentrado predominantemente no tecido ósseo; - Participa nos mecanismos de transmissão neuromuscular e na contração muscular.	- ↑ [cálcio sérico]: hiperparatireoidismo, administração excessiva de vitamina D, neoplasias ósseas; - ↓ [cálcio sérico]: deposição de cálcio nos ossos ou tecidos, hipoparatiroidismo, deficiência em vitamina D.
Fósforo	- A maior parte do fósforo encontra-se no tecido ósseo combinado com o cálcio, encontrando-se o restante principalmente no interior das células, onde está intimamente implicado no metabolismo energético.	- ↑ [fósforo sérico]: dieta rica em fósforo, hipervitaminose D, insuficiência renal; - ↓ [fósforo sérico]: deficiência em vitamina D, perdas renais crônicas.
Magnésio	- Nutriente essencial com um papel de extrema importância no metabolismo celular; - Encontra-se predominantemente no compartimento intracelular, principalmente complexado a nível ósseo com o cálcio e o fósforo inorgânico.	- ↑ [magnésio sérico]: insuficiência renal, ingestão excessiva de magnésio sob a forma de suplemento; - ↓ [magnésio sérico]: perdas excessivas e redução da absorção a nível intestinal ou perdas urinárias.

Abreviaturas: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; [], concentração.

METABOLISMO RENAL

Uma função renal adequada é fundamental, pois os rins contribuem para a manutenção da homeostasia do meio interno, funcionando também como local de síntese de moléculas essenciais ao organismo e local de excreção de variados metabolitos.

A doença renal está associada com uma gradual e habitualmente permanente perda da função renal, sendo caracterizada pelo comprometimento dos nefrônios. A determinação

de alguns parâmetros bioquímicos, tanto de rotina como exames mais específicos, constitui uma ferramenta útil no *screening*, diagnóstico e monitorização de alterações ao nível da função renal.

Os testes de avaliação renal incluem a determinação da concentração sérica de ureia, ácido úrico e creatinina (tabela 24), *clearance* da creatinina e microalbuminúria.

Tabela 24. Características e considerações clínicas de alguns parâmetros doseados no laboratório para a avaliação da função renal

Parâmetros	Características	Considerações clínicas
Ureia	A ureia é essencialmente excretada a nível renal, pelo que uma função renal diminuída conduz a situações de hiperuremia. No entanto, a [ureia] sérica pode variar com a ingestão proteica, estados catabólicos e uso de alguns fármacos, sendo um indicador menos específico da função glomerular renal.	A quantificação da ureia sérica é utilizada na avaliação da função renal, devendo estar associada à determinação da [creatinina] sérica. ↑ [ureia]: dieta rica em proteínas, estados catabólicos, desidratação, doença renal. ↓ [ureia]: dieta pobre em proteínas, insuficiência hepática, má absorção intestinal.
Creatinina	A creatinina é derivada, em grande parte, do catabolismo da creatina presente no tecido muscular, sendo excretada pelos rins de forma constante e proporcional à massa muscular do indivíduo.	A quantificação da creatinina sérica é utilizada no diagnóstico e monitorização da doença renal e na determinação da TFG. ↑ [creatinina] sérica: disfunção renal de variadas etiologias.
Ácido úrico	Corresponde ao produto final do catabolismo das purinas e ácidos nucleicos.	↑ [ácido úrico] (hiperuricemia): disfunção renal, gota, <i>diabetes mellitus</i> , algumas doenças genéticas.

Abreviaturas: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; [], concentração; TFG, taxa de filtração glomerular.

CLEARANCE DA CREATININA

Para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), utiliza-se a *clearance* da creatinina, que é utilizada por ser um marcador mais sensível de disfunção renal do que a concentração sérica de creatinina. No entanto, sabe-se que podem surgir valores ligeiramente sobrestimados da TFG, pois apesar da creatinina ser totalmente filtrada nos glomérulos e não sofrer reabsorção pelos túbulos renais, possui uma ligeira secreção ativa a nível dos túbulos proximais.

Para a determinação da *clearance* da creatinina, é necessário fazer o doseamento da creatinina sérica e urinária num espaço de 24 horas, utilizando-se para isso uma colheita de urina de 24 horas. A *clearance* da creatinina vai corresponder ao volume de soro sanguíneo que é depurado de creatinina por unidade de tempo e obtém-se através da seguinte fórmula:

$$TFG = \text{Clearance creatinina} \left(\frac{mL}{min} \right) = \frac{Cr_{urina} \left(\frac{mg}{dL} \right)}{Cr_{soro} \left(\frac{mg}{dL} \right)} \times \frac{\text{Volume de urina 24h (mL)}}{1440 (min)}$$

Níveis aumentados de creatinina sérica em conjunto com uma *clearance* diminuída são indicativas de uma disfunção renal, auxiliando na detecção precoce de uma insuficiência renal.

MICROALBUMINÚRIA

Denomina-se de microalbuminúria a presença de quantidades mínimas de albumina na urina, sendo que a sua determinação pode ser realizada numa urina ocasional ou numa urina de 24 horas.

Como possui baixo peso molecular, a albumina é das primeiras proteínas a surgir na urina quando existe lesão a nível glomerular, podendo também surgir em determinados estados fisiológicos. A determinação da microalbuminúria numa amostra ocasional é a mais simples de realizar na prática clínica, sendo utilizada essencialmente no *screening* da função renal. O doseamento de microalbuminúria na urina de 24 horas é o que surge mais frequentemente no laboratório, sendo normalmente utilizado para a avaliação e monitorização de determinado tratamento, fornecendo uma informação mais correta acerca da função renal.

Assim, a determinação da microalbuminúria fornece informações importantes, funcionando como marcador precoce de lesão renal, sendo também importante na monitorização de doentes com *diabetes mellitus*, pois a nefropatia diabética é uma das consequências graves desta doença.

FUNÇÃO HEPÁTICA E BILIAR

O fígado é um órgão muito complexo que realiza várias funções essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Essas funções incluem o metabolismo dos carboidratos, lípidos e proteínas; conjugação e excreção de diversas substâncias; síntese de proteínas plasmáticas; capacidade de converter importantes hormonas na sua forma ativa; depuração de substâncias tóxicas; entre muitas outras funções.

Os testes laboratoriais que permitem avaliar a função hepática e biliar encontram-se mencionados na tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros laboratoriais utilizados na avaliação da função hepática e biliar

Parâmetros	Aplicação clínica
ALT	Correspondem a enzimas intracelulares, permitindo desta forma avaliar a extensão da lesão hepática e diferenciar entre uma lesão hepatocelular ou obstrutiva.
AST	
LDH	
FA	Correspondem a enzimas que se encontram ligadas à membrana celular dos canalículos biliares, estando o seu aumento principalmente associado a situações de colestase hepática.
GGT	
Bilirrubina direta e total	Permitem o estudo da capacidade funcional do fígado.

Abreviaturas: ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama-glutamil transferase; LDH, lactato desidrogenase.

INDICADORES DE DANO HEPATOCELULAR

A alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a lactato desidrogenase (LDH) são indicadores sensíveis de dano hepático, especialmente quando se trata de uma lesão aguda. Geralmente, este tipo de lesão, traduz-se por um aumento desproporcional da ALT e AST em relação à fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT). As características e a interpretação clínica dos níveis séricos destas enzimas, encontram-se descritas nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da lesão hepatocelular

Parâmetro	Características	Interpretação clínica
AST	Pode ser encontrada em diferentes tecidos (hepático, renal, cardíaco, muscular), tratando-se assim de um marcador menos específico de lesão hepática.	- Níveis séricos significativamente elevados de ambas as enzimas (com a ALT em valores superiores) estão associados a lesão hepatocelular, como cirrose, diferentes hepatites e carcinoma hepatocelular.
ALT	Está maioritariamente presente a nível hepático, sendo considerado o indicador mais específico de lesão hepática.	- Quando a [AST] é superior à [ALT], geralmente trata-se de uma lesão causada pelo álcool, tendo em conta o seu o efeito inibidor na síntese de ALT. - Um aumento isolado da AST pode ser indicativo de lesão do miocárdio.

Continuação da **tabela 26**

Parâmetro	Características	Interpretação clínica
LDH	Encontra-se amplamente distribuída pelos diferentes tecidos, correspondendo a um marcador não específico de lesão hepática.	Níveis séricos aumentados de LDH indicam apenas a existência de uma lesão tecidular. Assim, o seu doseamento deve ser realizado em conjunto com outros marcadores de lesão hepática.

Abreviaturas: [], concentração; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; LDH, lactato desidrogenase.

INDICADORES DE COLESTASE HEPÁTICA

Quando o fluxo biliar está comprometido, quer seja por uma obstrução de origem intra ou extra-hepática, estamos perante uma situação de colestase.

Nestas situações existem determinadas enzimas presentes na membrana dos canalículos biliares que tendem a fluir para o plasma, conduzindo a um aumento superior da FA e da GGT plasmáticas em relação às aminotransaminases.

Tabela 27. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da colestase hepática

Parâmetro	Características	Interpretação clínica
GGT	Encontra-se essencialmente a nível renal. No entanto, quando aparece no soro parece ter origem sobretudo no sistema hepatobiliar. É considerado o marcador mais sensível em casos de colestase hepática.	- Níveis de GGT séricos significativamente aumentados estão geralmente associados a colestase hepática. - O aumento sérico desta enzima também ocorre noutras doenças hepáticas, como cirrose ou hepatite, ocorrendo nestes casos apenas um aumento ligeiro desta enzima em relação às aminotransferases. - É muitas vezes utilizada na monitorização de doentes que sofrem de alcoolismo e no diagnóstico de hepatite alcoólica, uma vez que o álcool estimula a sua síntese.

Continuação da **tabela 27**

Parâmetro	Características	Interpretação clínica
FA	Encontra-se em níveis elevados nos túbulos renais, epitélio intestinal, osteoblastos, canalículos biliares e placenta, tratando-se de um marcador não específico de doença hepática.	- Níveis séricos elevados de FA não são específicos de colestase hepática, podendo o seu aumento ocorrer em qualquer tipo de lesão hepática (com um aumento menos acentuado na cirrose e hepatite). - Encontra-se também aumentada em algumas doenças ósseas e gastrointestinais. No entanto, nestes casos não ocorre um aumento sérico simultâneo da [GGT]. - O seu aumento pode ainda estar associado a situações fisiológicas, incluindo a gravidez e os períodos de crescimento.

Abreviaturas: [], concentração; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama-glutamil transferase.

BILIRRUBINAS

A bilirrubina corresponde a um composto originário da degradação do grupo heme, sendo este maioritariamente proveniente do catabolismo dos GV senescentes no sistema reticuloendotelial, principalmente no baço.

A bilirrubina produzida na sua forma insolúvel (bilirrubina não-conjugada/indireta), vai ser transportada para o fígado ligada à albumina plasmática. Após o processo de captação, no fígado, a bilirrubina torna-se hidrossolúvel através da conjugação com o ácido glucorónico, de forma a produzir a bilirrubina na sua forma conjugada (bilirrubina direta). Esta, é depois excretada através do sistema biliar para o intestino, onde é convertida pelas bactérias da flora intestinal a um grupo de compostos designados coletivamente de estercobilinogénio. Assim, a eliminação da bilirrubina conjugada em condições normais é quase total, e os níveis séricos são geralmente insignificantes.

A concentração sérica de bilirrubina reflete o balanço entre a sua taxa de produção e a *clearance* hepática. Quando, por alguma razão, o metabolismo da bilirrubina se encontra comprometido, ocorre acumulação de bilirrubina não-conjugada e/ou bilirrubina conjugada na circulação sanguínea, dependendo tratar-se de uma lesão pré-hepática, hepática ou colestática. Este fenómeno conduz, numa fase avançada, à deposição de bilirrubina a nível da pele e mucosas, situação patológica denominada de icterícia.

Na tabela 28 encontram-se descritas as características e a respetiva interpretação clínica dos parâmetros utilizados para a avaliação da capacidade funcional do fígado.

Tabela 28. Características e interpretação clínica dos parâmetros utilizados na avaliação da capacidade funcional do fígado

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
Bilirrubina direta/conjugada	A hiperbilirrubinemia conjugada ocorre devido a doença hepatocelular ou do trato biliar. O fator que se encontra comprometido é principalmente o transporte/excreção da bilirrubina conjugada para os canalículos biliares.	↑ [bilirrubina conjugada]: - Lesão hepatocelular (em situações como hepatite, cirrose, tumores), obstrução biliar e algumas doenças hereditárias em que a excreção de bilirrubina se encontra comprometida.
Bilirrubina indireta/não-conjugada	A hiperbilirrubinemia não-conjugada pode ocorrer por um aumento da produção de bilirrubina, por uma diminuição da captação hepática de bilirrubina ou por distúrbios no processo de conjugação no fígado.	↑ [bilirrubina não-conjugada]: estados de hiperhemólise (capacidade de conjugação do fígado saturada), presença de doenças genéticas que afetam o processo de <i>uptake</i> e/ou conjugação da bilirrubina no fígado.
Bilirrubina total	O aumento da bilirrubina total pode dever-se ao aumento da fração conjugada e/ou da fração não-conjugada.	- Se existir um aumento dos níveis séricos de bilirrubina total é importante saber se estamos perante um aumento da fração conjugada e/ou da fração não-conjugada.

Abreviaturas: ↑, aumento; [], concentração.

MARCADORES DE ANEMIA

ANEMIA FERROPÉNICA

O estudo laboratorial do ciclo do ferro inclui o doseamento deste e da ferritina sérica, e ainda a determinação da capacidade total de fixação do ferro (CTFF) e dos níveis de transferrina, fornecendo deste modo uma informação detalhada acerca do *status* do ferro no organismo (tabela 29).

Tabela 29. Características e interpretação clínica dos diferentes parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
Ferro	- É utilizado principalmente na síntese da molécula de Hb nos eritroblastos. - É obtido essencialmente através da dieta, mas também pelo processo de “reciclagem” dos GV senescentes. - O ferro proveniente da dieta encontra-se na sua forma férrica e sob a forma de grupo heme. - Para que o Fe^{3+} seja absorvido a nível intestinal tem que ser reduzido a Fe^{2+}, e depois no sangue é oxidado de novo para ser transportado pela transferrina para os diferentes locais que necessitam de ferro, principalmente a nível da MO.	↑ [ferro] sérico: hemocromatose, hemossiderose, anemias hemolíticas. ↓ [ferro] sérico: perda crónica de sangue, má absorção intestinal de ferro, dieta deficiente em ferro e em situações fisiológicas como a gravidez.
Ferritina	- É uma proteína de fase aguda positiva, que funciona como uma proteína de armazenamento de ferro. É rapidamente mobilizável para a eritropoiese em casos de deficiência em ferro. - A sua concentração sérica encontra-se diretamente relacionada com as reservas teciduais de ferro existentes.	↑ [ferritina]: ingestão excessiva de ferro, inflamação/infeção, hemocromatose. ↓ [ferritina]: anemia ferropénica.
Transferrina	É uma proteína de fase aguda negativa sintetizada a nível hepático, correspondendo à principal proteína transportadora de ferro na sua forma férrica.	↑ [transferrina]: anemia ferropénica. ↓ [transferrina]: situações de inflamação, lesão tecidual, doença hepática crónica e hemocromatose.
CTFF	- A CTFF é uma medida da quantidade de ferro total que a transferrina pode unir e transportar para os locais que necessitam de ferro. - Um aumento na concentração plasmática de transferrina, em situações de carência de ferro, eleva a CTFF.	↑ [CTFF]: anemia ferropénica. ↓ [CTFF]: anemia das doenças crónicas, infeção/inflamação.

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração; CTFF, capacidade total de fixação do ferro; Fe^{2+} , ferro na forma ferrosa; Fe^{3+} , ferro na forma férrica; GV, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina; MO, medula óssea.

ANEMIAS MEGALOBLÁSTICAS

As anemias megaloblásticas ocorrem com síntese defeituosa de DNA ao nível das células eritropoéticas, essencialmente devido à deficiência em ácido fólico e/ou vitamina B₁₂ (tabela 30).

Tabela 30. Características e interpretação clínica dos diferentes parâmetros utilizados no diagnóstico de anemias megaloblásticas

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
Vitamina B₁₂	- Vitamina hidrossolúvel, presente essencialmente em alimentos de origem animal. - É essencial para a síntese de DNA a nível da hematopoiese, estando também envolvida na formação e manutenção da bainha de mielina.	↓ [vitamina B₁₂] sérica: síndrome de má absorção intestinal, dieta pobre em vitamina B₁₂, defeitos congénitos nos transportadores da vitamina B₁₂. ↑ [vitamina B₁₂] sérica: utilização de suplementos vitamínicos.
Ácido fólico	- É uma vitamina obtida essencialmente através da dieta vegetal, funcionando como cofator em diversas vias metabólicas. - É essencial na síntese de DNA a nível da hematopoiese.	↓ [ácido fólico] sérico: dieta pobre em ácido fólico, má absorção a nível gastrointestinal, aumento das necessidades fisiológicas em ácido fólico (gravidez). ↑ [ácido fólico] sérico: utilização de suplementos vitamínicos.

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração.

FUNÇÃO TIROIDEIA

A glândula da tiroide secreta duas hormonas, a triiodotironina (T₃) e a tiroxina (T₄), sendo a sua produção regulada pela hormona estimulante da tiroide (TSH), produzida pela hipófise, que por sua vez é previamente regulada pela hormona libertadora de tireotrofina (TRH) ao nível hipotalâmico. Os níveis de TSH variam dinamicamente em resposta a alterações dos níveis circulantes de T₃ e T₄.

Quando libertadas na circulação sanguínea as hormonas da tiroide circulam maioritariamente ligadas a proteínas transportadoras, como a globulina ligadora de tiroxina, pré-albumina e albumina. Assim, apenas uma pequena fração de cada hormona circula sob a forma livre, estando disponível para exercer as suas funções biológicas.

Os testes laboratoriais da função da tiroide são necessários para auxiliar no diagnóstico e monitorização de qualquer etapa da regulação do eixo hipotálamo – hipófise - tiroide, sendo utilizados na triagem da função tireoideia, na avaliação da terapia a utilizar e na monitorização do tratamento nos estados de hipertiroidismo e hipotiroidismo.

Tabela 31. Características e interpretação clínica dos níveis séricos de hormonas tiroideias

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
TSH	- É produzida pela hipófise e estimula a produção e secreção de T₃ e T₄ pela glândula tiroideia. - A sua síntese é estimulada em resposta a níveis diminuídos de hormonas tiroideias, sendo inibida por um mecanismo de feedback negativo quando na presença de elevadas [T₃ e T₄].	- A determinação da [TSH] é utilizada na avaliação primária da função tiroideia e no diagnóstico diferencial das doenças associadas à tiroide. - ↑ [TSH]: hipotireoidismo primário (Doença de Hashimoto), hipertireoidismo secundário (tumor hipofisário secretor de TSH). - ↓ [TSH]: hipotireoidismo secundário e terciário (doenças hipofisárias e hipotalâmicas), hipertireoidismo primário (Doença de Graves).
T₃ total	- Da T₃ total circulante, apenas 20% é secretada pela tiroide, sendo a restante produzida por deiodinação da T₄ em tecidos periféricos. - Grande parte da T₃ total encontra-se conjugada a proteínas transportadoras.	O seu doseamento é influenciado por fatores secundários (gravidez, síndrome nefrótica, entre outros), que estão associados a alterações da concentração plasmática das proteínas transportadoras de hormonas da tiroide.
T₃ livre	- Corresponde à fração não ligada às proteínas plasmáticas e, portanto, fisiologicamente ativa.	O seu doseamento é útil quando existem níveis de T₃ total alterados. Não sofre influência pelos valores de concentração das proteínas plasmáticas. - ↑ [T₃ livre]: em casos de hipertireoidismo, sendo por vezes, a única hormona tiroideia elevada nestes casos. - ↓ [T₃ livre]: hipotireoidismo primário ou secundário.
T₄ total	- Corresponde à soma da fração livre e da fração conjugada da T₄.	Existem fatores secundários que podem afetar os níveis séricos de T ₄ total, tal como acontece para os níveis de T ₃ total.

Continuação da **tabela 31**

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
T₄ livre	- Corresponde à fração da T₄ que se encontra disponível para ser captada pelos diferentes tecidos e assim exercer a sua função biológica. - Não sofre influências pelos valores séricos das proteínas transportadoras, sendo útil no diagnóstico de hipotireoidismo e hipertireoidismo em conjunto com a determinação da TSH.	↓ [T₄ livre]: hipotireoidismo primário ou secundário, deficiência em iodo. ↑ [T₄ livre]: hipertireoidismo primário ou secundário, sobrecarga em iodo.
Anticorpos antitiroideos (anti-Tg e anti-TPO)	Estes anticorpos encontram-se dirigidos contra a glicoproteína Tg e a enzima TPO, presentes no tecido tireoideu. A sua determinação poderá ser prescrita para auxiliar na distinção entre uma doença autoimune da tireoide e outras formas de tireoidite.	Encontram-se níveis aumentados destes anticorpos em casos de doenças da tireoide de origem autoimune, como a Doença de Graves e a Doença de Hashimoto.

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração; T₃, triiodotironina; T₄, tiroxina; Tg, tiroglobulina; TPO, peroxidase da tireoide; TSH, hormona estimulante da tireoide.

FUNÇÃO PROSTÁTICA

PSA TOTAL E LIVRE

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida essencialmente a nível do epitélio glandular da próstata, podendo também ser encontrado a nível das glândulas para-uretrais, anais e no tecido mamário.

No homem, o PSA é responsável pela clivagem proteolítica das proteínas do sêmen, conduzindo à liquefação do fluído seminal. Encontra-se em pequena concentração na circulação sanguínea, e principalmente sob duas formas que são detetáveis pelos testes imunológicos: a forma livre e a forma complexada com a α 1-antiquimiotripsina. O PSA total corresponde à soma das duas frações.

Tabela 32. Interpretação e aplicação clínica da determinação dos níveis de antígeno específico da próstata total e livre no soro

Parâmetro	Interpretação clínica	Aplicação clínica
PSA total	Aumento da [PSA total]: - Patologia prostática, incluindo prostatite, hiperplasia benigna da próstata, trauma prostático, carcinoma prostático; - Cancro da mama; - Neoplasias das glândulas para-uretrais e anais.	- Método auxiliar na deteção de cancro prostático em conjunto com o toque retal em indivíduos com idade > 50 anos; - Teste complementar para o auxílio da monitorização do tratamento e prognóstico de doentes com carcinoma da próstata.
PSA livre	A quantidade de PSA livre no soro parece ser significativamente superior em pacientes com hiperplasia benigna da próstata do que naqueles com carcinoma prostático. Assim, a % de PSA livre determinada por comparação da [PSA livre] com a [PSA total], tem sido proposta como uma forma de diferenciar estas duas patologias. A determinação da relação PSA livre/total deve ser prescrita pelo clínico quando o resultado do PSA total se encontra entre 4 e 10 ng/mL e a palpação prostática é negativa, de forma a perceber se é necessário proceder à biópsia da próstata.	

Abreviaturas: [], concentração; PSA, antígeno específico da próstata.

HORMONAS SEXUAIS/FERTILIDADE

β – hCG TOTAL

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) corresponde a uma glicoproteína produzida inicialmente pelas células trofoblásticas sinciciais, sendo detetada no soro e urina 6 a 8 dias após a conceção. A sua função biológica consiste inicialmente na manutenção do corpo lúteo, possibilitando assim a síntese de progesterona e estrogénios necessários à manutenção do endométrio, até que a placenta assuma essa função por volta da 8ª semana de gravidez.

É também encontrada noutros tecidos, como o tecido testicular e trofoblástico, sendo que níveis elevados desta hormona em homens e em mulheres não grávidas podem ser sugestivos de neoplasia.

Tabela 33. Interpretação e aplicação clínica da determinação sérica da hormona gonadotrofina coriônica humana

Parâmetro	Aplicações clínicas
β – hCG	- Excelente marcador para a confirmação precoce e monitorização da gravidez; - Permite estimar o número de semanas de gestação conforme a concentração obtida; - Permite o diagnóstico e a monitorização terapêutica de tumores trofoblásticos e testiculares.

Abreviaturas: hCG, gonadotrofina coriônica humana.

FSH E LH

A hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteína-estimulante (LH) correspondem a glicoproteínas com funções importantes, incluindo a regulação do crescimento, maturação pubertária e a regulação da secreção de esteroides sexuais pelas gónadas de ambos os géneros.

A secreção pulsátil de FSH e LH a nível da adeno-hipófise é estimulada por uma única hormona hipotalâmica, a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). Depois de secretadas, a FSH e a LH ligam-se a recetores específicos presentes nos ovários e nos testículos, regulando a sua função gonadal.

Através de um mecanismo de *feedback* negativo, a LH e a FSH quando em elevadas concentrações, promovem a inibição da secreção de GnRH. Os esteroides sexuais, também por *feedback* negativo, regulam igualmente a produção gonadotrófica hipofisária. Assim, os níveis de FSH e LH circulantes variam durante o ciclo menstrual, em resposta aos níveis de estradiol, progesterona e testosterona, mas também tendo em conta a sua própria concentração.

Tabela 34. Características e interpretação clínica dos parâmetros determinados na avaliação da função reprodutora feminina e masculina

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
FSH	- Nos homens, a FSH regula a espermatogénese, atuando sobre as células de <i>Sertoli</i>. - Nas mulheres, a FSH estimula o desenvolvimento dos folículos ováricos, e em conjunto com a LH, promove a secreção de estrogénios pelos folículos maduros.	O doseamento de LH e FSH, em conjunto com outros parâmetros como o estradiol e a progesterona na mulher, e a testosterona no homem, é importante no estudo do funcionamento do sistema reprodutor feminino e masculino, respetivamente.

Continuação da **tabela 34**

Parâmetros	Características	Interpretação clínica
LH	- Nos homens, a LH estimula a produção de testosterona pelas células de <i>Leydig</i>, regulando em conjunto com a FSH a espermatogénese. - Nas mulheres, a LH é responsável pela indução da ovulação e a formação do corpo lúteo, que secreta progesterona e estradiol.	↑ [FSH e LH] + ↓ [esteroides sexuais]: Homens – hipogonadismo primário, como Síndrome de <i>Klinefelter</i>, insuficiência testicular. Mulheres – menopausa, hipogonadismo primário incluindo síndrome dos ovários poliquísticos e síndrome de <i>Turner</i>. ↓ [FSH e LH] + ↓ [esteroides sexuais]: Hipogonadismo secundário ou terciário. ↓ [FSH e LH] + ↑ [esteroides sexuais]: Tumores ováricos, testiculares ou a nível da glândula suprarrenal com sobreprodução de esteroides sexuais.

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração; FSH, hormona folículo-estimulante; LH, hormona luteína-estimulante.

ESTRADIOL

O estradiol é produzido essencialmente pelos folículos ováricos e corpo lúteo durante o ciclo menstrual, e também pela placenta durante o período da gravidez. Para além disso, é produzido em pequenas quantidades nos testículos e no córtex adrenal.

A sua principal função inclui a regulação da função reprodutora feminina, como o crescimento dos órgãos sexuais femininos e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários femininos, e ainda a manutenção, em conjunto com a progesterona, do estado normal de gravidez.

