

João Diogo Baía Coelho de Almeida

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Mestre Mário João Roque e pela Professora Doutora Olga Maria Cardoso, com a colaboração da Dr^a. Cristiana Canha e da Dr^a. Teresa Reis e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Diogo Baía Coelho de Almeida

Relatório de Estágio

Centro de Saúde Militar de Coimbra e Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

De Outubro de 2013 a Maio de 2014

Áreas: Hematologia e Microbiologia

Orientadores externos: Dr. Mário João Roque, Dra. Cristiana Canha e Dra. Teresa Reis

Orientadores internos: Dra. Olga Maria Cardoso

Agradecimentos

Ao Centro de Saúde Militar de Coimbra, que me recebeu e acolheu de braços abertos para realizar este estágio.

Ao Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, assim como toda a equipa que em tão pouco tempo se disponibilizou a orientar e a ensinar durante o estágio.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por estes dois anos magníficos e por me proporcionar este estágio em dois locais de enorme importância.

À Professora Doutora Leonor Martins de Almeida, pela dedicação e apoio durante estes dois anos de Mestrado, e confiança demonstrada nas minhas capacidades.

Ao meu orientador externo Doutor Mário João Roque, pela orientação e incentivo que me proporcionou.

À Doutora Teresa Reis e Professora Doutora Cristiana Canha pela orientação e partilha de conhecimentos durante o estágio.

À minha orientadora interna Professora Doutora Olga Maria Cardoso, pelo seu contributo na correção e estruturação deste relatório.

Aos meus familiares, em particular pai e mãe, pelo apoio e sacrifício que têm feito para me proporcionarem este investimento intelectual.

Aos meus amigos, pelo apoio e integração durante estes dois anos na cidade de Coimbra.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
ABREVIATURAS	VII
RESUMO	1
ABSTRACT	1
INTRODUÇÃO	3
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	4
FASE PRÉ-ANALÍTICA	6
BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA	6
HEMATOLOGIA	10
HEMATOPOIESE.....	10
CELL DYN ® RUBY ABBOTT DIAGNOSTICS.....	12
PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS	14
PARÂMETROS ERITROCITÁRIOS.....	14
PARÂMETROS PLAQUETARES.....	17
ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO	18
ELABORAÇÃO DE UM ESFREGAÇO SANGUÍNEO	19
COLORAÇÃO MAYGRÜNWARD-GIEMSA.....	19
ALTERAÇÕES NOS LEUCÓCITOS	20
ALTERAÇÕES NO ERITRÓCITO.....	23
ANEMIAS	23
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	24
OUTRAS COLORAÇÕES PARA VISUALIZAÇÃO HEMATOLÓGICA	28
ALTERAÇÕES PLAQUETARES.....	29
HEMOSTASE.....	29
VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO	34
MICROBIOLOGIA CLÍNICA	35
BACTERIOLOGIA	35
PROCESSAMENTO INICIAL DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS	35
EXAME MICROSCÓPICO E CULTURA DE PRODUTOS BIOLÓGICOS	36
MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS E LÍQUIDOS.....	38
PRODUTOS BIOLÓGICOS	42
APARELHOS AUTOMÁTICOS	47
TESTES BIOQUÍMICOS E SEROLÓGICOS – MANUAIS.....	48
TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS MANUAIS	49
INFEÇÃO POR MICOBACTÉRIAS	50
PARASITOLOGIA	50
CONTROLO DE QUALIDADE	51
CONCLUSÃO	53
BIBLIOGRAFIA	55

Abreviaturas

ADP – Adenosina-difosfato

AFP – Alfa Feto-proteína

ALT – Alanina Transaminase

ALP – Fosfatase Alcalina

AST – Aspartato Transaminase

ATCC – *American Type Control Collection*

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CIN – Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina

CLED – *Cystein Lactose Electrolyte Deficient*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CSMC – Centro de Saúde Militar de Coimbra

CK – Creatinacinase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FSH – *Follicle Stimulating Hormone*

GN – Gram Negativo

HCT – Hematócrito

HDL – *High Density Lipoprotein*

HGB – Hemoglobina

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC – *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*

HSC – *Hematopoietic Stem Cells*

ISI – Índice de Sensibilidade Internacional

INR – *International Normalized Ratio*

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LDH – Lactato desidrogenase

LDL – *Low Density Lipoprotein*

LH – *Luteinizing Hormone*

MAPSS – *Multi-Angle Polarized Scatter Separation*

HCM – Hemoglobina Corpuscular Media

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Media

VCM – Volume Corpuscular Medio

M.O – Microrganismos

VPM – Volume Plaquetar Medio

MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

NAD – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NK – *Natural Killers*

PAF – Provas de Aptidão Física

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDW – *Platelet Distribution Width*

PLT – Plaquetas

PSA – *Prostatic Specific Antigen*

RDW – *Red Cell Distribution Width*

ARN – Ácido Ribonucleico

uPA – *urokinase Plasminogen Activator*

TP – Tempo de Protrombina

TSH – *Thyroid Stimulating Hormone*

TTPa – Tempo Tromboplastina Parcial ativada

tPA – *tissue Type Plasminogen Activator*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

XLD – *Xylose Lysine Deoxydecholate*

Resumo

Com a evolução tecnológica as Análises Clínicas têm adotado novas técnicas e metodologias à sua rotina, contribuindo para um maior rigor nos resultados utilizados no diagnóstico, prognóstico, terapêutica e prevenção de doenças. Como tal, são necessários profissionais habilitados a acompanhar esta constante evolução, contribuindo com o seu conhecimento na interpretação dos resultados obtidos. A formação na área das Análises Clínicas revela a sua importância formando pessoal habilitado e competente para enfrentar e acompanhar tanto inovações como casos que lhes são apresentados na vida profissional.

O Centro de Saúde Militar de Coimbra (CSMC) e o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) são o reflexo do que foi mencionado. Foram estes os locais onde me foi dada a oportunidade de adquirir competências e aplicá-las junto de profissionais experientes com os quais consolidei e partilhei conhecimentos adquiridos durante o Mestrado em Análises Clínicas. No presente relatório estão mencionados os sectores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia, em que desenvolvi conhecimentos, sendo as duas últimas aquelas em que estes foram aprofundados neste documento.

Abstract

With the evolution of technology new methods and techniques have been discovered and adopted by the health system, giving a helpful contribution in diagnostics, prognostics, treatment and disease prevention. For a good application of this factors professionals are required, that can contribute with knowledge, with the right interpretation of the results and with the constant evolution of this field. The Clinical Analysis formation revealed its importance by forming professionals that can apply the correct knowledge and resolve problems in professional life. The CSMC and CHUC are institutions that reflect the characteristics above mentioned. These were the institutions were I worked and was able to built my experience and consolidate my knowledge in clinical analysis. In this work text, I refer Biochemistry, Immunology, Hematology and Microbiology, where I have described more specifically the last two sectors.

Introdução

As Análises Clínicas constituem uma parcela importante na área da saúde. São compostas por múltiplas áreas e parâmetros distintos, que, na sua maioria por si só, não têm grande relevância, mas que no seu todo acabam por ser contributos bastante vantajosos para o médico. A boa caracterização de uma patologia e tratamento adequado exigem o conhecimento biológico do doente. O recurso à colheita e análise dos produtos biológicos constituem contributos fundamentais e uma das formas privilegiadas de alcançar esses objetivos. As Análises Clínicas têm-se revelado na sociedade no decorrer dos anos, e não são solicitadas apenas em casos de indivíduos que apresentam sintomatologia ou patologia (aguda ou crónica), mas também no acompanhamento de pessoas aparentemente saudáveis. A utilização destes serviços por indivíduos saudáveis tem como objetivo detetar ou acompanhar alterações biológicas, permitindo uma intervenção precoce do médico, no sentido de evitar possíveis agravamentos dessas alterações e eventual evolução para uma patologia.