Os níveis de estradiol séricos são importantes na avaliação da função ovárica e na avaliação do desenvolvimento dos folículos ováricos em casos de fertilização *in vitro*. Para além disso, a determinação dos níveis de estradiol é importante para o diagnóstico de amenorreia, puberdade precoce, início da menopausa, assim como na avaliação da infertilidade feminina e masculina.

PROGESTERONA

A progesterona é produzida principalmente pelo corpo lúteo do ovário nas mulheres com menstruação regular, e em menor quantidade pelo córtex adrenal. As principais funções da progesterona incluem a preparação do útero para a implantação e manutenção da gravidez.

Em termos de diagnóstico, a sua determinação é importante para avaliar a função luteínica (detecção da ovulação), determinar o risco de aborto espontâneo e ainda para detetar

alterações a nível do ciclo menstrual. Em conjunto, a progesterona e o estradiol, permitem avaliar o ciclo menstrual da mulher, assim como permitem verificar em que fase do ciclo menstrual a mulher se encontra.

SEROLOGIA DAS INFECÇÕES VÍRICAS

VÍRUS DA HEPATITE B

O vírus da hepatite B (HBV) corresponde a um vírus com genoma constituído por DNA de cadeia dupla circular, transmitido por via perinatal, parenteral, mas principalmente por via sexual.

O período de incubação deste vírus dura cerca de 60 a 90 dias, apresentando uma percentagem de cura de cerca de 90%, evoluindo para doença crónica em apenas 2-10% dos casos de adultos infetados. A infeção crónica pelo HBV constitui o maior fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Os principais marcadores serológicos, antígenos e anticorpos, que podem ser detetados durante uma infeção pelo HBV encontram-se sumariados na tabela 35. Para além dos parâmetros mencionados também é possível fazer a deteção do DNA viral.

A infeção por este vírus pode apresentar-se como uma infeção aguda ou infeção crónica, podendo a infeção aguda evoluir ou não para uma fase crónica, dependendo principalmente da resposta imunológica do hospedeiro. Nas figuras 28 e 29, estão representados os marcadores serológicos presentes na fase aguda e na fase crónica, e a respetiva evolução da infeção.

- INFECÇÃO AGUDA

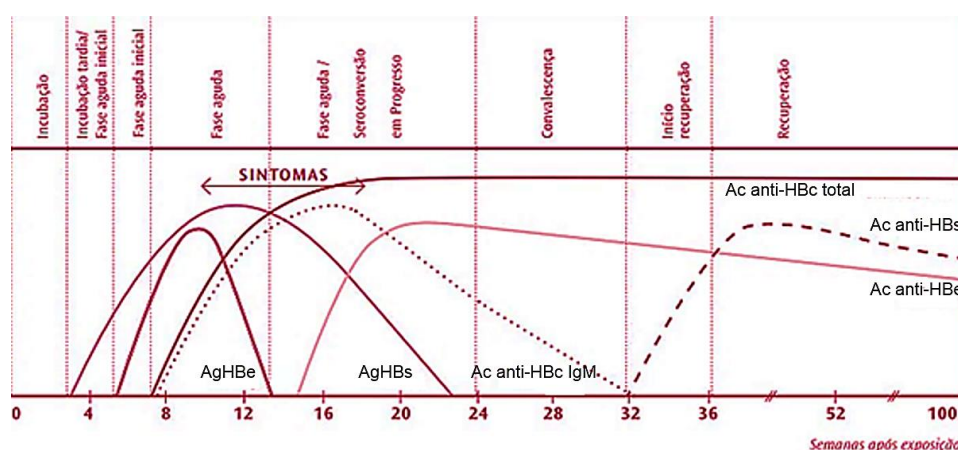


Figura 28. Evolução dos diferentes marcadores serológicos durante a fase aguda da infeção pelo vírus da hepatite B com sinais de recuperação. **Abreviaturas:** Ac anti-HBc, anticorpos anti-antígeno do core do vírus da hepatite B; Ac anti-HBe, anticorpos anti-antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B; Ac anti-HBs, anticorpos anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B; AgHBe, antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B; AgHBs, antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Disponível em <http://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/hepatites/>).

- INFECÇÃO CRÓNICA

Numa infeção crónica ativa os antígenos de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) persistem na circulação por mais de 6 meses, em simultâneo com a presença de sinais de replicação do vírus. Os Ac anti-antígeno do core do vírus da hepatite B (Ac anti-HBc) do tipo IgG persistem durante toda a vida após uma infeção por este vírus.

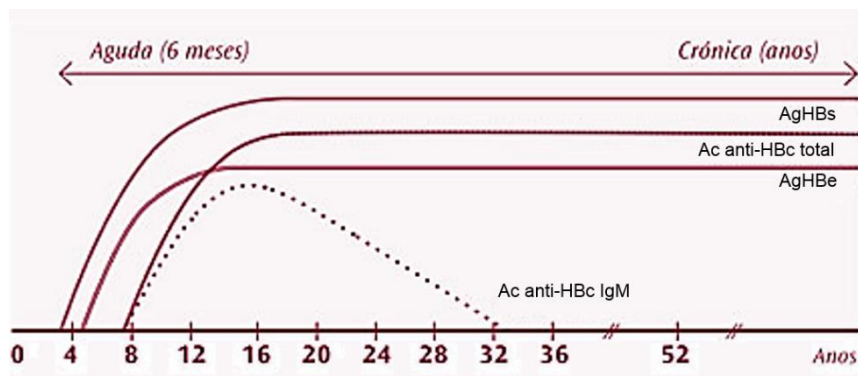


Figura 29. Evolução dos diferentes marcadores serológicos na progressão da infeção crónica pelo vírus da hepatite B. **Abreviaturas:** Ac anti-HBc, anticorpos anti-antígeno do core do vírus da hepatite B; AgHBe, antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B; AgHBs, antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Disponível em <http://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/hepatites/>).

Tabela 35. Marcadores serológicos utilizados no diagnóstico da infeção pelo vírus da hepatite B

Parâmetros	Características
AgHBs	- Antígeno de superfície presente no invólucro viral. - É o 1º marcador serológico a surgir, mesmo antes do aparecimento dos sintomas. - A sua presença indica sempre a existência de infeção pelo HBV. - A sua prevalência no soro por mais de 6 meses indica que o indivíduo é portador crónico do HBV, já o seu desaparecimento indica a eliminação completa do vírus. - A sua determinação é utilizada para identificar pessoas infetadas e na monitorização do estado dos indivíduos infetados em combinação com outros marcadores serológicos da hepatite B.
AgHBe	- Antígeno produzido na fase de replicação do vírus, sendo por isso sinónimo de contagiosidade e replicação viral intensa. - O seu desaparecimento e o aparecimento de Ac anti-HBe pode indicar o fim da replicação viral e o início da resolução da infeção. - A sua permanência após o surgimento dos sintomas pode ser indicativa de evolução para cronicidade.
Ac anti-HBe	- A sua presença encontra-se associada ao declínio da infecciosidade e geralmente indica recuperação da infeção aguda.

Continuação da **tabela 35**

Parâmetros	Características
Ac anti-HBc	- Os AgHBc são altamente imunogénicos, correspondendo o aparecimento de Ac IgM anti-HBc ao 1º sinal imunológico de infeção aguda por este vírus. - Os Ac do tipo IgG podem permanecer durante anos na circulação, mesmo após a resolução da infeção. - Estes anticorpos podem estar presentes numa infeção aguda, crónica ou antiga, não permitindo a determinação isolada do título de Ac anti-HBc total realizar a distinção entre infeção aguda e crónica.
Ac anti-HBs	- Marcador de cura e imunidade, por serem responsáveis pela neutralização do vírus e prevenção da infeção. - A sua presença em indivíduos assintomáticos sem vacinação, pode indicar uma exposição anterior ao vírus que foi resolvida. - A sua determinação é utilizada na monitorização do sucesso da vacinação e na monitorização da recuperação de indivíduos infetados com o HBV.

Abreviaturas: Ac, anticorpos; Ac anti-HBc, anticorpos anti-antígeno do core do vírus da hepatite B; Ac anti-HBe, anticorpos anti-antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B; Ac anti-HBs, anticorpos anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B; AgHBc, antígeno do core do vírus da hepatite B; AgHBe, antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B; AgHBs, antígeno de superfície do vírus da hepatite B; HBV, vírus da hepatite B.

VÍRUS DA HEPATITE C

O vírus da hepatite C (HCV) corresponde a um vírus de RNA de cadeia simples linear, transmitido por via perinatal e sexual, mas essencialmente por via parenteral.

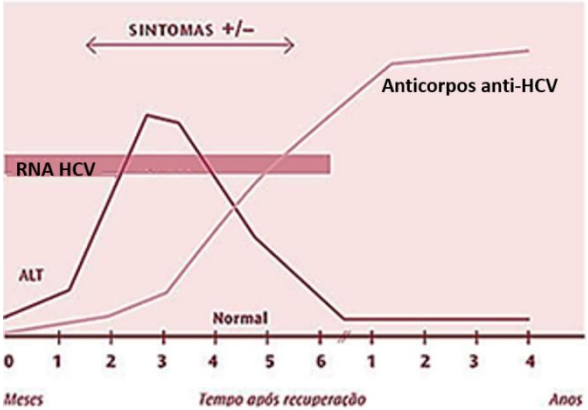
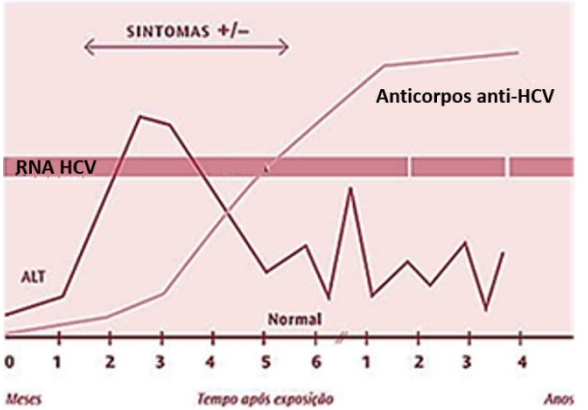
O período de incubação são geralmente 6 a 7 semanas, sendo a percentagem de cura muito menor em relação à hepatite B (apenas de 15%). Assim, 85% dos casos evoluem de forma lenta e progressiva para hepatite crónica.

No LPCMA é efetuada a determinação dos Ac anti-HCV em apenas um ensaio, permitindo detetar simultaneamente os Ac contra as proteínas estruturais (core – c22) e as proteases (c33 e c100), não realizando a sua distinção. Existem ainda outros testes utilizados no diagnóstico laboratorial desta infeção, incluindo a deteção de RNA do HCV (carga viral). Para além disso, os níveis de ALT são também importantes na avaliação da infeção pelo HCV, representando a extensão do dano hepático.

Se o paciente não possuir histórico de infeção pelo HCV e em caso de positividade, é política do LPCMA repetir a determinação utilizando outro método, neste caso um teste rápido imunocromatográfico, aconselhando-se ainda a confirmação pela técnica de *immunoblotting*.

Na tabela 36 encontra-se a evolução dos principais perfis serológicos de uma infecção pelo HCV.

Tabela 36. Principais perfis serológicos de uma infecção pelo vírus da hepatite C

Infeção pelo HCV	Perfil serológico característico
Infeção aguda pelo HCV com recuperação - Normalização dos níveis de ALT passado alguns meses. - Desaparecimento da presença de RNA viral. - Os títulos de Ac anti-HCV continuam presentes. É difícil o diagnóstico da fase aguda, devido à falta de um marcador específico desta fase. No entanto, a pesquisa do RNA do HCV é o melhor teste para o diagnóstico da hepatite C aguda, particularmente se seguido pela seroconversão dos Ac anti-HCV.	COM RECUPERAÇÃO  (Disponível em http://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/hepatites/).
Infeção pelo HCV com evolução para cronicidade - Manutenção dos níveis de RNA do HCV ao longo do tempo, e presença de anticorpos anti-HCV. - Presença de níveis de ALT intermitentes ao longo dos anos.	COM PROGRESSÃO PARA INFECÇÃO CRÔNICA  (Disponível em http://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/hepatites/).

Abreviaturas: Ac, anticorpos; ALT, alanina aminotransferase; HCV, vírus da hepatite C.

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um vírus de genoma RNA pertencente à família dos retrovírus, correspondendo ao agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).

A transmissão deste vírus é feita essencialmente através da via sexual, mas também pode ocorrer por contacto com sangue contaminado e por transmissão vertical.

Atualmente, este vírus é classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2, que são semelhantes na sua estrutura morfológica, tropismo celular e vias de transmissão. No entanto, o HIV-1 possui uma maior variabilidade genética, maior patogenicidade e é considerado pandémico.

O genoma do HIV inclui três genes principais, designados de *Env*, *Pol* e *Gag*, que codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais (figura 30).

Genes do HIV	Produtos do HIV	Peso Molecular das Proteínas e Glicoproteínas Virais	
		HIV-1	HIV-2
Env	Precursor	gp160	gp140
	Glicoproteína externa	gp120	gp105/125
	Glicoproteína transmembranar	gp41	gp36
Pol	Transcriptase Reversa	p66	p68
	Transcriptase Reversa	p51	p53
	Integrase	p31	p31/34
Gag	Precursor	p55	p56
	Cerne	p24	p26
	Matriz	p17	p16

Figura 30. Principais componentes estruturais e não estruturais do vírus da imunodeficiência humana. Rodeadas a vermelho encontram-se as principais proteínas utilizadas no diagnóstico laboratorial desta patologia. **Abreviaturas:** HIV, vírus da imunodeficiência humana (Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV. Ministério da Saúde, Departamento da DST, SIDA e Hepatites Víricas; dezembro, 2013).

- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Após exposição ao HIV, quase todos os indivíduos passam por uma fase de latência clínica, antes de manifestar a severa imunodepressão que caracteriza a SIDA.

Os Ac anti-HIV são quase sempre detetados em doentes com SIDA e em indivíduos assintomáticos infetados com o vírus. No entanto, se a exposição ao vírus for relativamente recente, o nível de Ac pode ser demasiado baixo para ser detetado.

De forma a ultrapassar este problema, surgiram os testes de rastreio de 4ª geração, que permitem a determinação simultânea do antígeno p24 (tipicamente elevado na fase inicial da infeção) e dos Ac anti-HIV1/2, aumentando deste modo a probabilidade de detetar a infeção, diminuindo dessa forma o intervalo de tempo entre a contaminação e o diagnóstico.

No LPCMA para a detecção sérica do HIV-1/2 utiliza-se um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência combinado, que permite a detecção simultânea do antígeno p24 e dos Ac anti-proteínas transmembranares do HIV-1 (gp41) e HIV-2 (gp36) presentes no soro do paciente. Se o paciente não possuir histórico de infecção pelo HIV e em caso de positividade, é política do laboratório pedir nova colheita de sangue para efetuar de novo a determinação. Se continuar positivo, confirma-se o resultado recorrendo a um teste imunocromatográfico rápido.

Para além disso, no boletim analítico aconselha-se a realização de métodos complementares de confirmação com maior especificidade para o HIV, incluindo a técnica de *immunoblotting*, que permite a detecção de Ac específicos contra cada uma das proteínas do HIV, e testes de detecção direta do RNA viral.

É aconselhável realizar a distinção de uma infecção por HIV-1 e HIV-2, na medida em que a progressão da carga viral e as escolhas terapêuticas podem ser distintas.

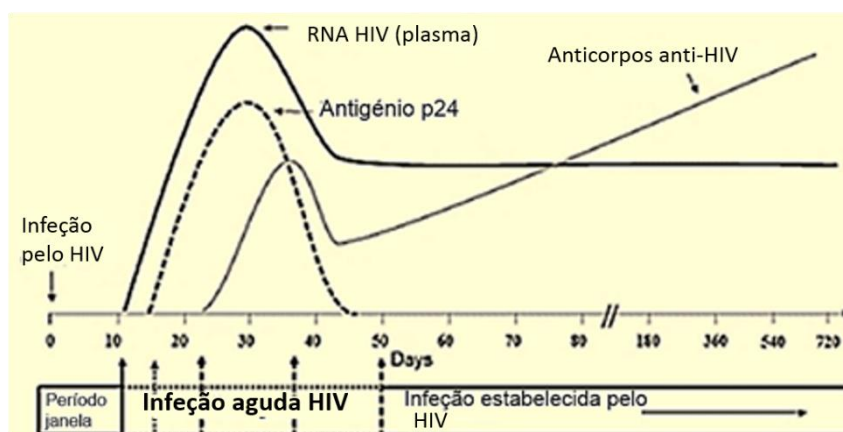


Figura 31. Cinética dos marcadores utilizados na detecção da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana.
Abreviaturas: HIV, vírus da imunodeficiência humana.

6.2. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

O soro humano contém inúmeras proteínas identificáveis, incluindo diversas enzimas, proteínas transportadoras, inibidores enzimáticos, anticorpos e proteínas com outras funções. A determinação dos níveis séricos das diferentes proteínas possui um significado clínico muito importante, na medida em que auxilia o diagnóstico de gamopatias, disproteinemias e de processos inflamatórios/infecciosos, sendo ainda útil na monitorização de pacientes com doenças crônicas.

Assim, a eletroforese de proteínas é uma técnica de rotina laboratorial bastante utilizada para a investigação de anormalidades qualitativas e/ou quantitativas a nível das proteínas existentes no soro. No entanto, em conjunto com o proteinograma, o clínico deve ter em

atenção outros parâmetros laboratoriais relevantes, tendo em conta que um perfil electroforético nem sempre é específico de uma determinada patologia.

6.2.1. HYDRASYS®

No LPCMA a eletroforese de proteínas séricas é realizada pelo equipamento semiautomático *HYDRASYS*® (figura 32), que utiliza o princípio de separação eletroforética em zona.

A separação das proteínas é realizada em soro para evitar as interferências da banda do fibrinogénio presente no plasma.



Figura 32. Equipamento *HYDRASYS*® utilizado na realização da eletroforese de proteínas séricas.

PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A eletroforese de proteínas séricas em gel é uma técnica laboratorial que permite a separação das diferentes proteínas em frações, tendo em conta a migração diferencial das proteínas carregadas eletricamente, após exposição a um campo elétrico.

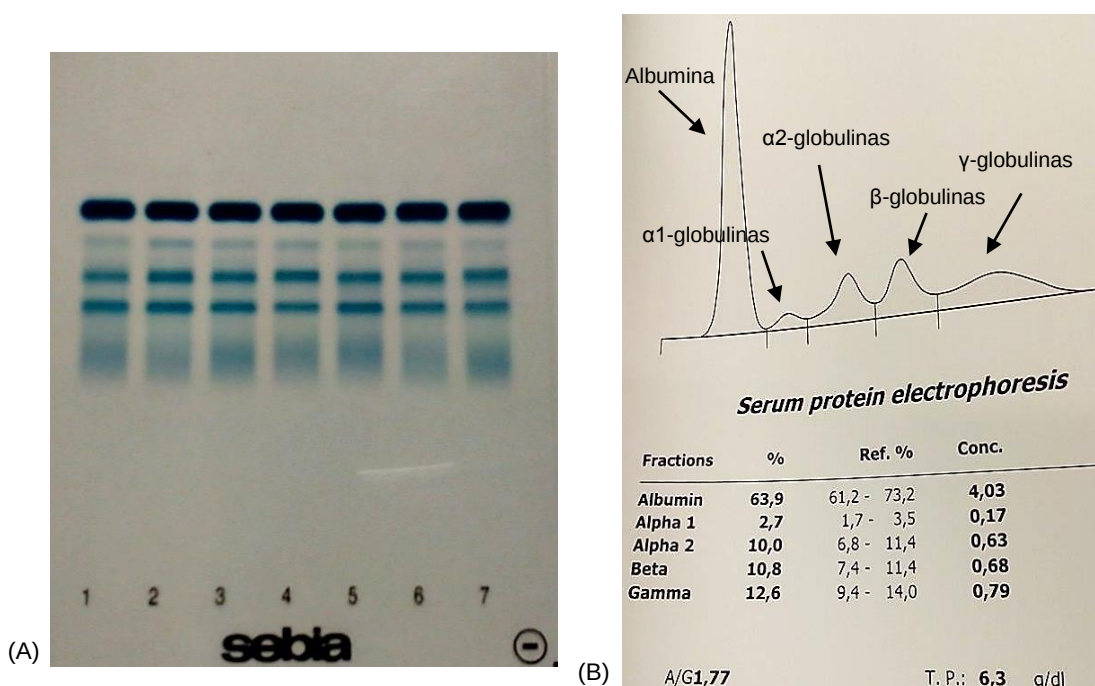
Neste equipamento utilizamos o gel de agarose *HYDRAGEL PROTEIN (E) 7* que permite a análise simultânea de 7 amostras. Utiliza-se também uma solução tampão para manter o pH do meio alcalino, para que todas as proteínas fiquem com carga global negativa.

No final, após migração das amostras, coloração e secagem do gel, este é processado e digitalizado no *scanner*, sendo a quantificação de cada fração proteica obtida por densitometria que fornece os valores relativos em % e os valores absolutos em g/dL, tendo em conta o valor de PT fornecido pelo utilizador (figura 33).

A mobilidade eletroforética das proteínas vai ser diretamente proporcional à sua carga elétrica e inversamente proporcional ao seu peso molecular, originando o aparecimento de 5 frações proteicas por ordem de mobilidade decrescente: albumina, α 1-globulina, α 2-globulina, β -globulina e γ -globulinas. Cada fração proteica é constituída por um ou mais constituintes do soro, tal como se pode observar na tabela 37.

Tabela 37. Composição das diferentes frações proteicas visualizadas na eletroforese de proteínas séricas em gel

Frações proteicas	Componentes proteicos
Albumina	Albumina
α1-globulina	α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida, α 1-fetoproteína
α2-globulina	Haptoglobina, α 2-macroglobulina, ceruloplasmina
β-globulina	Transferrina, complemento C3, β -lipoproteína
γ-globulina	Imunoglobulinas A, D, E, G e M

**Figura 33.** (A) Proteinograma em gel de agarose obtido pelo equipamento HYDRASYS® com o kit HYDRAGEL PROTEIN (E) 7 (B) Representação de um perfil electroforético normal e as respectivas frações proteicas.

6.2.2. PROTEÍNAS SÉRICAS

Na tabela 38 encontram-se sumariadas as principais funções e características das proteínas séricas que constituem as diferentes frações do proteinograma e as principais situações clínicas associadas a alterações na sua quantidade.

Tabela 38. Características das diferentes frações separadas por eletroforese em gel e as diferentes situações clínicas que podem estar associadas a alterações na sua concentração

Frações	Funções e características	Considerações clínicas
Albumina	- Proteína de fase aguda negativa, sintetizada no fígado. - Corresponde a 60% das PT. A sua principal função é a manutenção da pressão osmótica coloidal.	↓ Fração albumina (hipoalbuminemia – condição inespecífica): - Redução na síntese de albumina; - Aumento do catabolismo proteico; - Perdas proteicas a nível renal ou intestinal. ↑ Fração albumina (hiperalbuminemia): - Desidratação aguda severa.
α1-globulinas	Fração constituída por proteínas de fase aguda positivas de síntese hepática: - α1-antitripsina: corresponde a cerca de 90% do pico normal das α1-globulinas, e é a proteína mais importante entre os inibidores das serino-proteases. - α1-glicoproteína ácida - α1-fetoproteína	- ↓ quase completa da fração α1-globulinas: associada a uma deficiência hereditária de α1-antitripsina, que está relacionada a graves lesões pulmonares devido à ação das enzimas proteolíticas. - ↑ Fração α1-globulinas: Processo inflamatório agudo, com aumento das proteínas desta fração.
α2-globulinas	Fração constituída por proteínas de fase aguda positivas sintetizadas no fígado: - Haptoglobina: forma complexos proteicos com a Hb plasmática livre, impedindo a perda de Hb e de ferro; marcador de hemólise. - Ceruloplasmina: transporta cerca de 90% do cobre sérico. - α2-macroglobulina: proteína inibidora de proteases.	- ↓ [Haptoglobina]: síndromes hemolíticas. - ↓ [Ceruloplasmina]: útil para o diagnóstico da Doença de Wilson. - ↑ [α2-macroglobulina]: síndrome nefrótico. - ↓ Fração α2-globulinas: hepatopatias crónicas em fase avançada. - ↑ Fração α2-globulinas: Processo inflamatório agudo.
β1-globulinas	Fração constituída por um grupo de proteínas de síntese hepática, entre as quais se encontram: - Transferrina: principal proteína plasmática responsável pelo transporte de ferro para os locais de produção dos GV. - Complemento C3: proteína de fase aguda tardia que atua como mediador em diversas reações do sistema imunitário. - β-lipoproteínas (LDL).	- ↑ [Transferrina]: anemia ferropénica. - ↑ [C3]: fase avançada dos processos inflamatórios/infeciosos. - ↑ [LDL]: situações que sucedem com um excesso de colesterol sérico, como na aterosclerose. - ↓ Fração β1-globulinas: como são de síntese hepática, a sua diminuição geralmente reflete doença hepática.

Continuação da **tabela 38**

Frações	Funções e características	Considerações clínicas
γ-globulinas	Esta fração é constituída pelas diferentes imunoglobulinas. A IgG é a principal imunoglobulina presente na região γ .	↑ Difuso da fração γ: resposta imunológica simultânea de diversos clones plasmocitários com a produção heterogênea de anticorpos: quadros infecciosos, inflamatórios crônicos, doenças autoimunes e neoplasias – PICO POLICLONAL. ↑ Homogêneo da fração γ: produção de um tipo específico de Ig por um único clone plasmocitário – PICO MONOCLONAL. O mieloma múltiplo encontra-se entre os casos mais frequentes e mais graves de gamopatia monoclonal. ↓ fração γ-globulinas: diminuição global das γ-globulinas – sistema imunológico debilitado: imunodeficiência humoral, desordens linfoproliferativas de células B, entre outras.

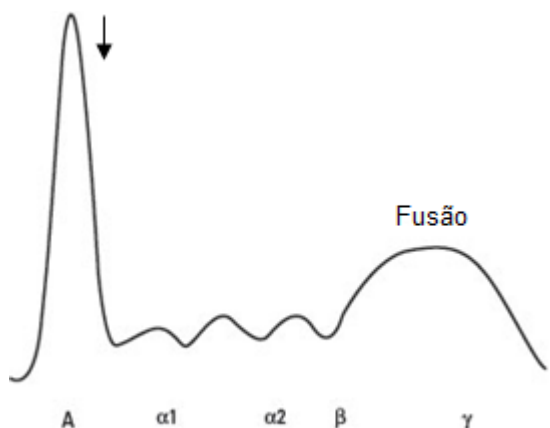
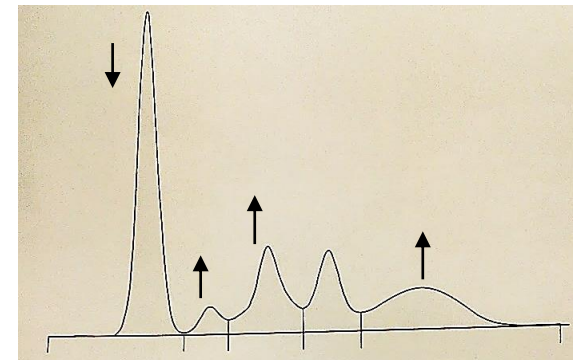
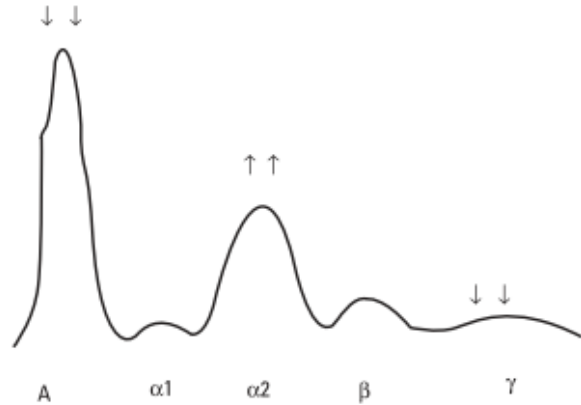
Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; [], concentração; GV, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina; Ig, imunoglobulina; LDL, lipoproteína de baixa densidade; PT, proteínas totais.

6.2.3. ALTERAÇÕES NO PROTEINOGRAMA

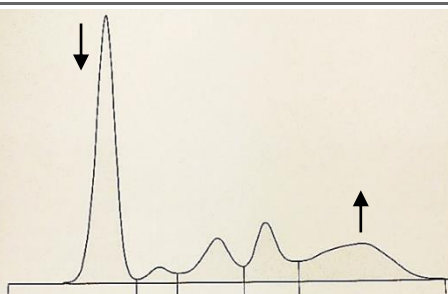
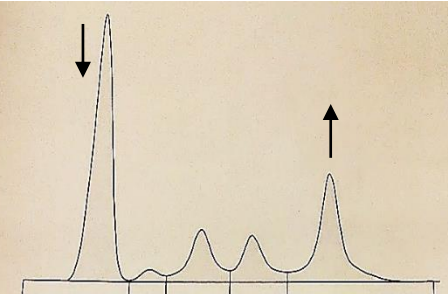
A realização da eletroforese de proteínas séricas tem utilidade em diversas situações clínicas. É de grande importância conhecer e interpretar corretamente o proteinograma, de forma a facilitar o diagnóstico de determinadas patologias que possuem padrões eletroforéticos característicos (tabela 39).

Durante a realização do estágio, consegui observar várias alterações nos perfis eletroforéticos obtidos. Sempre que surgiu um padrão electroforético anormal, num paciente sem histórico, foi realizada a repetição da eletroforese em gel, para confirmação dos resultados.

Tabela 39. Padrões eletroforéticos característicos de algumas patologias

Patologias	Perfil eletroforético																								
CIRROSE HEPÁTICA Presença da fusão das frações β-globulina e γ-globulina, com diminuição da fração da albumina. - $\uparrow$ fração γ, por aumento da produção de Ig em resposta à presença de Ag que não são retirados da circulação pelo fígado lesado; - $\downarrow$ fração da albumina e da fração β, devido à síntese proteica hepática deficiente.																									
PROCESSO INFLAMATÓRIO - $\uparrow$ das frações α1-globulina e α2-globulina, constituídas principalmente proteínas de fase aguda positivas. - $\downarrow$ da fração albumina, por esta ser uma proteína de fase aguda negativa. Quando estas alterações estiverem associadas ao aumento das γ-globulinas estamos perante uma fase de cronicidade, típica de infeções crónicas, neoplasias e alergias.	 Serum protein electrophoresis <table><thead><tr><th>Fractions</th><th>%</th><th>Ref. %</th><th>Ref. Conc.</th></tr></thead><tbody><tr><td>Albumin</td><td>50,1</td><td>< 59,8 - 72,4</td><td>4,30 - 5,10</td></tr><tr><td>Alpha 1</td><td>3,8</td><td>> 1,0 - 3,2</td><td>0,10 - 0,20</td></tr><tr><td>Alpha 2</td><td>16,2</td><td>> 7,4 - 12,6</td><td>0,50 - 0,80</td></tr><tr><td>Beta</td><td>12,6</td><td>7,5 - 12,9</td><td>0,60 - 0,90</td></tr><tr><td>Gamma</td><td>17,3</td><td>> 8,0 - 15,8</td><td>0,60 - 1,10</td></tr></tbody></table>	Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.	Albumin	50,1	< 59,8 - 72,4	4,30 - 5,10	Alpha 1	3,8	> 1,0 - 3,2	0,10 - 0,20	Alpha 2	16,2	> 7,4 - 12,6	0,50 - 0,80	Beta	12,6	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90	Gamma	17,3	> 8,0 - 15,8	0,60 - 1,10
Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.																						
Albumin	50,1	< 59,8 - 72,4	4,30 - 5,10																						
Alpha 1	3,8	> 1,0 - 3,2	0,10 - 0,20																						
Alpha 2	16,2	> 7,4 - 12,6	0,50 - 0,80																						
Beta	12,6	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90																						
Gamma	17,3	> 8,0 - 15,8	0,60 - 1,10																						
SÍNDROME NEFRÓTICO - Caracterizado pelo aumento da permeabilidade renal que conduz à perda crónica de proteínas de baixo peso molecular, como a albumina - $\downarrow$ pico da albumina. - Retenção de proteínas de alto peso molecular (α2-macroglobulina) - $\uparrow$ pico das α2-globulinas. - Perda total de seletividade, com perda de Ig na urina - $\downarrow$ pico das γ-globulinas.																									

Continuação da **tabela 39**

Patologias	Perfil eletroforético																								
HIPERGAMAGLOBULINEMIA (PICO POLICLONAL) - Presença de um pico largo e difuso aumentado na região da γ-globulina, associado geralmente a uma diminuição da fração da albumina. Geralmente ocorre como efeito secundário de uma doença crônica.	 Serum protein electrophoresis <table><tr><th>Fractions</th><th>%</th><th>Ref. %</th><th>Ref. Conc.</th></tr><tr><td>Albumin</td><td>52,7 <</td><td>59,8 - 72,4</td><td>4,30 - 5,10</td></tr><tr><td>Alpha 1</td><td>2,9</td><td>1,0 - 3,2</td><td>0,10 - 0,20</td></tr><tr><td>Alpha 2</td><td>11,0</td><td>7,4 - 12,6</td><td>0,50 - 0,80</td></tr><tr><td>Beta</td><td>12,6</td><td>7,5 - 12,9</td><td>0,60 - 0,90</td></tr><tr><td>Gamma</td><td>20,8 ></td><td>8,0 - 15,8</td><td>0,60 - 1,10</td></tr></table>	Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.	Albumin	52,7 <	59,8 - 72,4	4,30 - 5,10	Alpha 1	2,9	1,0 - 3,2	0,10 - 0,20	Alpha 2	11,0	7,4 - 12,6	0,50 - 0,80	Beta	12,6	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90	Gamma	20,8 >	8,0 - 15,8	0,60 - 1,10
Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.																						
Albumin	52,7 <	59,8 - 72,4	4,30 - 5,10																						
Alpha 1	2,9	1,0 - 3,2	0,10 - 0,20																						
Alpha 2	11,0	7,4 - 12,6	0,50 - 0,80																						
Beta	12,6	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90																						
Gamma	20,8 >	8,0 - 15,8	0,60 - 1,10																						
PICO MONOCLONAL - Pico estreito na região das β ou γ-globulinas, pelo aumento acentuado numa das classes de Ig. A elevação da IgG é a mais comum. Para a determinação do tipo de paraproteïnemia, benigna ou maligna, deve recorrer-se a uma imunoeletroforese ou imunofixação de proteínas.	 Serum protein electrophoresis <table><tr><th>Fractions</th><th>%</th><th>Ref. %</th><th>Ref. Conc.</th></tr><tr><td>Albumin</td><td>56,1 <</td><td>59,8 - 72,4</td><td>4,30 - 5,10</td></tr><tr><td>Alpha 1</td><td>2,0</td><td>1,0 - 3,2</td><td>0,10 - 0,20</td></tr><tr><td>Alpha 2</td><td>10,8</td><td>7,4 - 12,6</td><td>0,50 - 0,80</td></tr><tr><td>Beta</td><td>9,4</td><td>7,5 - 12,9</td><td>0,60 - 0,90</td></tr><tr><td>Gamma</td><td>21,7 ></td><td>8,0 - 15,8</td><td>0,60 - 1,10</td></tr></table>	Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.	Albumin	56,1 <	59,8 - 72,4	4,30 - 5,10	Alpha 1	2,0	1,0 - 3,2	0,10 - 0,20	Alpha 2	10,8	7,4 - 12,6	0,50 - 0,80	Beta	9,4	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90	Gamma	21,7 >	8,0 - 15,8	0,60 - 1,10
Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.																						
Albumin	56,1 <	59,8 - 72,4	4,30 - 5,10																						
Alpha 1	2,0	1,0 - 3,2	0,10 - 0,20																						
Alpha 2	10,8	7,4 - 12,6	0,50 - 0,80																						
Beta	9,4	7,5 - 12,9	0,60 - 0,90																						
Gamma	21,7 >	8,0 - 15,8	0,60 - 1,10																						

Abreviaturas: ↑, aumento; ↓, diminuição; Ag, antígenos; Ig, imunoglobulinas.

6.3. BIOMARCADORES DE NECROSE DO MIOCÁRDIO

A doença cardiovascular mais comum é o enfarte agudo do miocárdio (EAM), correspondendo a uma das principais causas de morte no mundo.

Atualmente, segundo o comitê conjunto *European Society of Cardiology/American College of Cardiology*, o diagnóstico de EAM é realizado quando existe uma alteração dos níveis séricos dos principais marcadores cardíacos, em conjunto com sintomas clínicos sugestivos de isquemia miocárdica e/ou alterações no eletrocardiograma. Os principais sintomas de isquemia cardíaca incluem a angina de peito, palpitações cardíacas e falta de ar.

Os marcadores cardíacos utilizados atualmente incluem a mioglobina, isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) e a isoforma cardiospecífica da troponina I (cTnI), correspondendo esta última ao marcador preferencial para o diagnóstico de EAM, já que é exclusiva do músculo cardíaco. Alguns dos marcadores são também utilizados na monitorização da resposta à terapêutica instituída após um EAM.

Durante a realização do estágio tive a oportunidade de determinar os marcadores cardíacos efetuados no LPCMA pelo equipamento *Mini VIDAS®*: mioglobina e cTnI (tabela 40). No entanto, como se trata de um Laboratório de Análises Clínicas, e não de um meio hospitalar, o número de amostras para este tipo de determinação é relativamente pequeno.

Tabela 40. Descrição e aplicação clínica dos marcadores cardíacos determinados no laboratório

Parâmetro	Descrição	Aplicação clínica
Mioglobina sérica	Marcador precoce de necrose miocárdica, sendo o 1º marcador a surgir na circulação sanguínea após 1 a 3 horas do aparecimento dos sintomas de isquemia miocárdica. Possui alta sensibilidade, mas baixa especificidade; encontrada também no músculo-esquelético.	Útil para o diagnóstico precoce do EAM, apresentando um pico de concentração sérica à 6ª hora após o aparecimento dos sintomas.
cTnI sérica	Corresponde a uma isoforma cardíaca da troponina I, permitindo evidenciar uma lesão do miocárdio de forma altamente específica.	Biomarcador de eleição para a deteção de lesão do miocárdio. Útil para a estratificação do risco de ocorrência de enfarte do miocárdio e para a seleção terapêutica.

Abreviaturas: cTnI, isoforma cardiospecífica da troponina I; EAM, enfarte agudo do miocárdio.

6.3.1. MINI VIDAS®



Figura 34. Equipamento *Mini VIDAS®* utilizado na determinação dos biomarcadores cardíacos.

O equipamento *Mini VIDAS*[®] (figura 34) é um aparelho automatizado multi-paramétrico, que possui duas secções independentes, cada uma com capacidade de 6 testes. Este equipamento associa o método imunoenzimático em sandwich numa etapa, com a deteção final em fluorescência (ELFA - *Enzyme linked fluorescent assay*).

O cone de utilização (SPR[®]), que serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem, encontra-se sensibilizado com imunoglobulinas específicas para o analito que se pretende dosear. Após diluição, a amostra do paciente é aspirada para o cone, onde se forma então o conjugado anticorpo-antigénio. De seguida, a amostra é transferida para o poço que contém IgG específicas marcadas com a fosfatase alcalina, que se liga ao complexo formado anteriormente, originando uma “sandwich” com o analito a determinar no meio. As etapas de lavagem que se realizam entre as várias fases eliminam os componentes não fixados.

Na etapa final de revelação, ocorre a hidrólise do substrato pela FA, com obtenção de um produto cuja fluorescência emitida é medida a um λ específico (figura 35).

O valor do sinal da fluorescência obtido, é proporcional à concentração de analito presente na amostra.

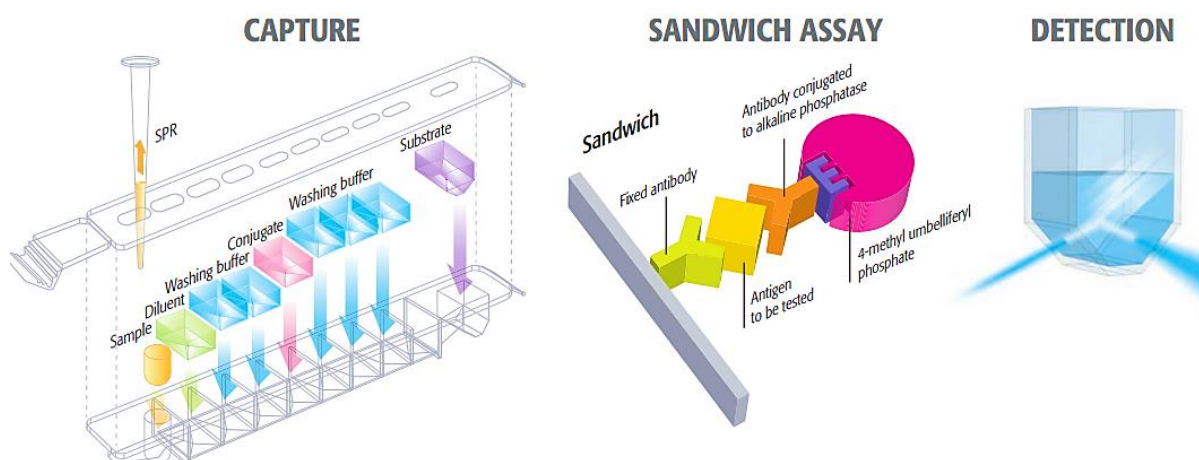


Figura 35. Representação esquemática da técnica *Enzyme linked fluorescent assay*, utilizada pelo equipamento *Mini VIDAS*[®] (Disponível em www.biomerieux-usa.com).

6.4. TÉCNICAS MANUAIS

As técnicas manuais de rastreio para a pesquisa de Ac contra bactérias patogénicas baseiam-se em reações de aglutinação. A incubação dos Ag bacterianos fixados a partículas de látex com o soro do paciente, conduz à presença de aglutinação se o paciente desenvolveu uma resposta imune contra o respetivo agente etiológico.

Sempre que ocorre a presença de um resultado positivo neste tipo de teste é efetuada uma avaliação semi-quantitativa; para isso utiliza-se a amostra de soro do paciente, efetuando-

se diluições sucessivas, sendo que o título aproximado de Ac no soro vai corresponder à última diluição mais alta que ainda apresente uma aglutinação visível.

Durante o estágio tive a oportunidade de realizar vários testes deste género, existindo maioritariamente pedidos de execução de RPR (*Rapid Plasmin Reagin*) e TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*).

6.4.1. TESTES MANUAIS PARA A DETEÇÃO DE SÍFILIS

A sífilis é uma infeção venérea crónica, causada por uma espiroqueta - o *Treponema pallidum*. Durante uma infeção por esta espiroqueta são produzidos dois tipos de anticorpos detetáveis no soro: anticorpos não treponémicos e anticorpos treponémicos específicos.

PROVA NÃO TREPONÉMICA PARA A DETEÇÃO SEROLÓGICA DE SÍFILIS

O teste RPR é um teste de floculação “não treponémico”, na medida em que deteta os Ac que não são específicos do *Treponema pallidum*. No entanto, a presença destes Ac no soro do doente está fortemente associada à infeção por esta espiroqueta.

Neste teste, detetam-se então os anticorpos anti-antígenos lipídicos não treponémicos (reaginas plasmáticas), produzidos em resposta ao material lipídico libertado das células hospedeiras danificadas, assim como ao material lipoproteína-idêntico libertado das espiroquetas.

A presença ou ausência de aglutinação macroscópica é examinada após agitação dos *cards* durante 8 minutos a 100 rpm (figura 36).

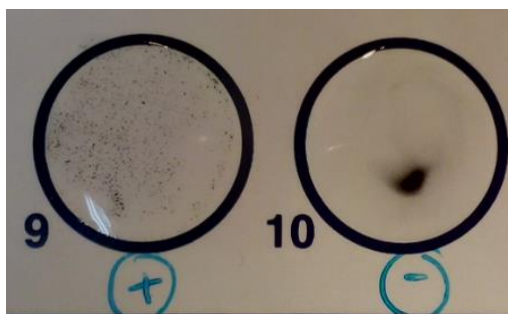


Figura 36. Resultado obtido no controlo positivo, com visualização de agregados (à esquerda) e no controlo negativo (à direita).

É recomendada a realização do teste de confirmação específico para *Treponema pallidum* (TPHA), sempre que o teste RPR seja positivo, de forma a descartar falsos positivos, que podem surgir em situações como gravidez, algumas doenças autoimunes e em indivíduos toxicodependentes.

TREPONEMA PALLIDUM HAEMAGGLUTINATION

Para a confirmação da presença de anticorpos treponémicos específicos, utiliza-se então o teste TPHA, que corresponde a um teste qualitativo/de *screening*.

PRINCÍPIO DO TESTE

O kit deste teste contém um diluente de amostra, uma suspensão de GV de ave ligados a componentes antigénicos do *Treponema pallidum* (células teste) e uma suspensão de GV de ave não sensibilizados com estes antigénios (células controlo). Contém ainda um controlo negativo (soro sem Ac anti-*Treponema pallidum*) e um controlo positivo (soro com Ac anti-*Treponema pallidum*). O resultado do teste é obtido em 60 minutos e o padrão de aglutinação das células é facilmente lido e interpretado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- **Resultado positivo:** as células teste aglutinam na presença de Ac específicos no soro do paciente, produzidos na presença de *Treponema pallidum*, resultando na presença de um “tapete” de células na parte inferior do poço.
- **Resultado negativo:** um resultado negativo é indicado por um botão compacto de células.

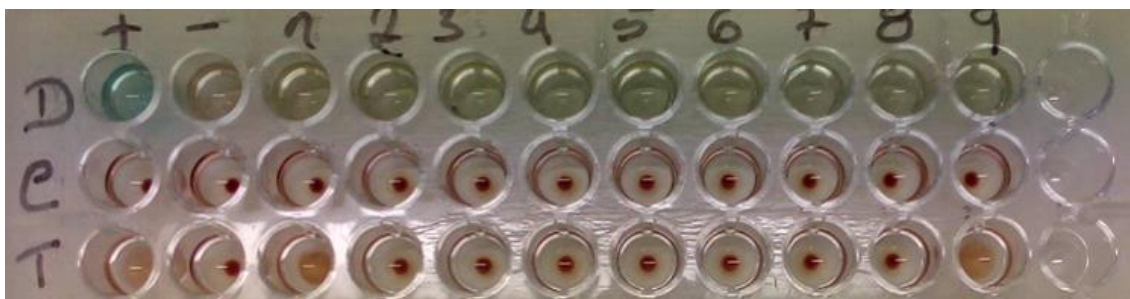


Figura 37. Exemplo de uma placa com várias amostras para a deteção de sífilis pela técnica *Treponema pallidum* haemagglutination.

Na linha horizontal “D” (poços em que se efetua a diluição inicial) encontram-se os controlos positivo e negativo (poço + e -, respetivamente) e as várias amostras diluídas (de 1 a 9). Na linha horizontal “C” encontram-se os eritrócitos não sensibilizados (células controlo) em conjunto com as diferentes amostras, e na linha “T” temos as células sensibilizadas (células teste) em conjunto com as diferentes amostras. Podemos observar um resultado positivo na amostra 1 e 9.

6.4.2. OUTROS TESTES MANUAIS

Os testes manuais descritos na tabela 41 são menos frequentemente requisitados pelos clínicos.

Tabela 41. Descrição e fundamento de outros testes serológicos manuais

Reação de Paul-Bunnell	
Descrição	Princípio do teste
Teste utilizado na detecção da infecção pelo EBV; agente etiológico da mononucleose infecciosa.	Na presença de partículas de látex revestidas com glicoproteínas provenientes da membrana celular de GV purificados de bovino (comuns a antígenos do EBV), este teste permite a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgM heterofílicos associados à mononucleose infecciosa.
Antígenos febris	
Descrição	Princípio do teste
Teste utilizado na detecção de Ac contra os antígenos febris. Estes representam algumas bactérias patogênicas para a espécie humana que são responsáveis pelo aparecimento de determinadas infecções que decorrem com um quadro febril, como a brucelose, salmonelose e rickettsiose.	Este kit contém soluções com antígenos bacterianos específicos, permitindo a realização de 3 testes diferentes: - Wright: para a pesquisa de Ac contra <i>Brucella abortus</i> e <i>Brucella melitensis</i>; - Widal: para a pesquisa de Ac contra <i>Salmonella paratyphi</i> AH, AO, BH, BO e <i>Salmonella typhi</i> H e O; - Weil-Félix: para a pesquisa de Ac contra <i>Proteus</i> OX2 e OX19, que possuem antígenos em comum com <i>Rickettsia</i> spp.

Abreviaturas: Ac, anticorpos; EBV, vírus Epstein-Barr; GV, glóbulos vermelhos; Ig, imunoglobulinas.

6.5. CONTROLO DE QUALIDADE – BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA

6.5.1. CALIBRAÇÕES

A periodicidade das calibrações deverá ser estabelecida pelo utilizador, de acordo com as características do equipamento, a frequência e tipo de utilização (tabela 42).

No entanto, é necessário proceder à calibração dos diferentes parâmetros, sempre que um reagente de lote diferente do anterior é introduzido de novo, e sempre que o CQI se

encontre fora dos limites normais; para isso utilizam-se padrões de concentração conhecida, cujos valores são previamente introduzidos no programa do autoanalisador.

Tabela 42. Periodicidade da calibração dos equipamentos utilizados no setor da Bioquímica/Imunologia

Equipamento	Periodicidade
ARCHITECT® System ci8200	Neste equipamento procede-se à calibração sempre que os valores do CQI diário se encontrem fora dos intervalos de referência, sempre que o prazo de validade da curva de calibração anterior expire e ainda quando ocorre a mudança de lote do reagente a utilizar.
Mini VIDAS®	Procede-se à calibração sempre que o prazo de validade da curva de calibração anterior expire (mensalmente) ou quando ocorre mudança do lote dos reagentes.

Abreviaturas: CQI, controlo de qualidade interno.

6.5.2. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O setor da Bioquímica/Imunologia utiliza o *software* MultiQC6 para a realização do CQI. Este *software* permite a monitorização diária dos CQI, através da representação dos diferentes CQ sob a forma de mapas controlo: Gráficos de *Levey-Jennings* (figura 38).

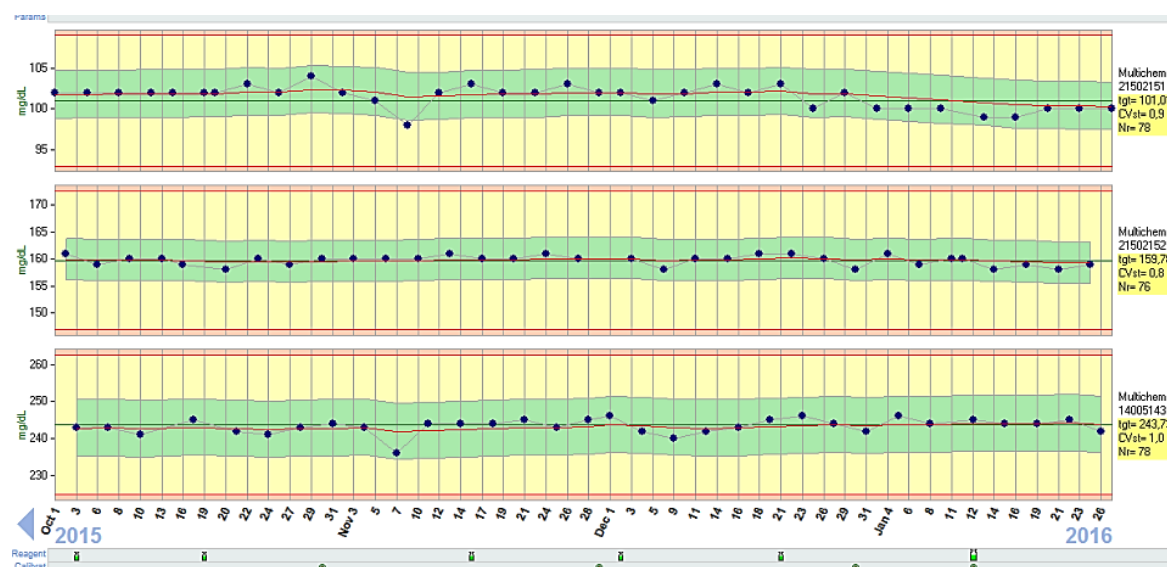


Figura 38. Gráfico de *Levey-Jennings* referente aos diferentes níveis de controlo de qualidade utilizados para avaliar o analito colesterol.

Tabela 43. Monitorização e periodicidade da realização dos controlos de qualidade diários efetuados nos diferentes equipamentos do setor da Bioquímica/Imunologia

Equipamento	Periodicidade	Monitorização
ARCHITECT® System ci8200	Contro de qualidade diário: início da manhã e durante a tarde.	Existem três níveis de controlo (baixo, normal e alto) para os parâmetros da bioquímica, imunologia e parâmetros determinados na urina. Utiliza-se um nível de controlo para cada um, alternando os níveis utilizados.
Mini VIDAS®	Realiza-se sempre que é realizada a abertura de uma nova caixa e após uma calibração.	Utilizam-se dois níveis de controlo (normal e alto).
HYDRASYS®	Sempre que se efetuar a realização de proteinogramas.	Alternam-se os dois níveis de controlo existentes (normal e patológico)

6.5.3. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

O LPCMA participa no esquema de AEQ promovida pelo RIQAS. Quinzenalmente são monitorizados todos os parâmetros efetuados no equipamento *ARCHITECT® System i2000/c8000*.

Na figura 39 encontra-se um exemplo de parte de um dos relatórios recebidos do RIQAS para o parâmetro AST. Na figura 39 (A) pode observar-se um gráfico com os resultados obtidos anteriormente e o desvio em relação à média.

Na figura 39 (B) é possível verificar a quantidade de laboratórios que participaram e o método utilizado na determinação desse parâmetro. Verifica-se que o nosso resultado foi próximo da média dos resultados obtidos pelos laboratórios que utilizaram o mesmo método.