No diagnóstico laboratorial coexistem vários serviços e áreas científicas/clinicas, que exigem uma constante atualização e versatilidade por parte dos profissionais, sem as quais não é viável um ótimo acompanhamento das várias inovações que surgem com o desenvolvimento de novas tecnologias. Este é um dos principais motivos que tornam esta área tão interessante e motivante. A partilha de conhecimento e a aplicação do mesmo para benefício do Ser Humano são uma constante nesta área da saúde e uma fonte de motivação pessoal.

O estágio curricular teve a duração de 7 meses, dos quais 6 foram no Centro de Saúde Militar de Coimbra e 1, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. O trabalho efetuado no CSMC recaiu nos sectores de Hematologia, Bioquímica Clínica e Imunologia, concluindo-se o estágio no CHUC, abordando o sector de Microbiologia. Os sectores mencionados neste relatório são Hematologia e Microbiologia, fazendo-se uma breve referência aos sectores de Bioquímica Clínica e Imunologia.

Caracterização do laboratório

O CSMC tem como utentes primordiais indivíduos que representam o Exército Militar Português e respetivos familiares, ainda que indivíduos que não pertençam a este grupo também estejam habilitados a utilizar os seus serviços. Esta instituição é constituída por diversas áreas de Meio Complementar de Diagnóstico e Terapêutica (MCDT), nas quais se insere o Laboratório de Análises Clínicas.

A média de utentes no serviço de Análises Clínicas do CSMC é de 40 a 50 por dia, podendo esporadicamente este número aumentar para o dobro em caso de eventos militares. Constam destes períodos as chamadas provas de aptidão física em regime militar (PAF), as missões militares (destacamentos para missões militares) e o despiste de consumo de drogas de abuso em militares.

Existem 3 zonas de trabalho no laboratório de análises do CSMC, todas ligadas a um sistema informático (*SISLab*[®]) que assegura uma comunicação constante e promove a partilha de resultados entre todas as zonas. Estas zonas são a zona administrativa (pré-analítica, informatização), a sala de colheitas e processamento de produtos biológicos (pré-analítica e analítica) e a zona de análise e validação de resultados (pós-analítica).

No que diz respeito aos recursos humanos, o pessoal que exerce funções no laboratório do CSMC é constituído por 2 administrativas, 5 técnicos de análises clínicas e 1 diretor técnico. Os aparelhos utilizados no laboratório estão distribuídos pelas várias áreas que o constituem, e estão detalhadamente descritos na Tabela I.

Tabela I- Aparelhos do Laboratório de Análises Clínicas do CSMC

Sector	Aparelhos	Técnica
Hematologia	<i>CELL-DYN</i> [®] <i>Ruby Abbott Diagnostics</i>	Citometria de fluxo
	<i>BD Vacutainer</i> [®] <i>Sedi-15</i> [™]	<i>Westergren</i>
	<i>OPTION</i> [®] <i>4 PLUS bioMérieux</i>	Turbidimetria
Bioquímica e Imunologia	<i>Architect</i> [®] <i>ci8200 Abbott Diagnostics</i>	Turbidimetria, Potenciometria, Espectrofotometria e Quimioluminescência
	<i>ADAMS A_{1c}</i> [®] <i>HA-8 / 60 ARKRAY</i>	<i>HPLC</i>
	<i>miniVidas</i> [®] <i>bioMérieux</i>	Imunoensaio

O CHUC é o principal hospital do distrito de Coimbra, assim como um dos mais importantes e reconhecidos no país. O número de doentes que frequentam diariamente o hospital é muito elevado (incluindo internamentos), sendo proporcional o número de amostras que chegam ao laboratório, aproximadamente 400, por dia.

O sector de microbiologia, está equipado com diversos equipamentos de vanguarda (Tabela 2), que permitem aumentar a velocidade de processamento de amostras, aumentar a especificidade dos resultados, diminuir os interferentes, diminuir os erros cometidos no processamento da amostra e contribuir com mais informação para avaliar os resultados obtidos. Todos os produtos biológicos que chegam ao laboratório são inseridos num sistema implementado no laboratório de Microbiologia. Este sistema, denominado *maxdata*®, permite informatizar os dados relativos aos produtos biológicos e respetivos resultados.