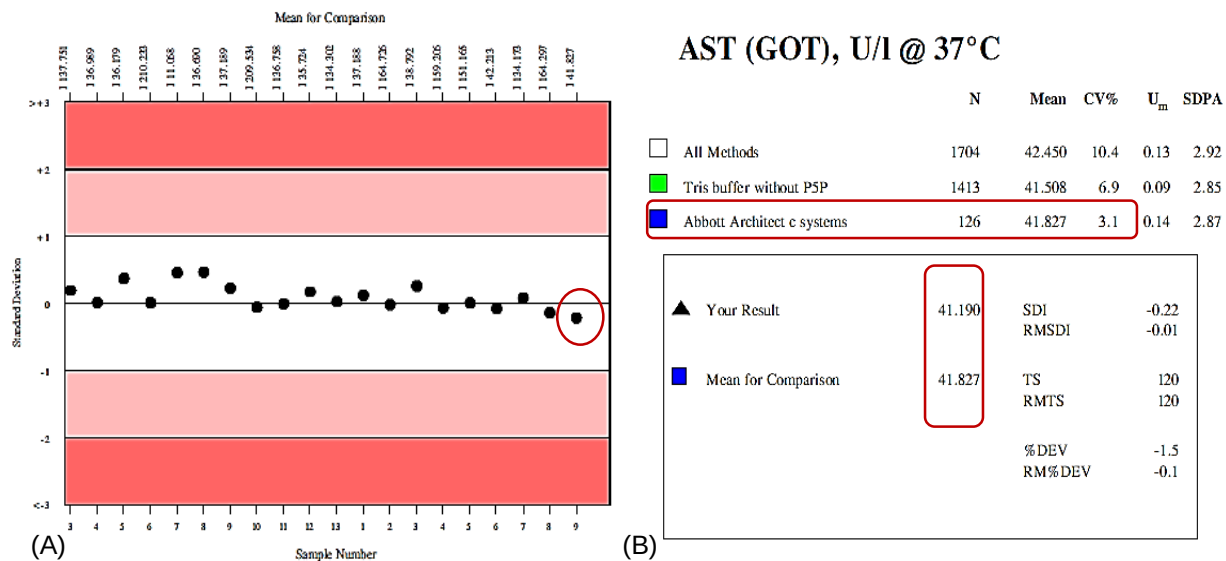


Figura 39. (A) Gráfico que representa o número de amostras enviadas, os valores obtidos ao longo do tempo e o seu desvio em relação à média. (B) Representação do número de laboratórios, tipo de metodologia utilizada e a respetiva média obtida pelos laboratórios que entraram no estudo.

7. VALÊNCIA DA MICROBIOLOGIA

Ao setor da Microbiologia chegam diariamente vários tipos de amostras biológicas, incluindo maioritariamente urinas e fezes, mas também outros produtos, como por exemplo, vários tipos de exsudados (purulentos, uretrais, faríngeos, nasais e principalmente vaginais), expetoração e sémen.

Neste setor, efetuam-se ainda análises pertencentes à valência da Química Clínica, incluindo a análise sumária da urina e a observação do respetivo sedimento urinário.

A sala da Microbiologia encontra-se dividida em diferentes partes, onde se situam os equipamentos automáticos, uma câmara de fluxo laminar, a zona de colorações e lavagens, uma estufa a 37°C para o exame cultural, e uma bancada com microscópio ótico (Mo) para a observação de lâminas. Na tabela 44 encontram-se mencionados os equipamentos automáticos existentes neste setor.

Tabela 44. Equipamentos disponíveis no setor da Microbiologia

Equipamentos	Parâmetros efetuados
Aution MAX™ AX-4280	Parâmetros químicos e físicos da urina.
MicroScan WalkAway 40SI	Identificação de bactérias e respetivos TSA.

Abreviaturas: TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos.

Durante o tempo que permaneci na Microbiologia tive a oportunidade de me integrar na rotina de trabalho, o que me permitiu realizar todas as metodologias pertencentes a este setor do laboratório, incluindo o exame microscópico e cultural dos diferentes produtos biológicos, os respetivos testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA), a execução e observação dos esfregaços com coloração de *Gram* e *Ziehl-Neelsen* (ZN) e o manuseamento dos diferentes equipamentos disponíveis neste setor. De seguida, vou descrever de forma mais detalhada as principais atividades realizadas diariamente no setor da Microbiologia.

7.1. EXAME BACTERIOLÓGICO

O procedimento relativo ao diagnóstico de processos infecciosos inicia-se geralmente com o exame microscópico da amostra em estudo, para a pesquisa de um potencial microrganismo patogénico e o estudo da sua morfologia. De seguida, é efetuado o exame cultural nos meios de cultura apropriados, de forma a cultivar e isolar, se presente, o agente etológico da infeção. Se necessário, realizam-se ainda algumas provas bioquímicas rápidas adicionais e/ou uma coloração de *Gram* para auxiliar na identificação (ID) do agente infeccioso. Por fim, efetua-se a confirmação da sua ID e os respetivos TSA, recorrendo a métodos automatizados.

7.1.1. EXAME DIRETO/MICROSCÓPICO

O exame direto por microscopia ótica é o método mais frequentemente utilizado, tanto na detecção dos microrganismos diretamente nas amostras biológicas, como na caracterização morfológica dos microrganismos isolados após sementeira, com recurso a corantes específicos. É considerada a primeira etapa do estudo e ID de um microrganismo na maioria das amostras que chegam ao laboratório.

EXAME “A FRESCO”

O exame microscópico “a fresco” de uma amostra permite uma avaliação semi-quantitativa dos elementos celulares (células epiteliais, leucócitos, GV) e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas), sendo efetuado na rotina do laboratório para a análise das urinas, espermatozoides, exsudados vaginais e uretrais, e parasitológico de fezes.

O procedimento consiste em colocar a amostra entre lâmina e lamela e proceder à observação microscópica na objetiva de 40x.

EXAME APÓS COLORAÇÃO

O exame microscópico após coloração permite perceber as características morfológicas das bactérias. As técnicas utilizadas são efetuadas sobre esfregaços secos e fixados pelo calor, sendo a observação ao Mo realizada na objetiva de imersão (100x). No LPCMA as colorações utilizadas são a coloração de *Gram* e a coloração de ZN.

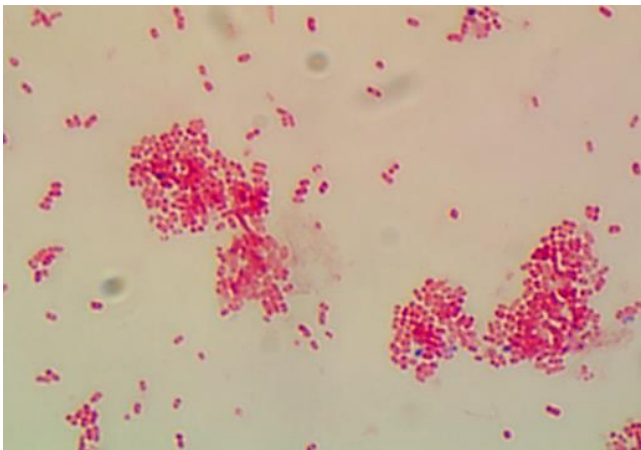
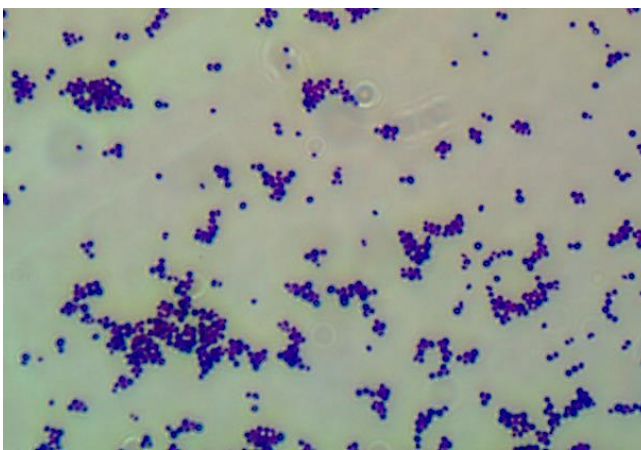
- COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de *Gram* é um tipo de coloração diferencial que utiliza dois corantes distintos, permitindo diferenciar os microrganismos com base nas suas características morfológicas. Esta coloração consiste na utilização do corante primário violeta de cristal, numa solução de lugol (solução de iodo que funciona como mordente, promovendo uma melhor fixação do corante), uma solução descolorante de álcool/acetona e por fim o corante de contraste, a safranina.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As diferenças relativas à estrutura da parede bacteriana, principalmente em relação à espessura da camada de peptidoglicano e à existência de membrana externa, são responsáveis pelo diferente comportamento das bactérias perante a coloração de *Gram* (tabela 45).

Tabela 45. Características morfológicas e aspeto das diferentes bactérias após realização da coloração de Gram (objetiva de imersão)

Exemplo	Características morfológicas
 Bacilos Gram-negativos. Imagem obtida no Mo, na objetiva de imersão (100×).	A parede celular destas bactérias é constituída por uma membrana externa lipopolissacarídica e por uma fina camada de peptidoglicano. A utilização da solução de álcool/acetona extrai os lípidos existentes na membrana externa, e como a camada de peptidoglicano é escassa, não ocorre a retenção do complexo iodo – violeta de cristal, e as células ficam descoradas. Depois da atuação do corante de contraste safranina, estas bactérias adquirem uma cor rosa.
 Cocos Gram-positivos. Imagem obtida no Mo, na objetiva de imersão (100×).	Estas bactérias possuem uma espessa camada de peptidoglicano, que atua como uma barreira no processo de descoloração, permitindo a retenção do complexo iodo - violeta de cristal no interior da célula, mesmo após lavagem com a solução descolorante. Assim, estas bactérias apresentam-se ao Mo com aspeto violeta/roxo.

Abreviaturas: Mo, microscópio ótico.

- COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Este tipo de coloração diferencial permite corar as micobactérias para o seu exame direto, sendo geralmente realizada com o objetivo de identificar bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) presentes na expectoração, como por exemplo o *Mycobacterium tuberculosis*.

Na coloração de ZN, os BAAR retêm a cor do primeiro corante (Carbol-fucsina), não descorando pela ação da solução de álcool-ácido. As restantes bactérias que não possuem

os ácidos micólicos na sua parede celular, e que descoraram após a utilização da solução descolorante, são contra-coradas com azul-de-metileno.

A observação do esfregaço corado é realizada na objetiva de imersão (100x), devendo relatar-se a presença ou ausência de BAAR, que se apresentam como bastonetes finos, ligeiramente curvos, corados de vermelho sobre fundo corado de azul, como se pode observar na figura 40.

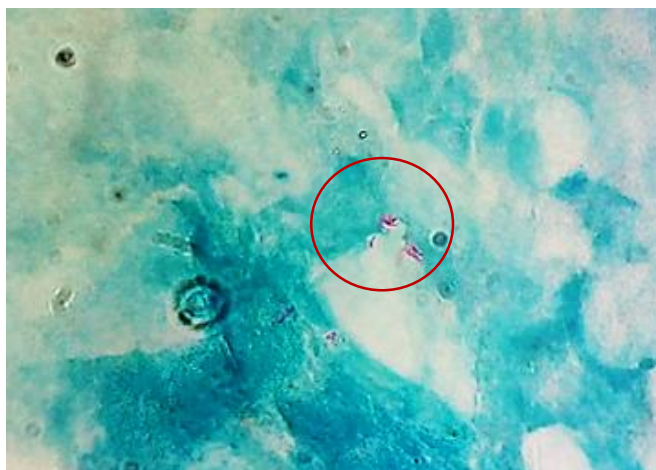


Figura 40. Coloração de *Ziehl-Neelsen*: presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (imagem obtida no microscópio ótico, na objetiva de imersão).

7.1.2. EXAME CULTURAL

Todas as amostras biológicas rececionadas no laboratório são tratadas de forma distinta, tendo em conta as suas características e atendendo ao tipo de agente patogénico mais frequentemente isolado nesse produto. Tendo isso em mente, os diferentes produtos biológicos são semeados em meios de cultura distintos. Para além disso, é necessário ter em conta que nalgumas regiões do corpo é normal a presença de uma flora microbiana residente, pelo que nesses locais é importante saber o que se deve valorizar como possivelmente patogénico.

MEIOS DE CULTURA

A informação relativa aos meios de cultura e meios de transporte utilizados durante o estágio encontra-se em anexo (anexo 2).

PRINCIPAIS TÉCNICAS DE SEMEITEIRA UTILIZADAS

- MEIOS SÓLIDOS EM PLACA

A maioria das amostras biológicas que chega ao laboratório é semeada nos meios sólidos em placa pela técnica dos 4 quadrantes. Ou seja, coloca-se uma pequena quantidade de

amostra no meio de cultura (1º quadrante) com a ansa ou com a zaragatoa que possui a amostra, e procede-se à sementeira por estriamento em 4 quadrantes, permitindo desse modo observar, se existente, a distribuição e predomínio da flora saprófita e/ou a presença do possível agente patogénico isolado no último quadrante semeado. Deve efetuar-se as estrias nos quadrantes seguintes tocando sempre com a ansa nas estrias do quadrante anterior, com exceção do último, como se pode observar pela figura 41.

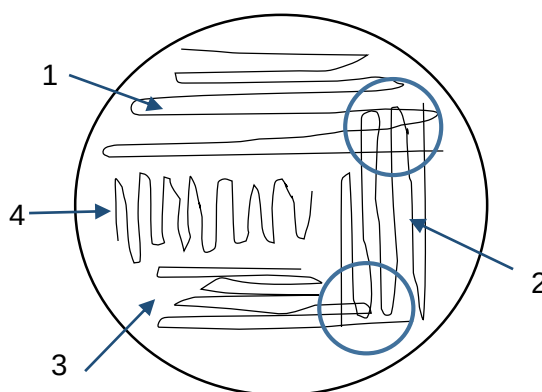


Figura 41. Representação da técnica de sementeira por 4 quadrantes, utilizada na inoculação em meio de cultura sólido da maioria dos produtos biológicos que chegam ao laboratório.

Em relação às urinas, como o objetivo é isolar e quantificar o número de unidades formadoras de colónias (UFC)/mL, utiliza-se o método da ansa calibrada (1 μ L) para realizar a sua sementeira. Assim, mergulha-se uma ansa previamente flamejada e arrefecida na amostra de urina, procedendo-se à sua inoculação no meio de cultura. Para isso, realiza-se uma linha no centro da placa e estria-se a placa cruzando a linha central várias vezes com estrias perpendiculares, tal como se pode observar pela figura 42.

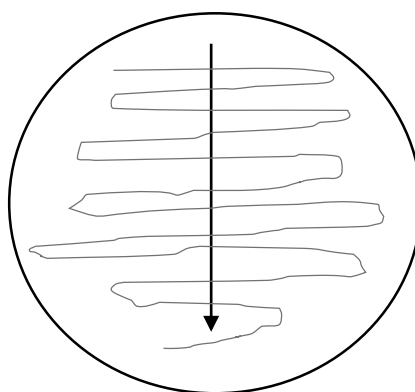


Figura 42. Representação da técnica de sementeira utilizada na inoculação das amostras de urina de forma a obter unidades formadoras de colónia isoladas e contáveis.

- MEIO LÍQUIDO EM TUBO

Determinados produtos que chegam ao laboratório são semeados em meio líquido. Esses produtos incluem os exsudados vaginais com pesquisa de *Streptococcus agalactiae* no caldo de Granada™ e as fezes com exame bacteriológico, que são inicialmente semeadas no caldo de enriquecimento Selenito-Cistina™.

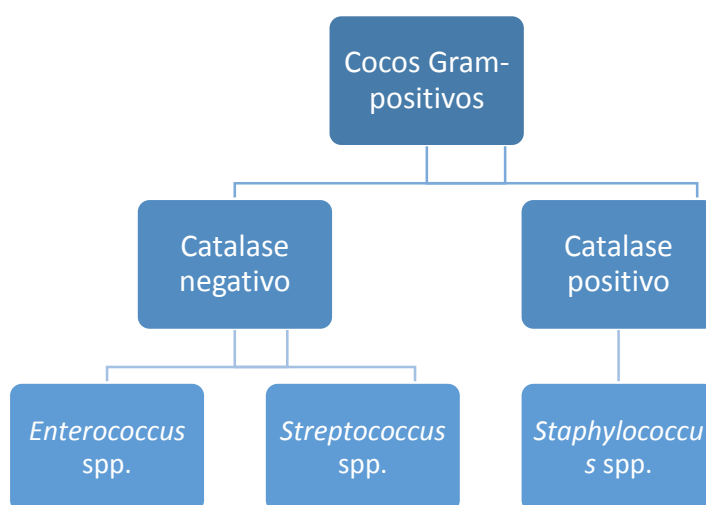
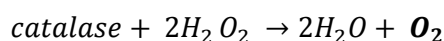
A inoculação é realizada mergulhando o produto (presente na zaragatoa ou numa ansa) diretamente no meio líquido em tubo.

7.1.3. TESTES BIOQUÍMICOS DE IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA

Realizam-se alguns testes bioquímicos rápidos que permitem auxiliar na orientação da ID bacteriana, de forma a perceber que tipo de painel *MicroScan*® se deve utilizar na confirmação da ID e respectivos TSA. Na rotina do laboratório, os testes rápidos mais utilizados incluem a prova da catalase, prova da oxidase e o teste do indol.

PROVA DA CATALASE

Esta prova é utilizada na distinção entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp./*Enterococcus* spp., e tem como objetivo determinar a capacidade de um microrganismo em produzir a enzima catalase. Para isso, esfrega-se uma colônia suspeita numa lâmina de vidro, onde se adiciona também peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Se existir produção de catalase por parte das bactérias, após adição de H₂O₂, ocorre libertação de bolhas de ar, sob a forma de O₂:



Distinguem-se pela ausência/presença de hemólise no meio de cultura gelose de

Figura 43. Algoritmo para a utilização da prova da catalase na distinção de cocos Gram-positivos.

PROVA DA CITOCROMO OXIDASE

Esta prova é utilizada essencialmente para diferenciar os bacilos Gram-negativos com metabolismo oxidativo (*Pseudomonas* spp. e *Neisseria* spp.) dos oxidase negativos (*Enterobacteriaceae*).

Este teste coloca em evidência a presença da enzima citocromo c oxidase, a qual catalisa a reação de oxidação do citocromo c pelo O₂, intervindo na cadeia respiratória da bactéria. Escolhe-se uma colônia suspeita existente no meio de cultura e espalha-se num papel de filtro, adicionando depois uma gota do reagente da oxidase, que funciona como um dador artificial de eletrões. Na presença de O₂ e de citocromo c oxidase, o reagente fenilenodiamina é oxidado, e forma um composto violeta escuro, indicativo de um resultado positivo.

PROVA DO INDOL

Esta prova é utilizada na confirmação da ID de *Escherichia coli*, e tem como objetivo a pesquisa da enzima triptofanase, pela deteção de um subproduto da desaminação do aminoácido triptofano, o indol.

Para a deteção do indol, colocam-se umas gotas do reagente p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) em papel de filtro, retirando uma colônia suspeita isolada do meio de cultura e espalhando-a pelo papel de filtro. O aparecimento de uma cor verde-azulada indica que o indol produzido pela bactéria reagiu com o DMACA, indicando a presença da enzima triptofanase.

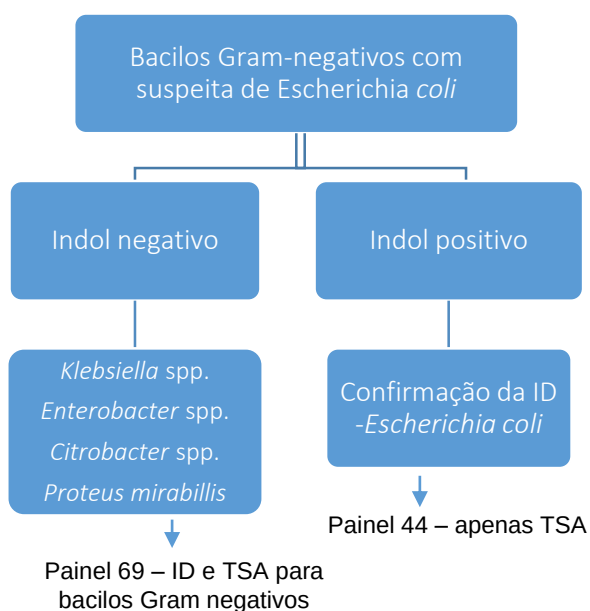


Figura 44. Algoritmo para a utilização do teste do indol na identificação direta de *Escherichia coli*.
Abreviaturas: ID, identificação; TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos.

7.2. TESTES DE IDENTIFICAÇÃO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A realização da ID de um microrganismo e dos respectivos TSA é efetuada sempre que se encontre um microrganismo possivelmente patogénico num dos produtos biológicos rececionados. No LPCMA é utilizado o equipamento *MicroScan WalkAway 40SI* para a execução dos procedimentos mencionados.

7.2.1. MICROSCAN WALKAWAY 40SI

O equipamento *MicroScan WalkAway* corresponde a um equipamento totalmente automatizado utilizado na rotina da microbiologia clínica do laboratório, que procede à incubação da suspensão bacteriana pelo período de tempo exigido, adicionando a cada poço, se necessário, os respetivos reagentes, e executando no final a leitura dos painéis. Este equipamento utiliza uma dupla metodologia de leitura, que consiste em dois sistemas óticos (fluorímetro e espectrofotómetro) controlados informaticamente, que detetam a emissão de fluorescência ou as alterações na cor/turvação dos poços existentes ao nível dos painéis *MicroScan*[®]. Os dados provenientes do sistema de leitura são depois analisados e interpretados pelo *software* LabPro incorporado no equipamento.

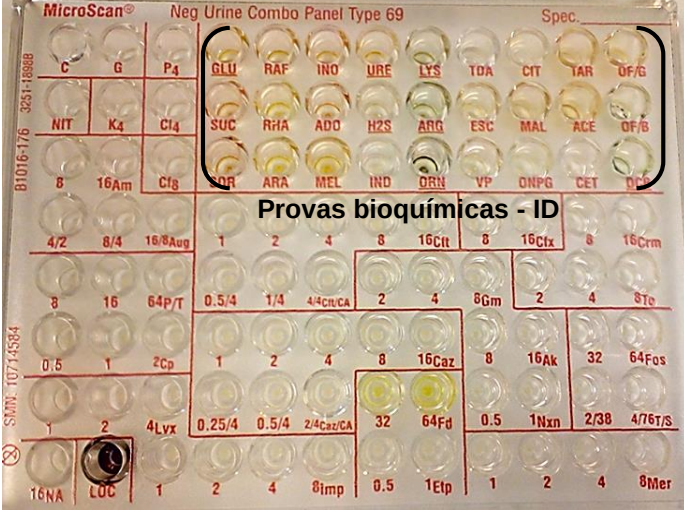
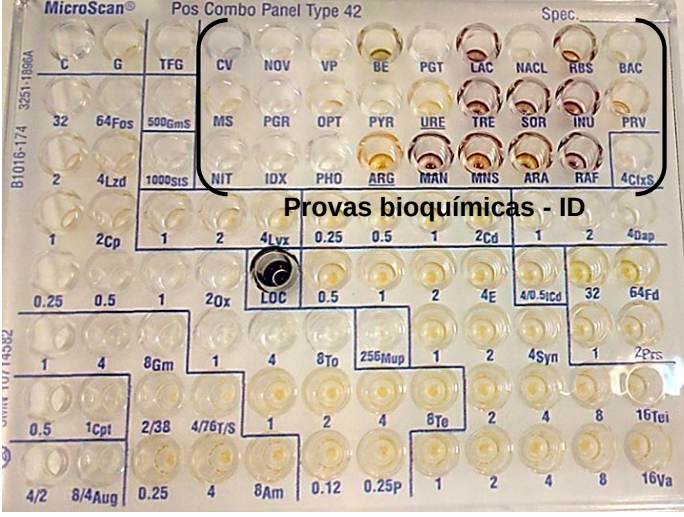


Figura 45. Equipamento *MicroScan WalkAway 40SI* utilizado na identificação bacteriana e respetivos testes de suscetibilidade aos antibióticos.

PAINÉIS MICROSCAN[®]

Os painéis *MicroScan*[®] foram concebidos para a utilização na ID ao nível da espécie de bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos e/ou na determinação da sensibilidade dos diferentes microrganismos aos agentes antimicrobianos. No LPCMA utilizam-se principalmente os painéis *MicroScan*[®] cromogénicos convencionais 42, 44 e 69 (tabela 46), existindo outros painéis específicos para a ID e TSA de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp., que são, no entanto, menos frequentemente utilizados.

Tabela 46. Principais painéis MicroScan® utilizados no laboratório para a identificação bacteriana e respetivos testes de suscetibilidade aos antibióticos

Tipo de painel	Finalidade
 POCO DE IDENTIFICAÇÃO DA PLACA	PAINEL MICROSCAN® 44 Realização dos TSA para bacilos Gram-negativos, quando a sua ID é conhecida. Utilizado essencialmente para <i>Escherichia coli</i>.
 Provas bioquímicas - ID	PAINEL MICROSCAN® 69 Realização simultânea da identificação de bacilos Gram-negativos e respetivos TSA.
 Provas bioquímicas - ID	PAINEL MICROSCAN® 42 Realização simultânea da identificação de cocos Gram-positivos e respetivos TSA.

Abreviaturas: ID, identificação; TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Para executar a ID bacteriana, o equipamento *MicroScan WalkAway* realiza uma série de testes bioquímicos concebidos para a determinação das espécies bacterianas mais significativas na prática clínica. Para isso, os painéis utilizados contêm meios de identificação constituídos por substratos e/ou inibidores de crescimento que, de acordo com o microrganismo presente, originam alterações de cor/turvação.

TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Os TSA baseiam-se na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro* na presença de diferentes antimicrobianos.

Assim, para a realização dos TSA com identificação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), os poços dos painéis contêm concentrações específicas dos vários antimicrobianos a testar. A presença de turvação será inferior ou não estará presente nos poços onde o antimicrobiano inibiu o crescimento bacteriano.

Para cada microrganismo isolado é testado um quadro alargado de antibióticos disponíveis nos painéis *MicroScan*[®], mas o boletim analítico final entregue ao utente, apenas inclui os antibióticos selecionados de acordo com as regras estabelecidas pelo laboratório.

- PROCEDIMENTO

Começa-se por introduzir, no computador LabPro associado ao equipamento *MicroScan WalkAway*, as informações relativas ao tipo de painel que se vai efetuar e informações que possam auxiliar e orientar a ID do microrganismo (tabela 47), identificando devidamente cada painel com uma etiqueta impressa pelo equipamento.

Tabela 47. Informações importantes a introduzir no software LabPro de acordo com o painel *MicroScan*[®] utilizado

Tipo de painel	Informações importantes
Painel <i>MicroScan</i>[®] 42	- Qual é o produto em que se efetua o isolamento? - Suspeita-se de um <i>Streptococcus</i> spp. ou <i>Staphylococcus</i> spp.? - Apresenta hemólise em gelose de sangue? Tipo de hemólise?
Painel <i>MicroScan</i>[®] 69	- Qual é o produto em que se efetua o isolamento? - Teste da oxidase positivo ou negativo?

Para a realização da ID e respetivo antibiograma é necessário preparar uma suspensão bacteriana, utilizando-se para isso o Sistema-D de Inoculação *Prompt*TM (figura 46 (A) e (B)), que permite a padronização dos inóculos por microdiluição. De seguida transfere-se

a suspensão, com o auxílio do sistema inoculador RENOK (figura 46 (C)), do tabuleiro de sementeira para o respetivo painel e introduz-se no equipamento.

No interior do equipamento, dependendo do tipo de painel, se necessário, é adicionado o óleo de imersão e os respetivos reagentes. Após o período de incubação, que depende do tipo de microrganismo a isolar, o equipamento procede à leitura dos resultados que são transmitidos ao LabPro para cálculo e análise.

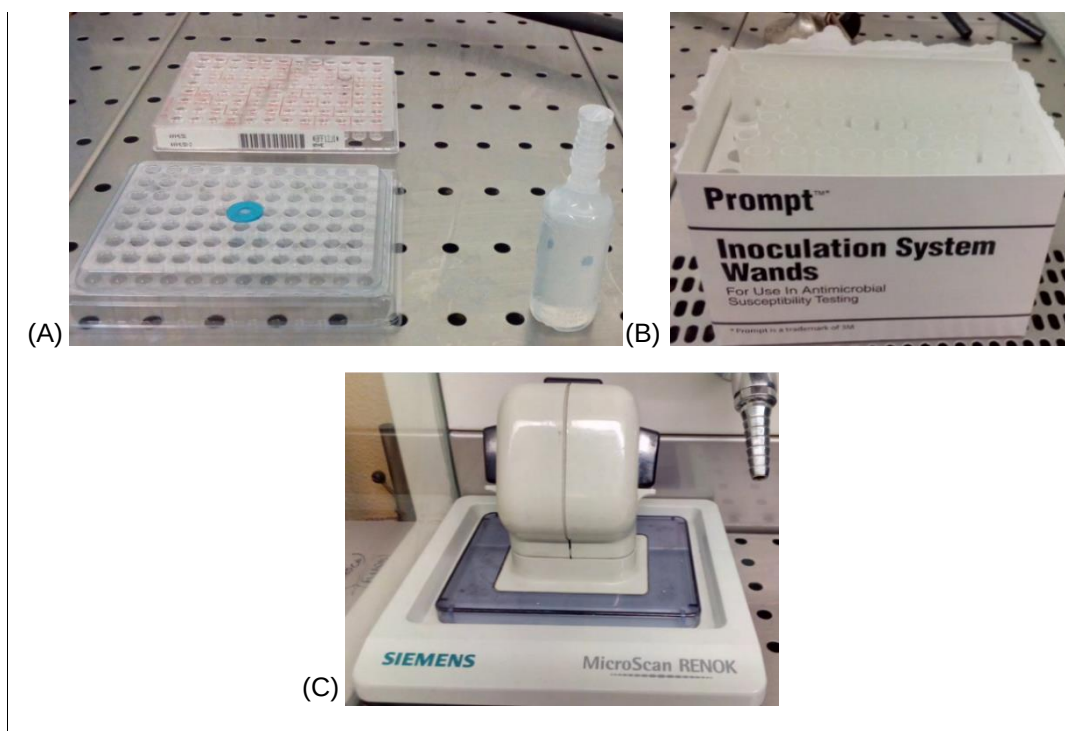


Figura 46. (A) Garrafa com a solução para a realização da suspensão bacteriana e o respetivo tabuleiro de sementeira (B) Varas de inoculação (C) Sistema *MicroScan* RENOK para a transferência da suspensão bacteriana para o respetivo painel.

MICROORGANISMOS “ALERTA”

Os microrganismos “alerta” correspondem àqueles que possuem um padrão de resistência ou suscetibilidade intermédia a algum antimicrobiano pouco habitual ou de baixa prevalência em Portugal, pelo que o seu isolamento implica a utilização de medidas urgentes para a sua contenção.

Quando surge algum destes microrganismos no laboratório, tem de ser efetuada a sua notificação à Direção Geral de Saúde (DGS) e ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), num prazo máximo de 48 horas após a confirmação dos resultados.

O microrganismo isolado deve ser então enviado em cultura pura, para que uma vez no INSA, seja realizada a validação do tipo de resistência e, sempre que se justifique, seja estudado o respetivo mecanismo de resistência.

7.3. URINAS

Após receção das urinas no laboratório, a sua triagem é efetuada no setor da Microbiologia, e como existem 2 equipamentos que realizam a análise sumária da urina, opta-se por separar as urinas tipo II das urinas bacteriológicas, permitindo que se estabeleça um circuito específico para cada tipo de análise, rentabilizando dessa forma o seu tempo de execução (figura 47).

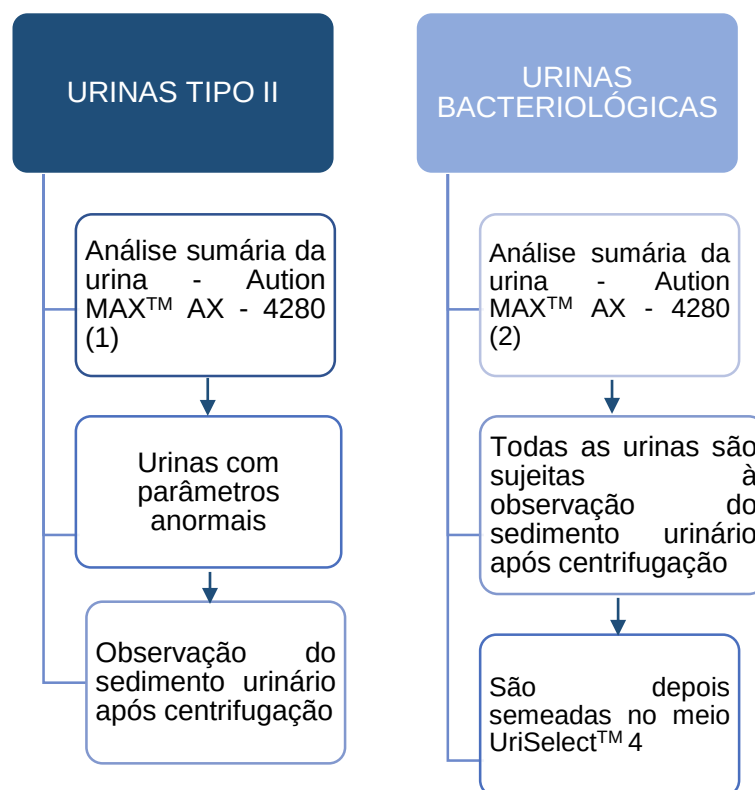


Figura 47. Circuito efetuado pelas urinas tipo II e urinas bacteriológicas após a sua receção no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina.

7.3.1. URINA TIPO II – ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA

A análise sumária da urina fornece informações importantes, de forma rápida e económica para o diagnóstico, orientação terapêutica e monitorização de doenças renais e do trato urinário. Esta análise envolve o exame físico e químico da urina, e quando necessário a observação microscópica do sedimento urinário.

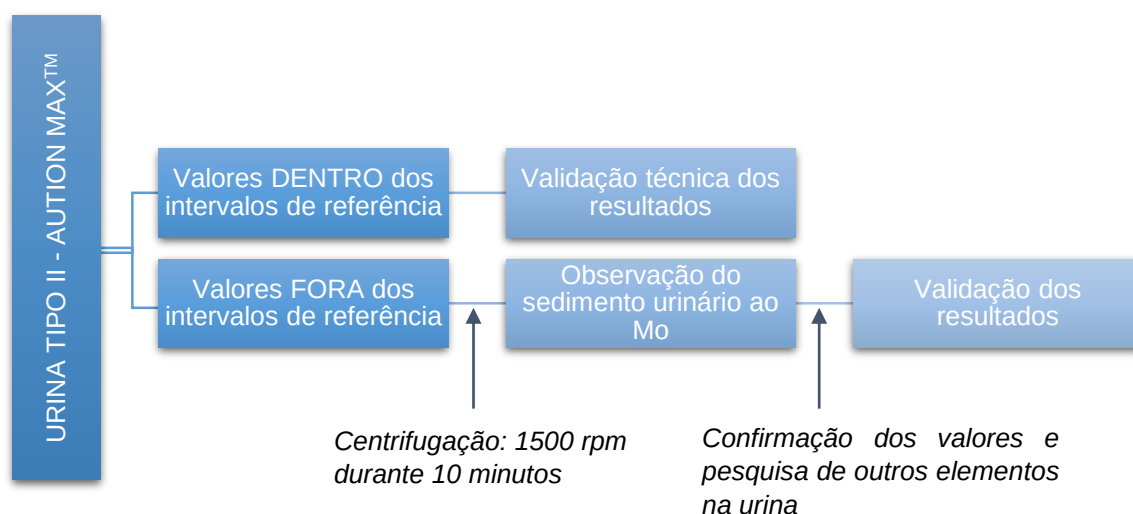


Figura 48. Algoritmo utilizado no tratamento das urinas tipo II após a sua receção/triagem. **Abreviaturas:** Mo, microscópio ótico; rpm, rotações por minuto.

AUTION MAX™ AX-4280

O exame físico e químico da urina é efetuado no equipamento *Aution MAX™ AX-4280*, permitindo a determinação qualitativa e semi-quantitativa de vários parâmetros na urina. Possui um sistema completamente automatizado, com leitura de código de barras, em que as amostras de urina são homogeneizadas por uma agulha e posteriormente são dispensadas gotas de urina nas tiras-teste reagente (*Uriflet S®*) para a determinação dos diferentes parâmetros químicos. Estas tiras-teste possuem zonas absorventes impregnadas com os reagentes específicos para a determinação de cada analito.



Figura 49. Analisador de bancada totalmente automatizado utilizado na análise sumária das urinas.

Os diferentes métodos de leitura e o seu princípio de funcionamento estão representados na tabela 48.

Tabela 48. Métodos e respectivos princípios de funcionamento utilizados na determinação dos vários parâmetros fornecidos pelo Aution MAX™ AX-4280

Método	Princípio de funcionamento	Parâmetros
Nefelometria	Medição da intensidade do feixe de luz que é dispersado (difração da luz) numa determinada direção após a sua passagem pela amostra. - Quanto maior o grau de turvação da urina, maior será a quantidade de luz que se dispersa e que é detetada pelo fotodíodo.	Grau de turvação/aspecto da urina
Refratometria	Consiste na medição dos ângulos de refração da luz após passagem pela amostra de urina.	Densidade
<u>Tiras-teste reagente</u> Refletância em bicromatismo	- É emitida luz com 2 λ específicos que incidem sobre as tiras-teste reagente. Essa luz é depois refletida com uma intensidade que depende da cor formada na tira-teste após a reação química ocorrida na presença da urina. A luz detetada pelo fotodíodo é convertida em valores de refletância e posteriormente em resultados semi-quantitativos, de acordo com o parâmetro determinado.	Parâmetros químicos - pH, glicose, urobilinogênio, nitritos, sangue, cetonas, proteínas, leucócitos e bilirrubina.
Refletância em 4 comprimentos de onda diferentes	Para a determinação da cor da urina, o aparelho avalia os valores de refletância obtidos para 4 λ diferentes.	Cor da urina

EXAME FÍSICO DA URINA**COR**

A cor da urina é muito variável e pode ser alterada por diversas situações clínicas, tornando-se um parâmetro pouco sensível (tabela 49).

Tabela 49. Situações mais comuns associadas ao aparecimento das diferentes cores da urina

Cor da urina	Situações clínicas
Vários tons de amarelo	Cor normal da urina - presença de pigmentos provenientes do metabolismo endógeno normal do organismo.
Amarelo claro/incolor	Poliúria, <i>Diabetes mellitus</i> , elevado consumo de líquidos.
Acastanhada	Presença de pigmentos biliares (icterícia).
Avermelhada	Hematúria, hemoglobinúria, contaminação durante o período menstrual da mulher.
Esbranquiçada	Situações de quilúria, lipidúria e piúria.

ASPETO/TURVAÇÃO

Geralmente a urina normal e recentemente emitida é límpida. No entanto, a urina pode apresentar-se ligeiramente turva em situações benignas, incluindo a contaminação vaginal com células epiteliais e precipitação de uratos/fosfatos, ou em situações patológicas por presença de bacteriúria, leucocitúria ou hematúria.

EXAME QUÍMICO DA URINA

Os diferentes parâmetros químicos determinados com recurso às tiras-teste reagente e o seu significado encontram-se sumariados na tabela 50.

Tabela 50. Interpretação dos resultados obtidos para os parâmetros químicos determinados pelo equipamento Aution MAX™ AX-4280

Parâmetros	Considerações clínicas
Densidade	Indica a concentração de substâncias iónicas dissolvidas na urina, em função do poder de excreção e concentração dos rins. - Valores ↓: ingestão elevada de líquidos, perda da capacidade de concentração urinária (<i>diabetes mellitus</i> , <i>diabetes insipidus</i> e insuficiência renal); - Valores ↑: desidratação (vómitos, diarreia).
pH	Normalmente, a urina é discretamente ácida; meio de eliminação de ácidos. A determinação do pH urinário é útil na deteção de possíveis distúrbios eletrolíticos de origem metabólica ou respiratória, no diagnóstico e abordagem das infeções urinárias e da litíase renal, sendo também útil para a identificação de cristais no sedimento urinário.
Proteínas	Numa urina normal, as proteínas existentes são essencialmente de baixo peso molecular, sendo seletivamente filtradas nos glomérulos renais e absorvidas na sua maioria pelos túbulos renais. - Valores ↑: em estados fisiológicos incluindo febre, exercício físico prolongado e <i>stress</i> , podendo também ser sugestivo de doença renal. Um sinal positivo para proteínas pode ainda ser indicativo da presença de cilindros hialinos ou espermatozoides.
Glicose	Em condições normais, a glicose é livremente filtrada pelos glomérulos e reabsorvida a nível dos túbulos renais, podendo ser detetada em pequena quantidade numa urina normal. Glicosúria: a capacidade máxima de reabsorção dos túbulos renais é ultrapassada - <i>Diabetes mellitus</i> . Situações de glicosúria, não acompanhadas de hiperglicemia, podem ocorrer devido a distúrbios na reabsorção tubular renal da glicose, ou em situações fisiológicas como a gravidez.

Continuação da **tabela 50**

Parâmetros	Considerações clínicas
Corpos cetônicos	São um produto do metabolismo incompleto dos lípidos, estando a sua presença na urina relacionada com condições metabólicas nas quais são utilizados lípidos como fonte de energia em vez de carboidratos. Valores ↑: situações fisiológicas (jejum prolongado, vômitos), cetoacidose diabética (a insuficiência de insulina impossibilita o normal metabolismo dos carboidratos), alcoolismo e raras doenças metabólicas hereditárias.
Bilirrubina	O aparecimento de bilirrubina na urina representa apenas a fração conjugada (forma hidrossolúvel). A sua presença na urina é observada em situações de obstrução das vias biliares por cálculos ou lesão dos hepatócitos, ocorrendo dessa forma o refluxo de bilirrubina conjugada dos canalículos biliares para o sangue, com posterior passagem para a urina.
Urobilinogênio	A bilirrubina conjugada libertada no intestino, através da bile, é transformada por ação bacteriana da microbiota intestinal em urobilinogênio. A maior parte do urobilinogênio reabsorvido é removido da circulação sanguínea pelo fígado e uma pequena porção é excretada na urina, pelo que indivíduos saudáveis podem conter pequenas quantidades na urina. Valores ↑: situações de hemólise eritrocitária e disfunções/lesões hepáticas.
Nitritos	Este teste permite a detecção da presença de bactérias com capacidade de reduzir os nitratos a nitritos (presença da enzima nitrato redutase), incluindo a <i>Escherichia coli</i>, podendo auxiliar no diagnóstico de infecção urinária.
Sangue	Um resultado positivo para a presença de sangue na urina pode indicar a presença de GV (hematúria), Hb (hemoglobinúria) ou mioglobina (mioglobinúria). - Presença de GV ou Hb livre: possível doença gênito-urinária ou renal. Pode ocorrer também contaminação durante o período menstrual das mulheres, originando um resultado falso positivo.
Leucócitos	A pesquisa de leucócitos na urina é muito útil na identificação de processos infecciosos do trato urinário. A presença de piúria está geralmente associada à presença de bactérias. Uma piúria sem bacteriúria pode ser devido a infecções por <i>Trichomonas vaginalis</i>, leveduras ou inflamação dos tecidos renais.

Abreviaturas: ↑, aumentados; ↓, diminuídos; GV, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina.

7.3.2. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SEDIMENTO URINÁRIO

Após análise das urinas pelo equipamento *Aution MAX™ AX-4280*, as urinas ditas anormais (com parâmetros alterados) e as urinas bacteriológicas, são sujeitas a centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. De seguida, descarta-se o sobrenadante, procedendo-se à visualização do sedimento urinário ao Mo. Para isso, é colocada uma gota do sedimento urinário entre lâmina e lamela, e é efetuada a contagem do número de elementos por campo na objetiva de 40×.

O exame microscópico do sedimento urinário permite identificar, caracterizar e semi-quantificar os elementos figurados clinicamente significativos como os GV, leucócitos, e células epiteliais. A presença de cristais, cilindros, microrganismos, muco e outros elementos também deve ser referenciada.

Durante o estágio tive a oportunidade de visualizar diariamente os sedimentos urinários, pelo que nesta parte do relatório vou referir os elementos que pude observar mais frequentemente, com ilustração de imagens obtidas por mim.

GLÓBULOS VERMELHOS

Os GV aparecem como discos bicôncavos, não nucleados e com dupla margem (figura 50), sendo a sua presença na urina, em pequenas quantidades, considerada normal.

LEUCÓCITOS

Os leucócitos são células redondas maiores que os GV, como é possível observar na figura 50. Quando presentes em elevado número, e em conjunto com bactérias, são sinal de uma possível inflamação/infeção urinária.

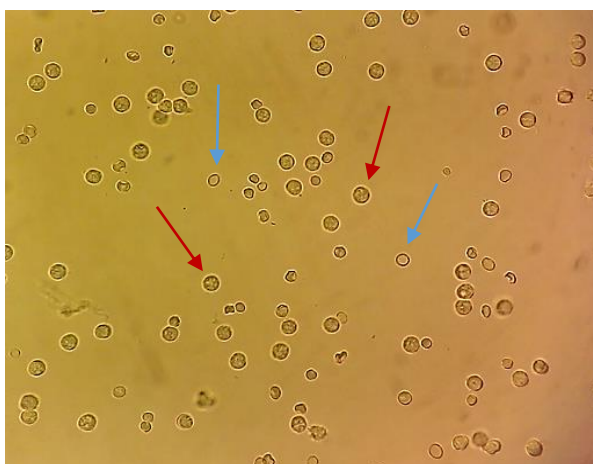


Figura 50. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de leucócitos (seta vermelha) e de glóbulos vermelhos (seta azul).

CÉLULAS EPITELIAIS

Podemos observar três tipos de células epiteliais na urina: células epiteliais de descamação (trato urinário inferior), células do uroepitélio de transição e células epiteliais tubulares renais (trato urinário superior).

As células epiteliais de descamação são as mais frequentemente encontradas na urina. Estas células são de grande tamanho, apresentando formas irregulares, um citoplasma abundante e um núcleo pequeno (figura 51). A presença de algumas células epiteliais no sedimento urinário é normal, sendo provenientes do processo natural de renovação celular, possuindo por isso pouco interesse clínico. Um elevado número destas células pode sugerir contaminação da amostra por má colheita.

As células do uroepitélio de transição são menores que as células epiteliais de descamação, possuindo geralmente uma forma característica de raquete.

As células epiteliais tubulares renais possuem uma forma redonda e um núcleo central. A sua presença em número aumentado tem sempre interesse clínico e ocorre em patologias renais como síndrome nefrótica e glomerulonefrite.

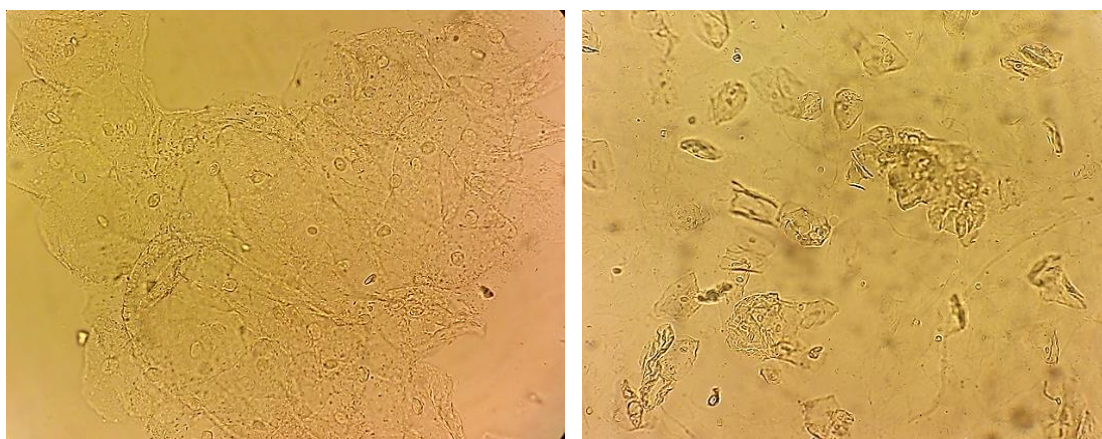


Figura 51. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas células epiteliais de descamação.

CILINDROS

Os cilindros formam-se no interior dos túbulos renais, sendo compostos principalmente pela proteína de *Tamm-Horsfall* secretada pelas células epiteliais tubulares. A sua formação é pronunciada em ambientes que favoreçam a desnaturação proteica e a sua precipitação, incluindo situações de baixo pH, estase e presença de sais concentrados.

Ao longo do processo de precipitação pode ocorrer aglutinação de elementos presentes na luz tubular, como GV, leucócitos, células epiteliais e bactérias, formando-se os diferentes tipos de cilindros. Aquele que é encontrado mais frequentemente é o cilindro hialino,

composto maioritariamente pela proteína *Tamm-Horsfall*, que geralmente não possui significado clínico de relevância.

CRISTAIS

Os cristais são formados pela precipitação dos sais presentes na urina quando submetidos a variações de pH, temperatura ou concentração. São frequentemente encontrados no sedimento urinário, mas de um modo geral, possuem um significado clínico limitado.

A identificação dos diferentes cristais pode, no entanto, ser útil na investigação de determinadas patologias hepáticas, litíase renal e de determinados erros inatos do metabolismo dos aminoácidos.

Os cristais são geralmente classificados de acordo com o pH da urina em que estão presentes, tal como se observa na tabela 51.

Tabela 51. Classificação dos diferentes tipos de cristais, de acordo com o pH urinário

Urina ácida	Urina alcalina
- Uratos amorfos - Cristais de oxalato de cálcio - Cristais de ácido úrico - Cristais de cistina e cristais de tirosina	- Fosfatos amorfos - Cristais de fosfato triplo de amónio e magnésio

CRISTAIS DE ÁCIDO ÚRICO

Geralmente não apresentam significado clínico importante. No entanto, a sua presença em elevadas quantidades pode ocorrer em casos de hiperuricemia severa ou urolitíase.

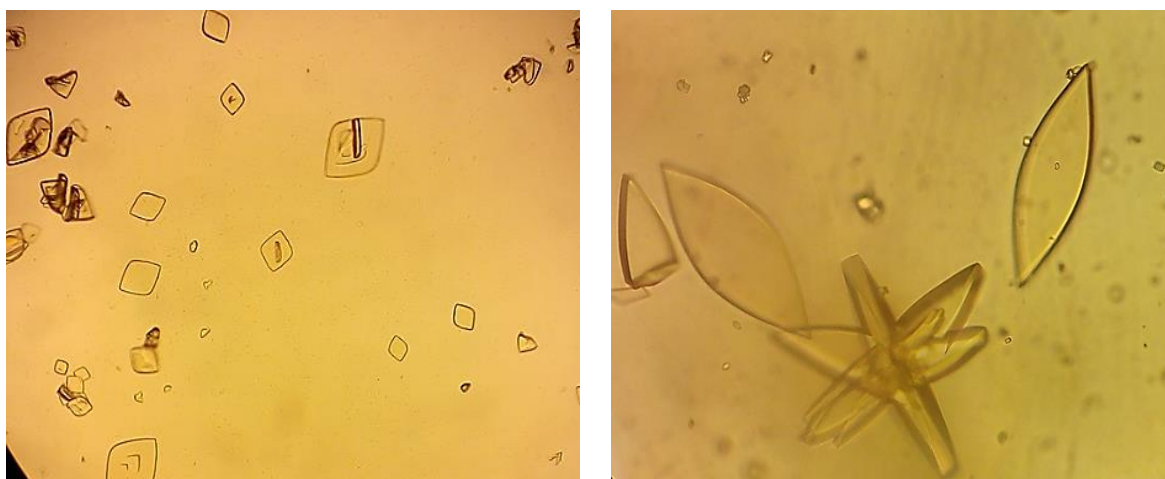


Figura 52. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de cristais de ácido úrico sob diferentes formas.

CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO

Os cristais de oxalato de cálcio estão presentes, na maioria dos casos, em situações não patológicas, principalmente devido à ingestão de determinados alimentos. No entanto, a presença destes cristais, quando associada a sintomas clínicos de litíase renal, pode indicar a origem e provável composição do cálculo renal. Estes cristais apresentam uma forma característica de octaedros incolores, como se pode observar na figura 53.

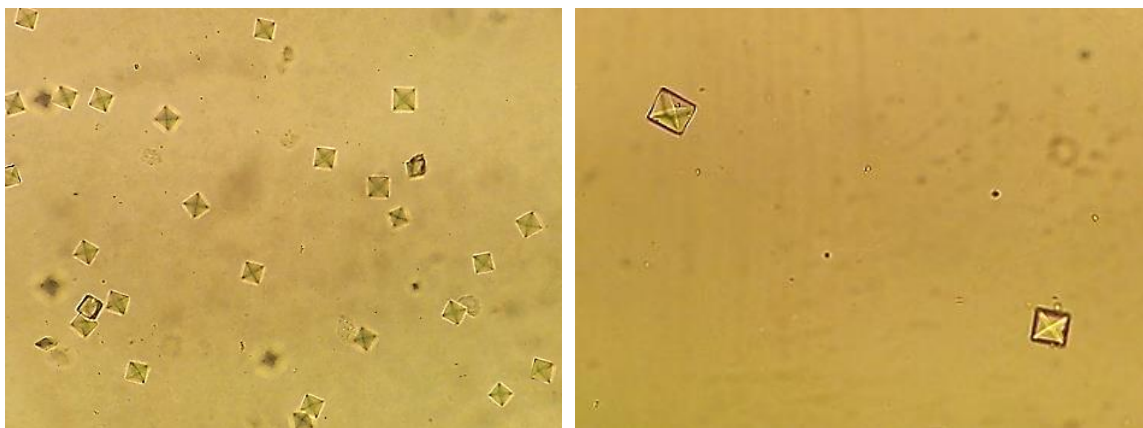


Figura 53. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de cristais de oxalato de cálcio.

CRISTAIS DE FOSFATO TRIPLO DE AMÓNIO E MAGNÉSIO

Os cristais de fosfato triplo de amónio e magnésio apresentam uma forma característica, que se assemelha a uma tampa de caixão (figura 54). Estes cristais aparecem frequentemente em urinas normais, podendo, no entanto, estar associados a infeções bacterianas por *Proteus* spp. e a situações de urolitíase.

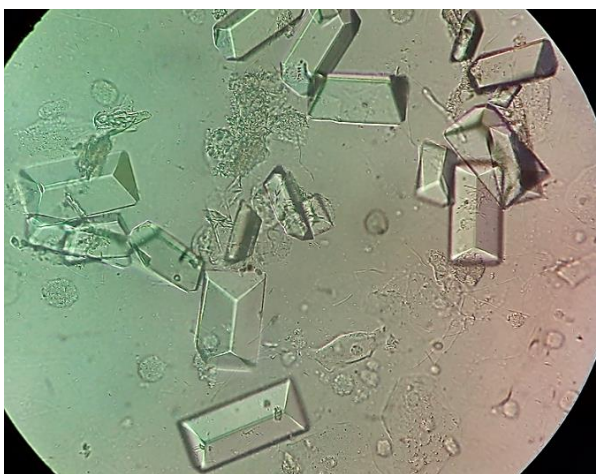


Figura 54. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosos cristais de fosfato triplo de amónio e magnésio.

GRANULAÇÕES AMORFAS

As granulações amorfas (fosfatos ou uratos amorfos, dependendo do pH) formam-se normalmente após a colheita, devido à refrigeração da amostra; podem também estar associadas a situações fisiológicas transitórias, não apresentando geralmente um significado clínico de relevância.

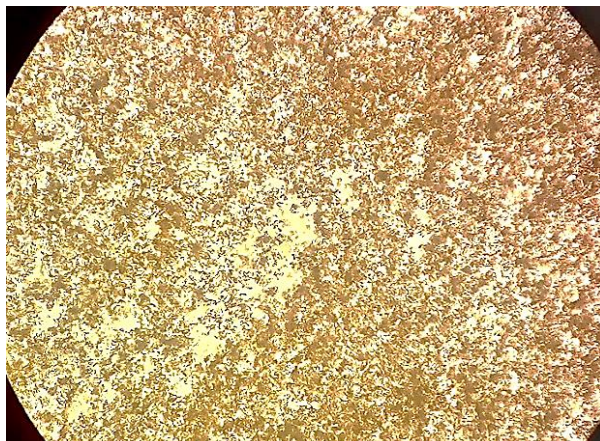


Figura 55. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas granulações amorfas.

CRISTAIS DE TIROSINA E CISTINA

A presença destes cristais possui sempre um significado clínico importante, estando geralmente associados a erros inatos do metabolismo dos aminoácidos.

Os cristais de cistina podem surgir em casos de cistinúria congênita, cistinose ou em casos de insuficiente reabsorção renal. Os cristais de tirosina aparecem em situações de tirosinose ou em doenças hepáticas graves.

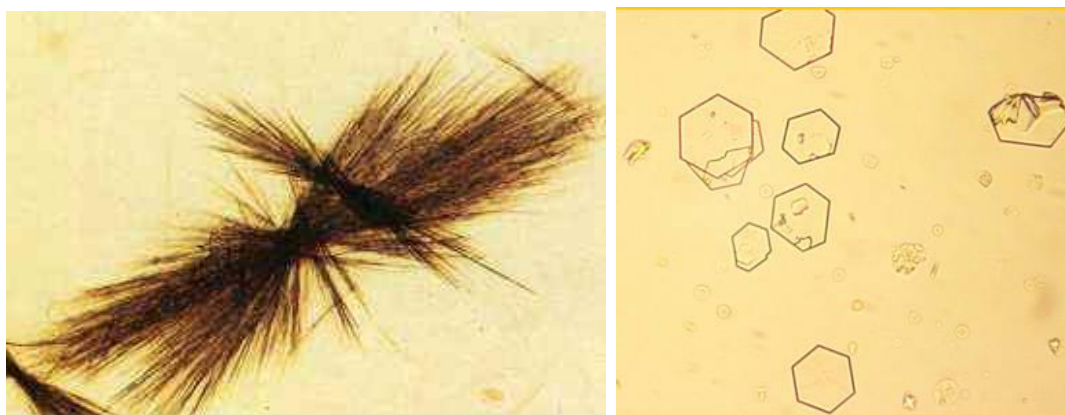


Figura 56. Cristais de tirosina (à esquerda) e de cistina (à direita). (Disponível em: <http://atlasdeurinalise.blogspot.pt/p/cristais-na-urina.html>).

MICRORGANISMOS

Como a urina é geralmente um produto estéril, a presença de numerosas bactérias em conjunto com leucocitúria é sugestiva de infecção urinária.

Leveduras, geralmente da espécie *Candida albicans*, podem também ser observadas na urina. O seu aparecimento deve-se normalmente à contaminação da amostra pela flora normal dos órgãos genitais, devendo, no entanto, referir-se a sua presença para averiguar se não se trata de uma candidíase vaginal. A sua presença pode também estar associada a infecções urinárias em pessoas diabéticas.

Deve ter-se ainda especial atenção para a presença do parasita *Trichomonas vaginalis*, que pode aparecer na urina, aquando uma infecção vaginal.



Figura 57. Observação microscópica do sedimento urinário na objetiva de 40x. Neste campo de visão é possível observar a presença de numerosas bactérias e leucócitos (rodeados a preto).

A análise sumária da urina corresponde a uma análise laboratorial bastante útil, principalmente na abordagem das patologias do trato urinário. No LPCMA, a patologia que observei em maior número foi a infecção urinária bacteriana, caracterizada pela presença de leucócitos e bactérias a nível do sedimento urinário. Para além disso, estas amostras de urina são maioritariamente positivas para nitritos, tendo em conta que o principal agente etiológico isolado no meio de cultura nas infeções do trato urinário (ITU) é a *Escherichia coli*.

7.3.3. URINAS BACTERIOLÓGICAS - INFEÇÃO DO TRATO URINÁRIO

A ITU corresponde a uma das patologias infecciosas mais frequentemente encontrada na prática clínica. A maioria das infeções urinárias agudas causada por bactérias da flora intestinal saprófita, ocorre por invasão do aparelho urinário por via ascendente, através da uretra.

A passagem da urina pela uretra durante a micção pode também arrastar os microrganismos que a colonizam, podendo conduzir a erros de interpretação da urocultura. Esta região possui uma flora microbiana residente que inclui *Difteroides*, *Streptococcus viridans*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus coagulase negativos*.

Os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos no desenvolvimento de uma ITU na comunidade e em ambiente hospitalar estão representados na tabela 52.

Tabela 52. Principais microrganismos envolvidos nas infecções do trato urinário de ambiente hospitalar e na comunidade em geral

Comunidade em geral	Ambiente hospitalar
<i>Escherichia coli</i> (causa cerca de 70-80% das ITU)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Proteus</i> spp.	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Candida</i> spp.

Abreviaturas: ITU, infecções do trato urinário.

EXAME DIRETO A FRESCO

Faz-se inicialmente a observação do sedimento urinário ao Mo, conforme o procedimento já descrito anteriormente.

EXAME CULTURAL

As urinas bacteriológicas são semeadas no meio de cultura UriSelect™ 4 devidamente identificado. Caso se tenha observado a presença de leveduras no exame microscópico do sedimento urinário, semeia-se a urina adicionalmente no meio de cultura CandiSelect™ 4.

MEIO DE CULTURA UTILIZADO

O meio UriSelect™ 4 é um meio cromogénico que permite a identificação direta de *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Enterococcus* spp.; uma identificação presuntiva dos microrganismos do grupo K.E.S.C. (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp.); e permite ainda orientar a identificação de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, tendo em conta a aparência das colónias, é possível fazer uma identificação direta ou presuntiva, orientando a suspeita para um tipo de microrganismo, sendo de seguida realizada a confirmação da ID e a realização dos respetivos TSA com recurso a painéis específicos, utilizando o equipamento *MicroScan WalkAway*.

Na figura 58 encontra-se a interpretação dos resultados obtidos neste meio cromogénico.

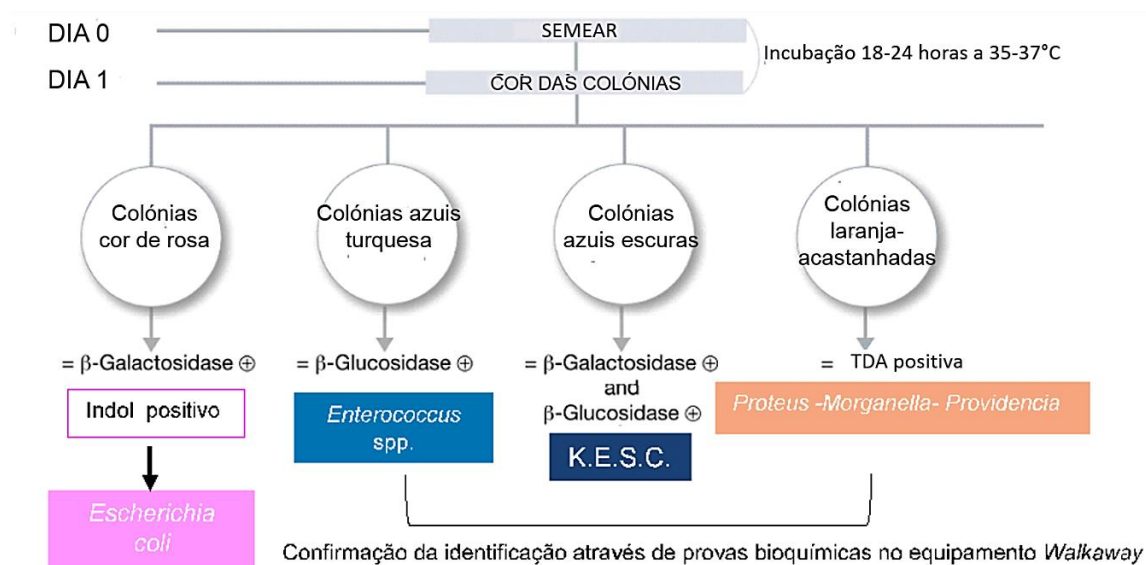


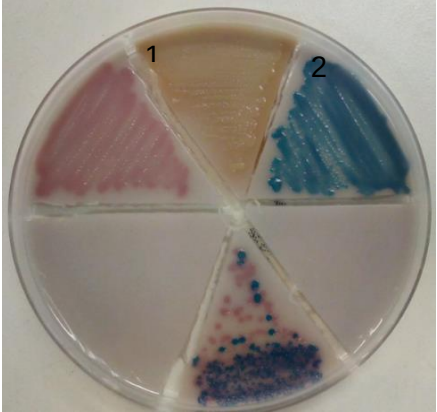
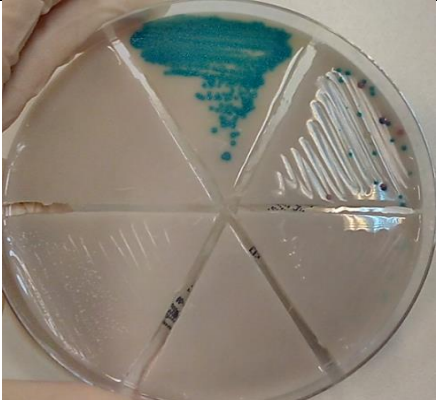
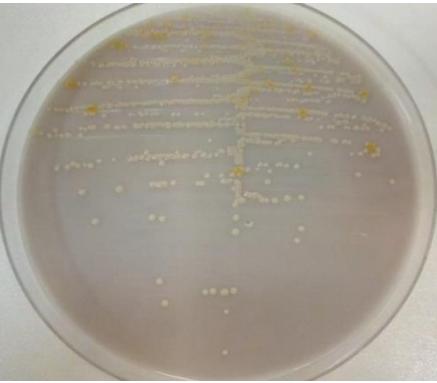
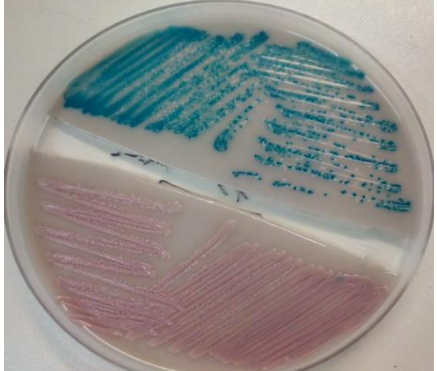
Figura 58. Interpretação dos resultados obtidos no meio de cultura UriSelect™4, de acordo com os substratos cromogénicos presentes no meio e a respetiva atividade enzimática. **Abreviaturas:** TDA, triptofano deaminase.

Na tabela seguinte encontra-se descrito o aspeto/cor e as características dos microrganismos mais frequentemente observados neste meio.

Tabela 53. Aspeto dos microrganismos mais frequentemente isolados neste meio e respetivos painéis MicroScan® utilizados na confirmação da identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos

Diferentes resultados obtidos no meio de cultura UriSelect™ 4	ID e/ou TSA
	A <i>Escherichia coli</i> apresenta-se neste meio sob a forma de colónias cor-de-rosa, sendo a confirmação da sua ID realizada pelo teste do indol. TSA - Painel MicroScan® 44

Continuação da tabela 53

Diferentes resultados obtidos no meio de cultura UriSelect™ 4	ID e/ou TSA
	- Os bacilos mucoides de cor acastanhada (1) induzem a suspeita de um <i>Proteus</i> spp., podendo também tratar-se de outro microrganismo com atividade TDA positiva. - A presença de bacilos Gram-negativos mucoides de cor azul (2) origina a suspeita de um microrganismo do grupo K.E.S.C. ID e TSA - MicroScan® 69
	Os cocos de cor azul-turquesa, de tamanho pequeno, induzem a suspeita de um <i>Enterococcus</i> spp. ID e TSA - MicroScan® 42
	A presença de cocos Gram-positivos de cor esbranquiçada/amarelada é sugestiva de um <i>Staphylococcus aureus</i>. Pode realizar-se uma prova da catalase que ajuda na orientação da ID. ID e TSA - MicroScan® 42
	As colónias de aspeto esbranquiçado/rosado neste meio são características de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>. ID e TSA - MicroScan® 42

Abreviaturas: ID, identificação; TDA, triptofano deaminase; TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os critérios de avaliação microbiológica do crescimento bacteriano na urina são dependentes de vários fatores da história clínica do paciente, incluindo a sintomatologia, a antibioterapia e a presença de fatores externos, como a algaliação. Para além disso, cerca de 20% dos pacientes apresentam colonização da mucosa vaginal e da região periuretral por Enterobactérias, tornando-se importante realizar para além da ID de bactérias uropatogénicas, a avaliação das UFC/mL, já que os microrganismos colonizantes se apresentam normalmente associados a baixas contagens.

Assim, após incubação do meio de cultura, observa-se o crescimento e realiza-se a contagem das colónias presentes (tabela 54). A interpretação do crescimento bacteriano deve ser realizada em simultâneo com os dados clínicos existentes, histórico do paciente e de acordo com os resultados obtidos no exame microscópico direto do sedimento urinário.

Tabela 54. Critérios de classificação das contagens de colónias nas amostras de urina semeadas no meio de cultura UriSelect™4

Número de colónias	Contagem UFC/mL
1 – 10	$10^3 - 10^4$
10 – 100	$10^4 - 10^5$
>100	$>10^5$

Abreviaturas: UFC, unidades formadoras de colónias.

As diversas situações clínicas que podem surgir e a respetiva interpretação encontram-se descritas na tabela 55.

Tabela 55. Diversas situações clínicas possíveis e a respetiva interpretação clínica

Situação	Interpretação clínica
Crescimento > 10⁵ UFC/mL	- Valoriza-se o crescimento em cultura pura de um único agente potencialmente patogénico, no máximo 2, devendo encontrar-se associado a um sedimento urinário de infeção. - Provável infeção urinária.
Crescimento entre 10⁴ - 10⁵ UFC/mL	- Em condições em que a informação clínica o justifique, valorizam-se contagens de 10⁴-10⁵ UFC/mL de um provável agente patogénico em cultura pura, se em simultâneo com um sedimento urinário de infeção. Se não existir leucocitúria, considera-se que se trata de um possível contaminante. - Se não existir informação clínica acerca do paciente, deve relatar-se a presença do microrganismo e indicar a sua contagem, solicitando nova colheita no boletim analítico.

Continuação da **tabela 55**

Situação	Interpretação clínica
Flora polimorfa de contaminação UFC/mL < 10⁴	- Crescimento de 2 ou mais tipos de bactérias – reportar FPC. - Pode tratar-se de uma contaminação fecal ou génito-urinária devido a uma má realização da colheita da amostra. - Solicita-se uma nova colheita no boletim analítico em casos de FPC em conjunto com um sedimento urinário de infeção.
Situações específicas	- Considera-se que possa existir uma infeção urinária por mais do que uma espécie bacteriana em pessoas com o sistema imunitário debilitado e/ou pessoas algaliadas. Nestes casos deve reportar-se o crescimento bacteriano observado, realizando-se a ID e os TSA para um máximo de 2 bactérias. - Para pessoas com o sistema imune fraco pode valorizar-se o crescimento bacteriano sem leucocitúria associada.

Abreviaturas: FPC, flora polimorfa de contaminação; ID, identificação; TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos; UFC, unidades formadoras de colónia.

7.4. TRATO GENITAL FEMININO

A flora vaginal normal é constituída por uma grande quantidade de microrganismos, sendo que 90% correspondem a lactobacilos. Estes são muito importantes, na medida em que são responsáveis pela acidificação e equilíbrio da flora vaginal, impedindo a colonização da região por outras bactérias e/ou fungos potencialmente patogénicos. Os vários microrganismos que colonizam o trato genital feminino, que podem ser contaminantes ou potencialmente patogénicos, estão representados na tabela 56.

Tabela 56. Microrganismos associados à flora comensal microbiana do trato genital feminino

Microrganismos da flora comensal vaginal	
Prováveis contaminantes	Potencialmente patogénicos
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Difteroides</i>	<i>Candida</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
	<i>Mycoplasma hominis/Ureaplasma urealyticum</i>

Uma infeção do trato genital feminino pode ocorrer essencialmente por ação de microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro (tabela 56), ou por aquisição de agentes microbianos patogénicos por via sexual (tabela 57); ambas as situações conduzem a um desequilíbrio da flora comensal vaginal.

Tabela 57. *Microrganismos envolvidos nas infecções do trato genital feminino através de transmissão por via sexual*

Microrganismos transmitidos por via sexual
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>

7.4.1. EXSUDADO VAGINAL

COLHEITA

Na posição ginecológica, introduz-se a zaragatoa no endocolo vaginal. De seguida, colhe-se o exsudado das paredes vaginais através de movimentos rotativos, repetindo-se o procedimento 2 vezes. Uma das zaragatoas é colocada em meio de *Stuart* e a outra em tubo com soro fisiológico para a realização do exame a fresco.

EXAME DIRETO A FRESCO

No exame microscópico “a fresco” realiza-se a semi-quantificação de leucócitos, células epiteliais, GV e a pesquisa de formas leveduriformes e filamentosas de fungos. Deve prestar-se especial atenção à presença do parasita móvel *Trichomonas vaginalis*.

EXAME DIRETO APÓS COLORAÇÃO DE GRAM

O principal objetivo é verificar a presença de diplococos Gram-negativos intracelulares, sugestivos da presença de *Neisseria gonorrhoeae*.

EXAME CULTURAL

O exame cultural de um exsudado vaginal inclui a sementeira em gelose de sangue (GS), gelose de chocolate (GC) e no meio CandiSelect™ 4.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A presença de uma flora polimorfa não é valorizada, devido à flora comensal do trato genital feminino. No entanto, a presença de microrganismos da flora comensal em cultura pura e elevada densidade deve ser valorizada, seguindo-se o procedimento de ID e TSA com o painel apropriado, tendo em conta o microrganismo suspeito. Na tabela 58 encontram-se as características dos principais microrganismos isolados neste produto biológico, e na figura 59 alguns exemplos de diferentes crescimentos nos meios de cultura utilizados.

Tabela 58. Características dos principais microrganismos isolados nos diferentes meios de cultura utilizados para a sementeira do exsudado vaginal

Gelose sangue	Gelose chocolate	CandiSelect™ 4
Presença de colónias pequenas β -hemolíticas em cultura pura e em grande número. Teste da catalase negativa. - Suspeita de <i>Streptococcus agalactiae</i> : Painel MicroScan® 42.	Presença de colónias pequenas e transparentes que não crescem no meio de GS por serem fastidiosas. Presença de diplococos Gram-negativos no Gram. Teste da oxidase positivo. - Suspeita de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	Presença de colónias cor-de-rosa/roxas: identificação direta de <i>Candida albicans</i> . Presença de colónias azuladas: identificação presuntiva de <i>Candida</i> spp.

Abreviaturas: GS, gelose de sangue.

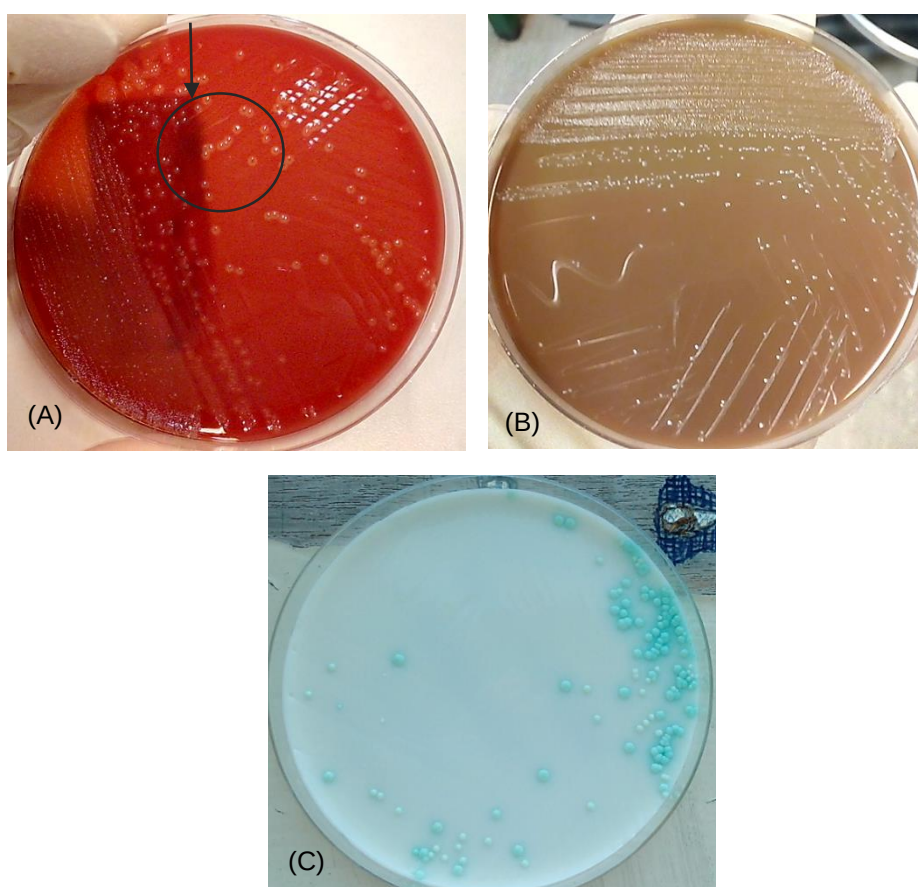


Figura 59. Exsudado vaginal: (A) Presença de colónias β -hemolíticas no meio de gelose de sangue (rodeadas a preto) (B) Aparecimento de colónias de tamanho pequeno em gelose de chocolate (da mesma amostra) (C) Presença de colónias azuis em meio CandiSelect™, permitindo apenas a realização de uma identificação presuntiva (*Candida* spp.).

7.4.2. EXSUDADO VAGINAL E PERIANAL NA GRÁVIDA

O *Streptococcus agalactiae* é responsável por graves infecções no recém-nascido, colonizando muitas vezes o trato gastrointestinal e genital de mulheres grávidas saudáveis, tornando-se a sua detecção a nível vaginorretal particularmente útil na prevenção da sépsis e meningite neonatal provocadas por este microrganismo. De forma a evitar a contaminação materno-fetal durante o parto, a DGS recomenda a realização do rastreio de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B a todas as grávidas entre a 35ª e 37ª semana de gestação, através da colheita de uma amostra única de exsudado vaginal e retal.

Para a realização desta pesquisa utiliza-se o caldo de Granada™ bifásico, e em caso de cultura positiva (aparecimento de um alo laranja), as grávidas são referenciadas para a realização da respetiva profilaxia antimicrobiana.



Figura 60. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* – resultado positivo.

7.5. TRATO GENITAL MASCULINO

As uretrites são infecções com sintomatologia mais marcada no homem, servindo a avaliação do exsudado uretral de auxiliar de diagnóstico nalgumas infecções genitais, principalmente masculinas.

A uretra masculina contém normalmente poucos microrganismos comensais, incluindo aqueles encontrados na pele, tais como *Staphylococcus coagulase negativos*, *Micrococcus* spp. e *Corynebacterium* spp, e alguns potencialmente patogénicos, como *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp.

No LPCMA a pesquisa é orientada essencialmente para a detecção de *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp., *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp.

7.5.1. EXSUDADO URETRAL

COLHEITA

A colheita do exsudado uretral deve ser realizada antes da primeira micção da manhã, inserindo a zaragatoa no orifício uretral com um movimento de rotação, de forma a colher algumas células epiteliais. As zaragatoas são de seguida colocadas no meio de *Stuart* e no tubo com soro fisiológico.

EXAME DIRETO A FRESCO

O exame direto a fresco do exsudado uretral é semelhante ao que se realiza para o exsudado vaginal, devendo prestar-se especial atenção à presença de *Trichomonas vaginalis* e formas leveduriformes.

EXAME DIRETO APÓS COLORAÇÃO DE GRAM

Utilizado com o mesmo objetivo que no exsudado vaginal.

EXAME CULTURAL

O exsudado uretral é semeado em GS, GC e no meio de cultura CandiSelect™ 4, tendo em conta os possíveis agentes patogénicos.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Aquando a leitura das placas, valoriza-se a presença de microrganismos que se encontrem em elevada concentração e em cultura pura. Quando crescem bactérias da flora genital normal masculina deve relatar-se a sua presença como sendo da microbiota genital.

No LPCMA, o exame cultural do exsudado uretral, está orientado essencialmente para a pesquisa de *Candida* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, cujo aspeto nos meios de cultura já foi referido anteriormente.

7.5.2. PESQUISA DE MYCOPLASMA E UREAPLASMA UROGENITAIS

O *Mycoplasma hominis* e o *Ureaplasma* spp. são conhecidos coletivamente como micoplasmas genitais. Estes microrganismos colonizam as superfícies mucosas do trato génito-urinário, causando infeções invasivas em pessoas suscetíveis e infeções por desequilíbrio ao nível da flora bacteriana normal, inclusive no trato genital feminino.

Assim, como fazem parte da microbiota genital normal, as culturas para o seu isolamento necessitam de ser quantitativas, considerando-se apenas como clinicamente significativo se existirem contagens $\geq 10^4$ UFC.

A pesquisa destes agentes patogênicos é apenas efetuada mediante pedido específico por parte do clínico, sendo os produtos utilizados geralmente a zaragatoa uretral ou cervicovaginal.

IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS UROGENITAIS

Durante o estágio, para a pesquisa destes microrganismos utilizou-se a galeria *Mycoplasma IST 2*, que permite a realização simultânea da cultura, identificação, contagem de UFC e a realização dos TSA, associando um caldo de cultura seletivo a uma galeria que contém 22 testes.

O caldo fornece condições ótimas para o crescimento dos micoplasmas, e a presença de substratos específicos para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis* na galeria, juntamente com o indicador vermelho de fenol permite, em caso de cultura positiva para um deles, visualizar uma mudança de cor do caldo, de amarelo para alaranjado/vermelho.

Após sementeira, o caldo é distribuído pelas diferentes cúpulas, e a galeria é incubada na estufa a 37°C durante 48 horas.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A leitura do caldo seletivo é realizada às 24 e 48 horas após incubação e a leitura das cúpulas é realizada após 24 horas unicamente para a contagem de *Ureaplasma* spp. e às 24 e 48 horas para as restantes cúpulas (figura 61).



Figura 61. Exemplo dos resultados da incubação de uma galeria após 48 horas. Neste caso é possível verificar a presença de um resultado negativo para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis*, pois não ocorreu mudança de cor em nenhuma das cúpulas.

7.6. INFEÇÕES DA PELE E TECIDOS MOLES

Apesar de possuir múltiplos fatores de proteção, a pele é o órgão mais acessível do corpo humano, correspondendo a um dos locais mais facilmente traumatizável e, portanto, frequentemente sujeito a infecção. Entre os principais fatores de proteção encontra-se a presença de uma flora microbiana normal que compete com os possíveis agentes

patogênicos. Os principais microrganismos associados à colonização da pele encontram-se na tabela 59.

Tabela 59. Alguns dos microrganismos pertencentes à flora normal da pele

Flora comensal da pele – prováveis “contaminantes”	
<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>	<i>Difteroides</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Streptococcus viridans</i>
<i>Candida</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

Muitas são as situações clínicas e muitos são os respectivos microrganismos responsáveis por infecções cutâneas localizadas que conduzem à formação de exsudados purulentos. Ao LPCMA chegam principalmente exsudados purulentos provenientes de lesões superficiais e de queimaduras infetadas, que são causadas maioritariamente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* spp., membros das *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.) e *Pseudomonas aeruginosa*.

7.6.1. EXSUDADO PURULENTO

COLHEITA

Para a colheita de exsudados provenientes de lesões abertas, separam-se as margens da ferida e insere-se uma zaragatoa, o mais profundamente possível, colhendo o material purulento existente. Utilizam-se normalmente 2 zaragatoas, que se encontram esterilizadas e são colocadas posteriormente no meio de transporte *Stuart*.

É importante que a colheita seja efetuada de forma adequada, para evitar a presença de “contaminantes” da pele, que podem dificultar a interpretação dos resultados.

EXAME DIRETO APÓS COLORAÇÃO

Realiza-se um esfregaço do produto, para posterior observação com coloração de *Gram*.

EXAME CULTURAL

Os exsudados purulentos que chegam ao laboratório são semeados no meio de GS e GC. São ainda semeados no meio cromogénico UriSelect™4, de forma a facilitar a ID dos bacilos Gram-negativos.

Após incubação, realiza-se a leitura do crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura, e se ocorrer o crescimento de colónias suspeitas realiza-se a respetiva ID e os TSA através da inoculação no painel *MicroScan*® apropriado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Neste tipo de amostra biológica é valorizada a presença de até 3 estirpes bacterianas diferentes. Deve valorizar-se o crescimento bacteriano de estirpes que tenham grande probabilidade de serem agentes patogénicos, independentemente do número presente, como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Geralmente não se valoriza o crescimento de microrganismos que fazem parte da microbiota da pele, sendo assim prováveis agentes contaminantes. Nalguns casos excecionais, se estes microrganismos forem isolados em cultura pura, em grande quantidade e se forem observados no exame direto, devem ser valorizados como possíveis agentes patogénicos.

7.7. TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

As infeções do trato respiratório superior (TRS) são as mais comuns no ser humano, sendo geralmente autolimitadas, de etiologia vírica e com resolução espontânea. Podem, no entanto, ser de origem bacteriana, exigindo nesses casos o tratamento com antibióticos.

O TRS possui uma flora comensal microbiana mista e abundante (tabela 60), que sobrevive geralmente em situações de equilíbrio com o hospedeiro, prevenindo dessa forma a aquisição de microrganismos patogénicos exógenos. No entanto, a flora normal poderá tornar-se patogénica, em situações de defesa imunológica diminuída ou lesão.

Tabela 60. Principais microrganismos da flora bacteriana residente do trato respiratório superior

Microrganismos da flora do trato respiratório superior			
Prováveis “contaminantes”		Potencialmente patogénicos	
<i>Difteroides</i>	<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
		<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>

Os microrganismos potencialmente patogénicos podem constituir uma flora transitória de colonização ou estarem presentes em pequeno número no TRS de indivíduos saudáveis, não indicando deste modo obrigatoriamente a presença de infeção.

Assim, o conhecimento da flora microbiana normal do TRS é fundamental para a interpretação dos resultados obtidos nos diferentes meios de cultura, devendo distinguir-se colonização de infeção através da adequação da amostra.

7.7.1. EXSUDADO NASAL

COLHEITA

Inserir uma zaragatoa em cada narina até se encontrar resistência e colher o produto em movimentos rotativos suaves contra a mucosa nasal. Colocar ambas as zaragatoas no meio de transporte *Stuart*.

PESQUISA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINA RESISTENTE

O exsudado nasal é utilizado principalmente para fins epidemiológicos, no rastreio de portadores de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA).

Sendo assim, quando existe um pedido específico para a pesquisa deste microrganismo, semeia-se o exsudado nasal no meio cromogénico MRSASelect™ 4.

A sua identificação é realizada quando ocorre o crescimento de colónias cor-de-rosa neste meio de cultura, permitindo uma identificação direta deste microrganismo (figura 62).

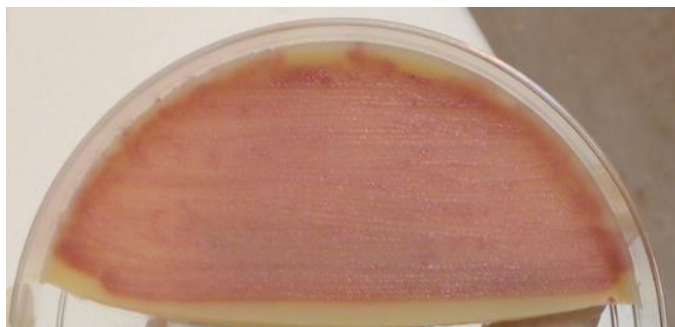


Figura 62. Cultura positiva para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente no exsudado nasal, em meio de MRSASelect™4.

EXAME BACTERIOLÓGICO

No exsudado nasal com pedido de exame bacteriológico, a pesquisa é essencialmente direcionada para a presença de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, estando todos eles associados à flora microbiana normal do TRS.

A presença de cultura pura de um destes microrganismos obtida a partir de um exsudado nasal, está principalmente associada a situações de sinusite bacteriana. A sinusite bacteriana é frequentemente de origem endógena, isto porque, os seios paranasais, normalmente sem flora microbiana residente em indivíduos saudáveis, encontram-se em contacto direto com a cavidade nasal, tornando esta zona suscetível a infeções por microrganismos habitantes do TRS.

EXAME CULTURAL

Um exsudado nasal com pedido de exame bacteriológico, é semeado nos meios de GS e GC. Quando ocorre a cultura positiva pura com elevada concentração de um dos microrganismos referidos anteriormente, é realizada a ID e os TSA utilizando os respectivos painéis de identificação.

PESQUISA DE EOSINÓFILOS

Para a pesquisa de eosinófilos no exsudado nasal procede-se à coloração de *Wright* de duas lâminas contendo o exsudado nasal da narina direta e esquerda.

De seguida, realiza-se a observação ao Mo (objetiva de imersão - 100x) de ambas as lâminas para verificar a presença ou ausência de eosinófilos.

Esta pesquisa é geralmente utilizada como exame complementar no diagnóstico de rinite alérgica.

7.7.2. EXSUDADO FARÍNGEO

A nível da orofaringe, o microrganismo de maior interesse é o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), um dos principais responsáveis por infeções respiratórias altas, nomeadamente, a faringite e a amigdalite. Normalmente, ao contrário da faringite viral, a faringite bacteriana está associada à presença de pus a nível da garganta.

Para além do *Streptococcus pyogenes* existem outras bactérias que podem causar, menos frequentemente, uma faringite bacteriana, como é o caso de *Neisseria Gonorrhoeae* ou *Corynebacterium diphtheriae*. No LPCMA, o diagnóstico de faringite bacteriana direciona-se essencialmente para a pesquisa de *Streptococcus pyogenes*.

COLHEITA

A colheita da amostra é realizada com uma zaragatoa esterilizada, efetuando-se a recolha do material existente ao nível da faringe posterior e amígdalas, evitando tocar com a zaragatoa nas mucosas da parede oral, colocando-se a zaragatoa em meio de *Stuart*.

EXAME BACTERIOLÓGICO

O exsudado faríngeo é apenas semeado em meio de GS, para a pesquisa específica de *Streptococcus pyogenes*.

Após leitura das placas, se a cultura se apresentar positiva (colónias pequenas com β -hemólise), é realizada a confirmação da ID e os TSA recorrendo ao painel *MicroScan*® 42.

PESQUISA RÁPIDA DE STREPTOCOCCUS DO GRUPO A

Tendo em conta o contexto em que o LPCMA se encontra inserido, são rececionados alguns pedidos para pesquisa de *Streptococcus* do grupo A, requisitando o clínico muitas vezes a realização de um teste rápido em vez de um exame cultural, que geralmente necessita de 24 a 48 horas para evidenciar uma cultura positiva.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste *bioNexia*® *Strep A Plus*, utilizado no laboratório, permite um diagnóstico fácil e rápido de uma amigdalite ou faringite estreptocócica do grupo A, reduzindo assim a probabilidade da ocorrência de sintomas mais graves e também de complicações adicionais, como a febre reumática e a glomerulonefrite.

Esta prova corresponde a um teste imunocromatográfico rápido que permite a deteção qualitativa do antigénio estreptocócico do grupo A presente na amostra, devendo ser realizada logo após a colheita desta. O aparecimento simultâneo de uma linha colorida na zona teste (T) e na zona de controlo (C) é indicativo de um teste positivo (figura 63).

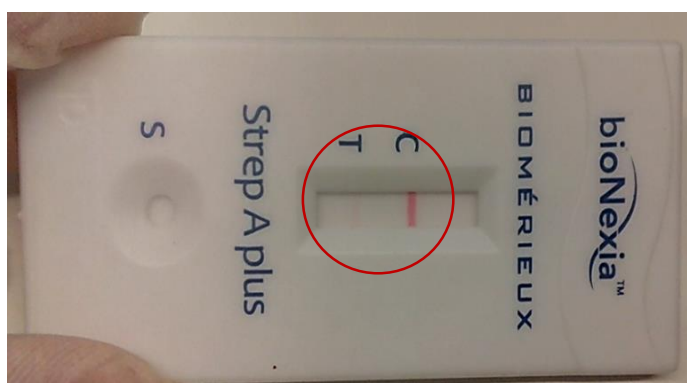


Figura 63. Exemplo de uma cassette do teste rápido *bioNexia*® *Strep A Plus*, em que é possível visualizar um resultado que apesar de ténue, é considerado positivo para a pesquisa de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A.

7.8. TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR

Geralmente, esta fração do nosso organismo é praticamente estéril, não possuindo uma flora microbiana residente devido à presença de diversos mecanismos de defesa. Os microrganismos conseguem alcançar esta região normalmente estéril, essencialmente pela aspiração de secreções da orofaringe ou pela inalação de aerossóis contendo bactérias patogénicas.

A amostra representativa do trato respiratório inferior (TRI) mais frequentemente rececionada no LPCMA é a expetoração. No entanto, a sua utilização torna-se por vezes complicada devido à grande probabilidade de contaminação da amostra pela flora comensal do TRS durante a colheita, que muitas vezes se encontra colonizado por

microrganismos potencialmente patogênicos, dificultando dessa forma o processo de valorização clínica.

Os microrganismos mais frequentemente associados a uma infecção do TRI adquirida na comunidade ou a nível hospitalar encontram-se mencionados na tabela 61.

Tabela 61. Microrganismos mais frequentemente associados a infecções do trato respiratório inferior

MICROORGANISMOS	
Comunidade	Hospital
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

7.8.1. EXPETORAÇÃO

COLHEITA

Deve colher-se a 1ª expetoração da manhã, por expulsão através da tosse, para um recipiente estéril, realizando a higiene oral apenas com água. É de extrema importância evitar a sua mistura com saliva, de forma a diminuir a contaminação com bactérias e células epiteliais que podem comprometer a qualidade da amostra.

EXAME DIRETO APÓS COLORAÇÃO DE GRAM

Para o exame direto, efetua-se o espalhamento de uma porção purulenta da amostra na lâmina e realiza-se a coloração de *Gram*, sendo a preparação observada na objetiva de 10x. Para avaliar a “qualidade” da amostra, deve ter-se em conta a proporção entre o número de células epiteliais e leucócitos. Uma amostra considerada de “qualidade” e representativa de um processo infeccioso é aquela que possui elevado número de leucócitos e poucas células epiteliais. O critério de aceitação da amostra é efetuado segundo a classificação de *Murray e Washington*, como mostra a tabela 62.

As amostras pertencentes aos grupos 4 e 5 são aceites, sendo semeadas e o diagnóstico prossegue. As amostras que se enquadrem nos grupos 1, 2 e 3 são rejeitadas e é pedida a colheita de nova amostra.

Tabela 62. Classificação da qualidade da expetoração segundo Murray e Washington

Grupo	Células epiteliais (10x)	Leucócitos (10x)
1	≥ 25	≤ 10
2	≥ 25	10 - 25
3	≥ 25	≥ 25
4	10 – 25	≥ 25
5	<10	≥ 25

Disponível em: www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf

EXAME CULTURAL

Utiliza-se uma porção purulenta da amostra para semear nos meios de GS e GC. Pode ainda ser útil semear no meio UriSelect™ 4, para uma identificação facilitada de bacilos Gram-negativos.

Após leitura do meio de cultura, se existirem colónias suspeitas em superioridade à restante flora, é realizada a ID e o antibiograma dessas colónias no equipamento *MicroScan WalkAway*.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As características em GS e GC dos principais microrganismos que tive a oportunidade de visualizar nas amostras de expetoração encontram-se na tabela 63.

Tabela 63. Características dos principais microrganismos encontrados na expetoração durante a realização do estágio

Microrganismo suspeito	Características em GS e GC
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GS: Presença de colónias com α -hemólise em superioridade em relação aos restantes microrganismos.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Aparecimento de colónias que crescem em GC, mas que não aparecem em GS.

Abreviaturas: GC, gelose de chocolate; GS, gelose de sangue.

A valorização do crescimento bacteriano deve ter em atenção a contaminação inerente à passagem da expetoração pelo TRS. A presença de uma flora polimorfa sem evidente predominância de um dos microrganismos não é de valorizar (figura 64).

No LPCMA todas as expetorações com pedido de exame bacteriológico são também sujeitas à pesquisa do Bacilo de Koch (BK) por exame direto.



Figura 64. Expetoração: aparecimento de uma flora polimorfa em meio de gelose de sangue, sem evidenciar nenhum tipo de bactéria em específico – flora polimorfa de contaminação inerente à passagem pelo trato respiratório superior.

7.8.2. PESQUISA DO BACILO DE KOCH

BK DIRETO

É realizado o exame direto a partir do esfregaço em lâmina, obtido por estiramento e feito em duplicado. Os esfregaços são efetuados utilizando a fração purulenta da amostra, sendo depois fixados à chama. Um deles é utilizado para efetuar a coloração de ZN e o outro é armazenado para o caso de ser necessário posteriormente.

COLORAÇÃO DE ZN

A baciloscopia da expetoração pela coloração de ZN é um método de extremo valor no diagnóstico de tuberculose pulmonar, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*.

É ainda importante referir que existem outros BAAR para além do *Mycobacterium tuberculosis*, pelo que um resultado baciloscópico positivo não é exatamente sinónimo de tuberculose, assim como um exame direto negativo não significa necessariamente que o exame cultural será negativo para micobactérias.

BK CULTURAL

A pesquisa específica do BK é efetuada quando o clínico pede um exame cultural para a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*.

Antes de efetuar a sementeira no meio de cultura apropriado, é necessário proceder à descontaminação e à neutralização da amostra, de forma a eliminar a flora normal

associada à expectoração e libertar as micobactérias aprisionadas. No final, procede-se à concentração da amostra por centrifugação de forma a obter o sedimento que vai ser utilizado para semear no meio de cultura Lowenstein-Jensen.

O meio incuba na estufa a 37°C durante o período máximo de 72 dias. Uma cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis* caracteriza-se pela presença de colónias com o aspeto característico de couve-flor.

7.9. TRATO GASTROINTESTINAL

As amostras analisadas para o diagnóstico de infeções gastrointestinais são as fezes, sendo que os sintomas mais comuns associados a este tipo de infeção incluem as dores abdominais, vômitos, diarreia e por vezes a febre.

A deteção dos microrganismos patogénicos entéricos é dificultada pela presença de microflora fecal abundante e complexa (tabela 64), pelo que durante a interpretação do exame bacteriológico é importante ter a noção dos microrganismos comensais intestinais, de forma a perceber em que situação se deve valorizar a presença de uma determinada bactéria. No sentido de isolar as bactérias patogénicas do trato gastrointestinal usam-se caldos de enriquecimento e meios seletivos/diferenciais.

Tabela 64. Microrganismos pertencentes à flora comensal do trato gastrointestinal

Flora comensal do trato gastrointestinal	
<i>Escherichia coli</i> não patogénica	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>	<i>Proteus</i> spp.
<i>Bacteróides</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp.	

Os principais microrganismos causadores de infeções do trato gastrointestinal são aqueles que possuem uma maior capacidade de resistência à passagem pelo ácido estomacal. Para além disso, estas bactérias possuem fatores de virulência que são responsáveis por causar os sintomas típicos de uma infeção intestinal.

Assim, os principais agentes etiológicos das infeções intestinais incluem a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC).

7.9.1. COPROCULTURA

No LPCMA as coproculturas são direcionadas principalmente para o diagnóstico de infecções intestinais causadas por *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., utilizando-se para isso em primeiro lugar o caldo de enriquecimento Selenito-Cistina e depois, para a subcultura, os meios seletivos e diferenciais *Salmonella-Shigella* (SS) e xilose-lisina-desoxicolato (XLD) (figura 65). Antes do exame cultural, efetua-se um exame macroscópico às fezes para avaliar a consistência e a presença de muco, pus ou sangue.

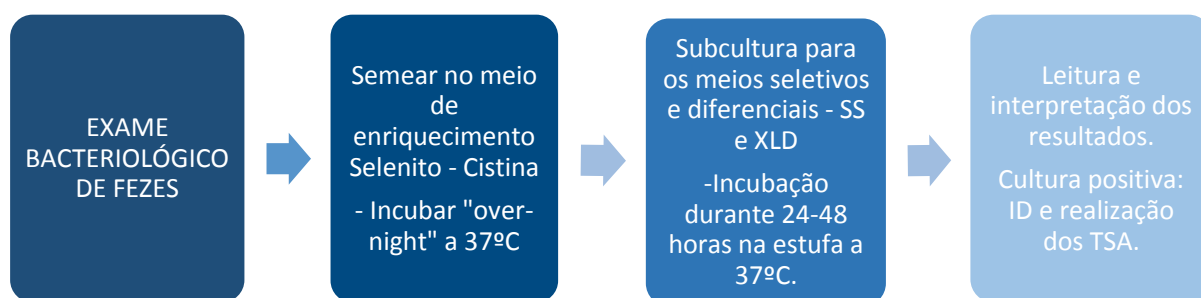


Figura 65. Fluxograma que ilustra os diferentes passos da realização de um exame cultural de fezes.

Abreviaturas: ID, identificação, TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos; SS, *Salmonella-Shigella*; XLD, xilose-lisina-desoxicolato.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Existindo um exame cultural positivo, depois do isolamento bacteriano, procede-se à ID e realização dos respectivos TSA das colônias suspeitas, utilizando o painel *MicroScan*® 69. As características dos principais microorganismos isolados nas fezes encontram-se descritas na tabela 65.

Tabela 65. Características das colônias suspeitas no meio de *Salmonella-Shigella* e xilose-lisina-desoxicolato

Meios de cultura	
Meio SS	Meio XLD
As colônias suspeitas apresentam-se como incolores (lactose negativas), com ou sem centro negro.	As colônias suspeitas apresentam-se como colônias avermelhadas, com ou sem centro negro.
Com centro negro – <i>Salmonella</i> spp.	Sem centro negro – <i>Shigella</i> spp.

Abreviaturas: SS, *Salmonella-Shigella*; XLD, xilose-lisina-desoxicolato.

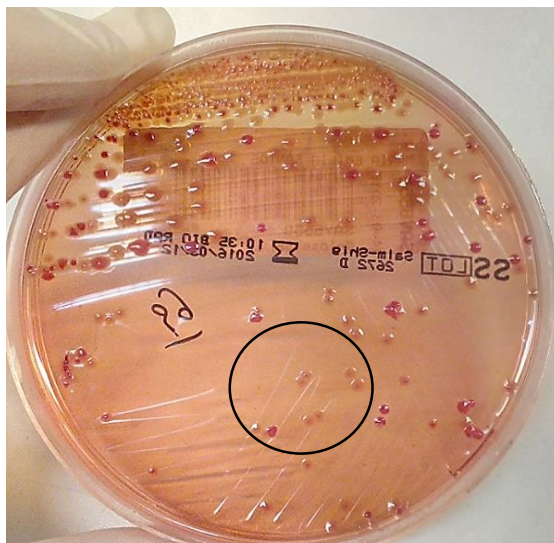


Figura 66. Aparecimento de colônias suspeitas no meio de *Salmonella-Shigella* – rodeadas com o círculo preto (lactose negativas, incolores e sem centro negro – possível *Shigella* spp.).

7.9.2. PESQUISA DE SANGUE OCULTO NAS FEZES

A pesquisa de sangue oculto (PSO) nas fezes é útil para a identificação de lesões do tubo gastrointestinal que cursam sem sangramento clinicamente visível, como úlceras gástricas, pólipos e algumas parasitoses, sendo também utilizada para o rastreio do cancro colorretal. Existem ainda algumas situações benignas que conduzem ao aparecimento de sangue nas fezes, como hemorroidas e fístulas anais.

O rastreio do cancro colorretal aumenta a sua detecção numa fase precoce, reduzindo desta forma a mortalidade associada a esta patologia. Assim, é recomendada a realização deste teste de forma anual a todos os indivíduos a partir dos 45 anos.

INTERPRETAÇÃO CLÍNICA

O teste *SD BIOLINE FOB* é um teste imunocromatográfico rápido utilizado para a detecção qualitativa de sangue oculto em fezes humanas, utilizando como material de captura e detecção Ac monoclonais específicos contra a Hb humana.

Uma banda de controlo (C) colorida deverá aparecer sempre, de forma a garantir que o teste e os respetivos reagentes estão a funcionar corretamente.

Um resultado positivo é indicado pela presença simultânea da banda de teste (T) e da banda de controlo (C) (figura 67).



Figura 67. Exemplo de um resultado positivo para a presença de hemoglobina nas fezes.

7.9.3. EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

Os parasitas intestinais incluem um amplo grupo de microrganismos, dos quais os helmintas e os protozoários são os mais representativos. A principal forma de transmissão destes parasitas é a via fecal-oral, a partir da água ou alimentos contaminados, sendo a sua prevalência variável consoante as condições higieno-sanitárias e climatéricas da zona geográfica considerada. A infeção parasitária por *Giardia lamblia* é a mais frequentemente encontrada em Portugal.

EXAME MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO DAS FEZES

O exame parasitológico inclui inicialmente o exame macroscópico das fezes, em que se deve observar a sua consistência e verificar a eventual presença de elementos anormais como muco, sangue e ainda a presença de elementos parasitários visíveis macroscopicamente, como por exemplo formas adultas de vermes.

Para a realização do exame microscópico recomenda-se a utilização de métodos de concentração. Durante o estágio, o método de concentração utilizado foi o método de sedimentação simples qualitativo, em que se realiza uma suspensão de fezes em soro fisiológico, com posterior filtração por gaze. Depois deste processo, espera-se que ocorra a sedimentação espontânea, utilizando-se o sedimento para o exame direto ao Mo.

A observação microscópica dos elementos parasitários presentes no sedimento deve ser realizada inicialmente na objetiva de 10x, sendo a identificação das estruturas suspeitas efetuada na objetiva de 40x.

Deve ter-se em atenção que existem partículas que aparecem nas fezes e que se podem assemelhar com alguns cistos ou ovos de parasitas, como é o caso dos grãos de pólen (figura 68). Durante o estágio tive a oportunidade de visualizar ovos de *Enterobius vermicularis* (figura 69) e cistos de *Giardia lamblia*.

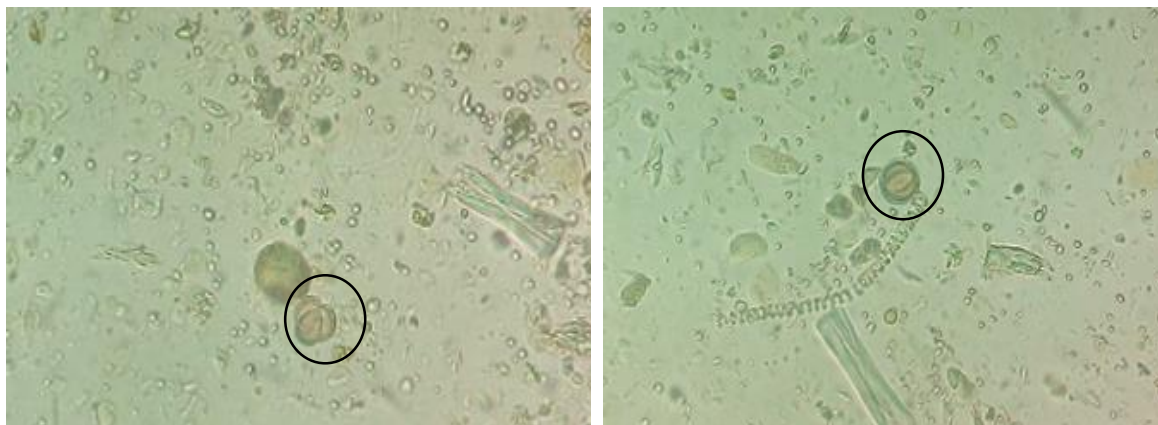


Figura 68. Presença de grãos de pólen nas fezes (rodeados a preto).

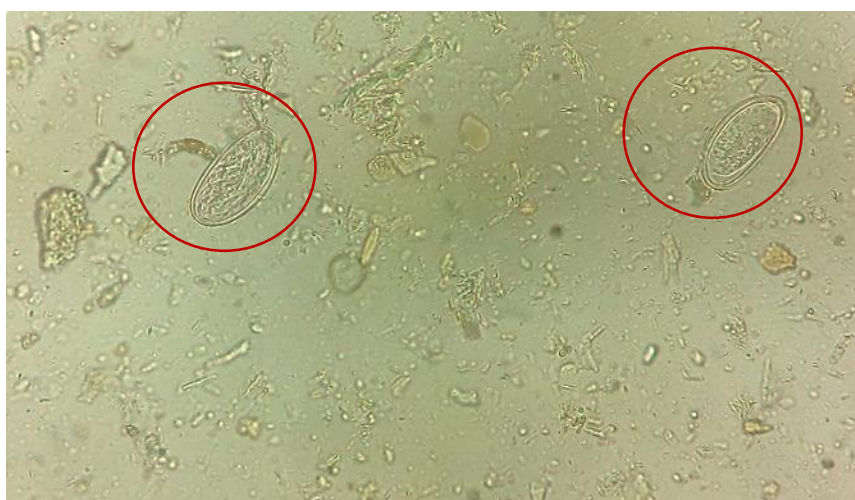


Figura 69. Exame a fresco de fezes - presença de ovos de *Enterobius vermicularis* (rodeados com o círculo vermelho).

7.9.4. GRAU DE DIGESTÃO DE FEZES

Para a realização desta técnica é recomendado ao paciente um regime alimentar rico em hidratos de carbono, gorduras e proteínas, tendo como objetivo a avaliação do estado da função digestiva e rapidez do trânsito intestinal.

Para o exame microscópico, suspende-se um pouco da amostra de fezes frescas em soro fisiológico, procedendo-se ao reconhecimento dos elementos representados na tabela 66.

Tabela 66. Diferentes elementos que podem ser encontrados durante a realização desta análise

Elementos nas fezes	Características
Proteínas (resíduos de origem animal)	Incluem-se as fibras musculares bem digeridas, fibras musculares mal digeridas e tecido conjuntivo.
Gorduras (resíduos de origem animal)	Geralmente as gorduras são digeridas, podendo, no entanto, aparecer sob a forma de gorduras neutras, ácidos gordos e sabões.

Continuação da **tabela 66**

Elementos nas fezes	Características
Hidratos de carbono (resíduos de origem vegetal)	Incluem o amido, a celulose digestível e não digestível. Estas aparecem nas fezes dependendo do seu tempo de permanência no colón e da atividade da flora celulolítica.
Substâncias de origem intestinal	Incluem o muco, leucócitos, eritrócitos, cristais de origem alimentar e células epiteliais.

7.10. ESPERMA

O sémen é constituído pelos gametas masculinos, produzidos a nível testicular, e pelos fluidos seminais, produzidos a nível das glândulas anexas, sendo libertados em conjunto pela uretra. Este líquido é normalmente estéril, podendo, no entanto, ocorrer contaminação após a sua passagem pela glândula e uretra durante a ejaculação, tendo em conta que estas regiões possuem uma flora microbiana residente, constituída por microrganismos como o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* e *Mycoplasma hominis/Ureaplasma urealyticum* (estes últimos potencialmente patogénicos). Os microrganismos mais frequentemente associados a infeção do trato genital masculino estão representados na tabela 67.

Tabela 67. Principais microrganismos associados a infeção do trato genital masculino

Microrganismos associados a infeção	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Proteus</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis/Ureaplasma urealyticum</i>

7.10.1. ESPERMOCULTURA

COLHEITA

A colheita do esperma para realização do exame cultural deve ser realizada, por masturbação, para um frasco apropriado e esterilizado fornecido pelo laboratório.

EXAME DIRETO A FRESCO

Observação do esperma ao Mo de forma a verificar a presença de células epiteliais, leucócitos, GV e formas leveduriformes, efetuando a sua semi-quantificação.

EXAME CULTURAL

O espermograma com pedido de exame cultural é semeado nos meios de GS, GC, CandiSelect™4 e UriSelect™ 4.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Como é geralmente um produto estéril, qualquer crescimento bacteriano observado é valorizado, procedendo-se à ID e TSA do(s) agente(s) isolado(s).

O isolamento de bactérias da flora residente da uretra masculina no líquido seminal geralmente não é indicativo de infecção genital. No entanto, se estes microrganismos forem isolados em elevadas concentrações e em cultura pura ($\geq 10^4$ UFC/mL) deve valorizar-se o seu crescimento.

7.10.2. ESPERMOGRAMA

O espermograma consiste na análise citoquímica do espermatozoides, constituindo um exame complementar inicial, principalmente utilizado na avaliação da infertilidade conjugal.

COLHEITA

A colheita é idealmente realizada por masturbação, nas instalações do laboratório ou em casa. Neste último caso, a amostra deve ser entregue no laboratório no máximo de 1 hora após a ejaculação, devendo ser transportada junto ao corpo.

O paciente é ainda informado de que deve manter uma abstinência sexual de 2 a 5 dias, e aquando a colheita não deve perder a 1ª fração do ejaculado rica em espermatozoides (EZ). Chegada ao laboratório a amostra é colocada numa estufa a aproximadamente 35°C.

ANÁLISE MACROSCÓPICA DA AMOSTRA

A execução do espermograma inclui a análise macroscópica e microscópica do líquido espermático. Os parâmetros avaliados macroscopicamente durante o estágio estão representados na tabela 68.

Tabela 68. Características macroscópicas incluídas na avaliação do sémen

Características macroscópicas	
Parâmetro	Interpretação clínica
Aparência	Geralmente apresenta uma opalescência esbranquiçada/acinzentada.
	Cor avermelhada: presença de GV.
	Cor amarelada: presença de leucócitos.
	Transparente: quantidade reduzida de EZ no sémen.
Volume	Possui um valor clínico muito importante, sendo que volumes diminuídos podem estar na causa de infertilidade masculina.

Continuação da **tabela 68**

Parâmetro	Interpretação clínica
pH	O pH do esperma resulta da mistura das secreções das vesículas seminais (pH alcalino) e da próstata (pH ácido), sendo normalmente ligeiramente alcalino. - Um pH diminuído pode tornar-se hostil para os EZ.
Liquefação	Cerca de 20 minutos após a colheita verifica-se se a amostra já se liquefez. Se a liquefação não ocorrer até 1 hora após a ejaculação, classifica-se esta como incompleta.

Abreviaturas: EZ, espermatozoides; GV, glóbulos vermelhos.

ANÁLISE MICROSCÓPICA DA AMOSTRA

Após liquefação do esperma, realiza-se um exame a fresco, entre lâmina e lamela, observando-se a amostra de sémen ao Mo na objetiva de 40x. O exame a fresco inclui a avaliação da motilidade dos EZ, concentração seminal de EZ, morfologia e presença de elementos anormais no esperma.

EXAME A FRESCO

1) MOTILIDADE

A motilidade deve ser o 1º parâmetro microscópico a avaliar, sendo os EZ classificados de acordo com três padrões de motilidade:

- Espermatozoides progressivos;
- Espermatozoides móveis *in situ*;
- Espermatozoides imóveis.

A quantidade de EZ encontrada para cada grau de motilidade é referida no boletim analítico sob a forma de percentagem.

2) CONCENTRAÇÃO SEMINAL

Consoante o número de EZ observados ao Mo durante o exame a fresco, pode ser necessário recorrer à diluição da amostra para se efetuarem as contagens de EZ móveis à 1ª e 2ª hora (em percentagem) e para se obter o correto número de espermatozoides/mL, sem que ocorra a sua sobreposição.

Esta diluição é realizada com soro fisiológico aquecido a 37°C e com água destilada à qual se adicionam 3/4 gotas de álcool (agente imobilizante dos EZ).

Na contagem efetuada com soro fisiológico aquecido contam-se os espermatozoides imóveis, e na contagem efetuada com água e álcool contam-se o total de EZ, sendo a contagem de EZ móveis obtida pela sua diferença.

A concentração de EZ numa amostra seminal é definida pelo número de EZ em milhões por unidade de volume ($\times 10^6/\text{mL}$), sendo a contagem efetuada numa câmara de Neubauer,

com profundidade de 0,1 mm, mais especificamente nos 5 quadrantes onde normalmente se realiza a contagem dos GV, como se pode observar na figura 70.

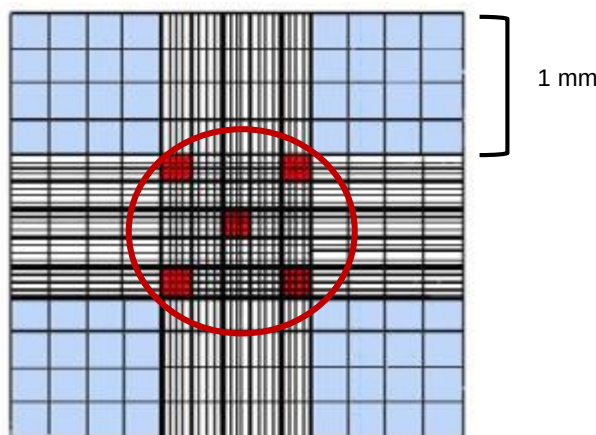


Figura 70. Representação esquemática da câmara de Neubauer (profundidade de 0,1 mm). A vermelho encontram-se os quadrantes onde se realiza a contagem dos espermatozoides.

Assim, para realizar o cálculo da concentração é necessário ter em conta o nº total de EZ contabilizados nos 5 quadrantes, o fator de diluição (se existente) e o volume total dos locais onde se efetuou a contagem. Tendo em conta estes fatores, o cálculo da concentração é realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{concentração} \left(\frac{\text{EZ}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de EZ contabilizados} \times 1 \times 10^3 (\text{mm}^3)}{\text{volume dos quadrantes} (\text{mm}^3)} \right) \times \text{fator de diluição}$$

A contagem total de EZ é obtida multiplicando-se o valor obtido para a concentração de espermatozoides/mL pelo volume da amostra seminal, e o resultado é expresso em milhões de EZ por ejaculado.

3) MORFOLOGIA

Na avaliação deste parâmetro, é referenciada a presença de EZ com aspetos anormais, incluindo EZ bicaudados, amorfos, em anel, pontiagudos e bicéfalos. Procede-se ainda ao cálculo da percentagem de formas anormais, assim como da percentagem de cada tipo de anomalia.

4) PRESENÇA DE ELEMENTOS ANORMAIS

A pesquisa de outros elementos celulares, como células epiteliais do trato génito-urinário, células redondas (células indiferenciadas, que representam as células da espermatogénese), leucócitos, bactérias e GV é realizada em simultâneo à contagem de EZ.

7.11. CONTROLO DE QUALIDADE

7.11.1. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

Como no setor da Microbiologia a maioria das metodologias ainda é manual, apenas se realiza o CQI no equipamento automático das urinas. O equipamento *MicroScan WalkAway* realiza diariamente, de forma automatizada, o CQI.

Tabela 69. Monitorização e periodicidade de realização dos controlos de qualidade internos diários no setor da Microbiologia

Equipamento	Periodicidade	Monotorização
<i>Aution MAX™ AX-4280</i>	Controlo de qualidade interno diário	Existem dois níveis de controlo: normal e patológico que são utilizados em simultâneo.

7.11.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE

O LPCMA participa no esquema de AEQ promovida pelo UK NEQAS, sendo realizado mensalmente para a bacteriologia geral e TSA. Os produtos rececionados são processados conforme a indicação clínica fornecida pelo UK NEQAS.

Tabela 70. Periodicidade, nº de amostras e tipo de material rececionado para a realização da avaliação externa da qualidade

Aplicação clínica	Periodicidade AEQ	Nº amostras	Material rececionado
ID bacteriana	Mensalmente	3	Liofilizado de uma mistura de bactérias, tanto patogénicas como da flora normal, que simula os produtos biológicos.
TSA		2	Liofilizado da bactéria patogénica.

Abreviaturas: AEQ, avaliação externa da qualidade; ID, identificação, TSA, testes de suscetibilidade aos antibióticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO E HEMATOLOGIA

- Bain BJ. Blood Cells – A Practical Guide. 5th ed. Blackwell Publishing; 2015.
- Daniels G. Human Blood Groups. 3th ed. Wiley-Blackwell; 2013.
- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Fundamentos em Hematologia. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Lewis S, Bain BJ, Bates I. Dacie and Lewis Practical Hematology. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.
- Handin RI, Lux SE, Stossel TP. Blood: Principles and Practice of Hematology. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
- World Health Organization: WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Geneva: WHO press; 2008, 125p.
- Martelli A. *Quality Management in Clinical Analysis Laboratories*. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2011; 13 (Esp): 363-8.
- Guimarães AC, Wolfart M, Brisolara MLL, Dani C. *Clinical Laboratory and Pre-Analytical Errors*. Rev HCPA 2011; 31(1): 66-72.
- Subramanian A, Rangarajan K, Pandey RM, Gandhi JS, Sharma V, Bhoi SK. *Evaluation of an automated erythrocyte sedimentation rate analyzer as compared to the Westergren manual method in measurement of erythrocyte sedimentation rate*. Indian J Pathol Microbiol 2011; 54: 70-4.
- Santos VM, Cunha SFC, Cunha DF. *Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações*. Rev Ass Med Brasil 2000; 46 (3): 232-6.
- Olshaker JS, Jerrard DA. *The erythrocyte sedimentation rate*. J Emerg Med 1997; 15: 869-74.
- Klack K, Carvalho JF. *Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o anticoagulante Varfina*. Rev Bras Reumatol 2006; 46 (6): 398-406.
- Molina FT, Júnior GZ. *Anticoagulantes cumarínicos: ações, riscos e monitoramento da terapêutica*. SaBios: Rev. Saúde e Biol 2014; 9 (2): 75-82.
- Netto AP, Andriolo A, Filho FF, Tambascia M, Gomes MB, Melo M, et al. *Atualização sobre a hemoglobina glicada (HbA_{1c}) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico de diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais*. J Bras Patol Med Lab 2009; 45 (1): 31-48.
- Lovrencic MV, Metelko Z. *Standardization of the hemoglobin A1c reporting: transferring global consensus to the local community – Special report*. Biochem Med 2011; 21 (1): 53-4.

- Batissoco AC, Novaretti MCZ. *Aspetos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO*. Rev Bras Hematol Hemoter 2003; 25 (1): 47-58.
- Schmidt LC, Côrrea Júnior MD, Loures LF. *Atualizações na profilaxia da isoimunização Rh*. FEMINA 2010; 38 (7): 346-352.
- Software Appolo - CONFIDENTIA. Disponível em www.confidentia.pt/pt/software-appolo [acedido em 20/02/2016].
- Princípios de funcionamento do equipamento Sysmex XT-1800iTM. Disponível em www.sysmex.com [acedido em 24/02/2016].
- Menarini Diagnostics - Portugal. Ves-Matic 20[®]. Disponível em <http://www.menarinidiag.pt> [acedido em 28/02/2016].
- The McGill Physiology Virtual Lab. Disponível em <http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/vlabmenublood.htm> [acedido em 13/03/2016].
- Cascata da coagulação. Disponível em <http://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.php> [acedido em 13/03/2016].
- Eletroforese capilar. Disponível em <http://www.sebia.com/en-EN/groupeproduits/capillary-electrophoresis> [acedido a 18/03/2016].
- Circular Normativa nº2/DSMIA – “Profilaxia da Isoimunização Rh”, 15 de janeiro de 2007.
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 033/2011 – “Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c”, 30 de setembro de 2011, atualizada a 6 de dezembro de 2012.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica – Módulo III; 2004.
- Sysmex Corporation – Instruções de utilização do Analisador de Hematologia Automatizado XT-2000i/1800i. Japão: 2009.
- SEBIA CAPILLARYSTM. HbA1c by capillary electrophoresis - Clear-cut and precise separation; 2012.
- Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa. Procedimento operativo - Manual Pré-Analítico; 2010.
- Imunohematologia laboratorial. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. – Brasília: Ministério da Saúde 2014, 60 p.

BIOQUÍMICA/IMUNOLOGIA

- Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M. Clinical Chemistry. 7th ed. Elsevier; 2012.
- Burtis C, Ashwood E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th ed. Elsevier/Saunders; 2008.
- Keren DF. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. 1st ed. Great Britain: Hodder Arnold; 2003.
- Randall D, Buggren WW, French K, Eckert R. Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. 4th ed. W.H. Freeman; 2002.
- The reproductive glands. In: Berne RM, Levy MN, editors. Physiology. 4th ed. Mosby; 1998. p. 987-1013.
- Évora PRB, Reis CL, Ferez MA, Conte DA, Garcia LV. *Distúrbios do Equilíbrio Hidroeletrolítico e do Equilíbrio Acidobásico – Uma revisão prática*. Medicina, Ribeirão Preto 1999; 32: 451-469.
- Barbosa AP, Sztajn bok J. *Distúrbios hidroeletrolíticos*. Jornal de Pediatria 1999; 75 (2): S223-S233.
- Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. *Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial*. J Bras Patol Med Lab 2007; 43 (5): 329-337.
- Mastroianni Kirsztajn G. *Avaliação do ritmo de filtração glomerular*. J Bras Patol Med Lab 2007; 43 (4): 257-264.
- Martinelli ALC. *Jaundice*. Medicina, Ribeirão Preto 2004; 37: 246-252.
- Grotto HZW. *Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis*. Rev Bras Hematol Hemoter 2008;30 (5): 390-397.
- Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ. *Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e o seu diagnóstico laboratorial*. J Bras Patol Med Lab 2005; 41 (5): 323-34.
- Giot JF. *Agarose gel electrophoresis – applications in clinical chemistry*. JMB 2010; 29 (1): 9–14.
- Bossuyt X, Bogaerts A. *Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system*. Clinical Chemistry 1998; 44: 944–949.
- Silva RO, Lopes AF, Faria RM. *Serum proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation*. Revista Médica de Minas Gerais 2008; 18(2): 116-122.
- Silva AL, Vitorino RR, Esperidião-Antonio V, Santos ET, Santana LA, Henriques BD. *Hepatites virais: B, C e D: atualização*. Rev Bras Clin Med 2012; 10(3): 206-18.
- Henriques S, Lélis M, Jesus H, Araújo JN. *Cardiac biomarkers in acute coronary syndromes*. Revista Medicina Interna 2006; 13 (2): 113-125.

- Avelleira JCR, Bottino G. *Sífilis: Diagnóstico, tratamento e controle*. An Bras Dermatol 2006; 81(2): 111-26.
- Marcadores de Hepatite. Disponível em: <http://www.germanodesousa.com/page/doencas/article/hepatites/> [acedido em 23/03/2016].
- Eletroforese em gel. Disponível em <http://www.sebia.com/en-EN> [acedido em 29/03/2016].
- Acute Coronary Syndromes – BioMérieux S.A. Disponível em www.biomerieux.com [acedido em 4/04/2016].
- Técnica ELFA. Disponível em www.biomerieux-usa.com [acedido em 5/04/2016].
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 002/2011 – “Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus”, 14 de janeiro de 2011.
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 007/2011 – “Diagnóstico e conduta na Diabetes Gestacional”, 31 de janeiro de 2011.
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 066/2011 – “Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto”, 30 de dezembro de 2011, atualizada a 26 de fevereiro de 2015.
- Abbott ARCHITECT® System Operations Manual. Abbott Laboratories: June, 2007.
- Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV. Ministério da Saúde, Departamento da DST, SIDA e Hepatites Víricas; dezembro 2013.
- mini Vidas® Procedures Manual. França: BioMérieux S.A., July 2008.

MICROBIOLOGIA

- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Elsevier; 2012
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Review of Medical Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
- Jawetz, Melnick e Adelberg. Microbiologia Médica. 22^a ed. LANGE, Mc Graw Hill; 2001.
- Murray PR, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999.
- Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. *Etiologia das infeções do trato urinário e sua suscetibilidade aos antimicrobianos*. Acta Med Port 2007; (20): 543-549.
- Roriz-Filho JS, Vilar FC, Mota LM, Leal CL, Pisi PCB. *Infeções do trato urinário*. Medicina, Ribeirão Preto 2010; 43: 118-25.

- Heilberg IP, Schor N. *Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – ITU*. Rev Assoc Med Bras 2003; 49(1): 109-16.
- Fernandes S, Beorlegui M, Brito MJ, Rocha G. *Protocolo de parasitoses intestinais*. Acta Pediatr Port 2012; 43 (1): 35-41.
- Silva C. *Protocolos de Microbiologia Clínica. Coprocultura, Parte 1- Salmonella e Shigella*. NewsLab – edição 86; 2008.
- Rocha FTA. *The microbiological examination of the semen to evaluate male infertility*. RBAC 2008; 40 (1): 49-56.
- Esteves SC. *Espermograma e correlações clínicas*. Em: Neves PA, Rodrigues Netto N. Jr: *Infertilidade masculina*. Editora Atheneu; São Paulo, Brasil: 2003: 59-70.
- Silva AF. *O Laboratório de Reprodução Humana Assistida [Relatório de Estágio]*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2014.
- Fernandes JS. *Fisiologia do sistema reprodutor feminino [Módulo reprodução e manutenção da espécie]*. Braga: Universidade do Minho.
- World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: WHO press, 2010, 287p.
- MicroScan WalkAway. Disponível em www.beckmancoulter.com [acedido em 15/4/2016].
- Cristais de urina. Disponível em <http://atlasdeurinalise.blogspot.pt/p/cristais-na-urina.html> [acedido em 16/04/2016].
- Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. Disponível em www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf [acedido em 27/04/2016].
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 004/2011 – “Conduta em Infertilidade”, 20 de janeiro de 2011.
- Norma da Direção Geral de Saúde Nº 004/2013 - “Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos”, 21 de fevereiro de 2013, atualizada a 13 de novembro de 2015.
- Microbiologia clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infeciosas/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013.
- Manual de Instruções – AUTION MAX AX-4280, ARKRAY. DOC. No. OM-26412 REV. 3.
- Folhetos informativos dos diferentes meios de cultura – BioMérieux S.A.

9. ANEXOS

Anexo 1. Fórmula de *Friedewald* utilizada no cálculo do colesterol LDL quando a concentração dos triglicerídeos é inferior a 400 mg/dL

$$[\text{Colesterol LDL}] = [\text{CT}] - ([\text{Colesterol HDL}] + \frac{[\text{TG}]}{5})$$

Abreviaturas: [], concentração; HDL, lipoproteínas de alta densidade; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; CT, colesterol total; TG, triglicerídeos.

Anexo 2. Características e aplicação clínica dos diferentes meios de cultura e de transporte utilizados no Laboratório de Patologia Clínica Maria Albertina

Meios de cultura	Características do meio
Gelose Columbia com 5% de sangue de ovelha	- Meio de cultura não seletivo enriquecido em sangue, que permite o crescimento da maioria das bactérias, incluindo algumas de crescimento exigente. - A presença de sangue permite ainda detetar as reações hemolíticas típicas de determinadas bactérias. Incubação: atmosfera enriquecida em CO₂ a 37°C, durante 24 horas, e se necessário outras 24 horas a 37°C em aerobiose.
Gelose de Chocolate + PVS	- Meio de cultura não seletivo enriquecido com PVS. - Contém uma base enriquecida em fator V (NAD) e fator X (hemina), permitindo o isolamento de bactérias fastidiosas como <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp., que geralmente não crescem em GS. Incubação: atmosfera enriquecida em CO₂ a 37°C, durante 24 horas, e se necessário outras 24 horas a 37°C em aerobiose.
CandiSelect™4	- Meio de cultura cromogénico seletivo utilizado no isolamento de leveduras. - A presença de antibióticos impede o desenvolvimento da maioria dos contaminantes bacterianos. - Identificação direta de <i>Candida albicans</i> e identificação presuntiva de <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida krusei</i>. Incubação: em aerobiose a 37°C durante 24 horas, e outras 24 horas à temperatura ambiente.

Continuação do **anexo 2**

Meio SS	- Permite o isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> spp. ou <i>Shigella</i> spp. a partir de amostras fecais. - O meio permite evidenciar colónias que não fermentam lactose (incolores) e que reduzem o tiosulfato, com produção de H₂S. - A presença de colónias incolores, com ou sem centro negro representa uma forte possibilidade de <i>Salmonella</i> spp. ou de <i>Shigella</i> spp., respetivamente. Incubação: em aerobiose a 37°C, com observação às 24 e se necessário às 48 horas.
Meio XLD	- Permite o isolamento seletivo de Enterobactérias patogénicas, especialmente <i>Shigella</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp. a partir de amostras fecais, devido à presença do agente seletivo desoxicolato. - A diferenciação das Enterobactérias é realizada tendo em conta a capacidade destas em fermentarem determinados açúcares (xilose, lactose e sacarose), da presença da enzima lisina descarboxilase e da produção de H₂S. Incubação: em aerobiose a 37°C, com observação às 24 e se necessário às 48 horas.
Meio UriSelect™4	- Meio cromogénico utilizado para o isolamento, diferenciação e contagem de patogénicos associados a infeções do trato urinário. - Permite a identificação direta de <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Proteus</i> spp. e a identificação presuntiva de outros patogénicos urinários, como as Enterobactérias do grupo K.E.S.C.. - Orienta ainda a identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Incubação: em aerobiose a 37°C over-night.
MRSASelect™4	- Meio de cultura cromogénico seletivo e diferencial que permite a identificação direta de MRSA. - A presença de antibióticos/antifúngicos inibe o crescimento da maioria das bactérias e leveduras. Incubação: em aerobiose a 37°C durante 24 horas, e se necessário outras 24 horas à temperatura ambiente.
Meio Lowenstein-Jensen	- Meio de cultura seletivo e enriquecido de forma a favorecer o crescimento de <i>Mycobacterium</i> spp.. Incubação: a 37°C em aerobiose, durante 14 a 72 dias.

Continuação do **anexo 2**

Caldo de Granada™ bifásico	- Caldo seletivo e diferencial utilizado no rastreio de <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo B. - O aparecimento de um alo alaranjado é sinal de um resultado positivo para a presença de <i>Streptococcus agalactiae</i>. Incubação: em aerobiose a 37°C durante 24 horas. Se negativo, prolongar por mais 24 horas.
Caldo de Selenito-Cistina™	- Caldo de enriquecimento seletivo utilizado para diminuir a quantidade de bactérias da microbiota intestinal normal. - Utilizado na primocultura de amostras fecais, favorecendo o crescimento de <i>Shigella</i> spp. e <i>Salmonella</i> spp.. Incubação: em aerobiose a 37°C <i>over night</i>.
Meio de transporte Stuart	- Meio semissólido, sem nutrientes na sua constituição, permitindo manter a viabilidade bacteriana sem promover a sua proliferação. - Utilizado no transporte de diversos tipos de amostras biológicas, incluindo exsudados vaginais, nasais, retais, faríngeos e purulentos. - Ideal para a preservação da viabilidade dos microrganismos quando a inoculação imediata nos meios específicos não é possível.

Abreviaturas: GS, gelose de sangue; H₂S, sulfeto de hidrogénio; MRSA, *Staphylococcus aureus* metilicina resistente; NAD, dinucleótido de nicotinamida e adenina; PVS, suplemento polivitamínico; SS, *Salmonella-Shigella*; XLD, xilose-lisina-desoxicolato.