Descrimina-se, em seguida, os sectores que constituem o sector de microbiologia:

- Bacteriologia Geral
- Parasitologia
- Micobactérias e Micologia
- Serologia (não abordada durante o estágio)

Tabela 2 - Aparelhos do sector de Microbiologia do CHUC

Microbiologia	
Aparelho	Técnica/Leitura
<i>VITEK</i> ® 2 <i>bioMérieux</i>	Espectrofotometria
<i>Mini API</i> ® <i>bioMérieux</i>	Turbidimetria
<i>VITEK</i> ® <i>Ms bioMérieux</i>	Espectrometria de Massa
<i>BacT / ALERT</i> ® 3D <i>bioMérieux</i>	Colorimetria
<i>BACTEC</i> ™ <i>MGIT 960</i> ™ <i>BD</i>	Fluorometria

Fase pré-analítica

A fase pré-analítica consiste em todo o processo que envolve a colheita do produto biológico, desde a preparação do utente até ao ato de recolha do produto. Para tal é necessário uma escolha adequada do material usado tanto na recolha do produto biológico como dos recipientes para onde é colhido (Tabela 3).

Tabela 3 - Materias para recolha de Produtos Biológicos

Material	Produto Biológico (análise)
Tubo com citrato de sódio	Sangue venoso (avaliação da hemostase)
Tubo com citrato de sódio (<i>design</i> específico)	Sangue venoso (velocidade de sedimentação)
Tubo com coagulante e gel	Sangue venoso (bioquímica e serologia)
Tubo com o sal tripotássico etilenodiaminotetracético (EDTA)	Sangue venoso (hemograma e hemoglobina glicada)
Frasco esterilizado de 150 ml	Urina, expetoração, exsudados, LCR, e outros líquidos biológicos (cultura microbiana, pesquisa de microrganismos)
Frasco esterilizado de 2000ml c/s HCl – 50%	Urina de 24 horas (bioquímica)
Frasco esterilizado de 150 ml c/espátula	Fezes (coprocultura e parasitológico)
Zaragatoa de algodão	Exsudados (cultura microbiana)

Bioquímica e Imunologia

A análise bioquímica e imunológica permite a avaliação não só da função de diversos órgãos como também de mecanismos intermediários de extrema importância para o organismo humano. Através da quantificação de certos elementos nos fluidos biológicos, aplicando técnicas físicas e químicas é possível avaliar o estado de um órgão ou de um processo biológico de um individuo, recorrendo a uma forma pouco invasiva e com elevada especificidade.

Para as análises bioquímicas e testes imunológicos, o CSMC tem à sua disposição o aparelho automático *Architect*® *ci8200* *Abbott diagnostics* (Figura 1), constituído por 2 módulos, nomeadamente um autoanalisador químico (*c8000*) e outro baseado em imunoenaios (*i2000SR*). O produto biológico utilizado é, preferencialmente, soro, obtido de sangue periférico colhido para tubo com coagulante e gel, e centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm).



Figura 1 - *Architect*® *ci8200* *Abbott diagnostics*

Nesta instituição, também é utilizado o aparelho automático *ADAMS A_{1c}*® *HA-8160* *ARKRAY* que se baseia na técnica de HPLC (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*) para determinar a hemoglobina glicada (Figura 2). O produto biológico utilizado é sangue periférico colhido para tubo com EDTA.



Figura 2 - *ADAMS A_{1c}*® *HA-8160* *ARKRAY*

O módulo *Architect c8000* realiza a análise dos parâmetros bioquímicos por testes óticos nomeadamente a espectrofotometria e turbidimetria, quantificando também iões através de um potenciómetro (potenciometria). O módulo *Architect i2000SR* baseia-se na técnica de quimioluminescência. Sendo um módulo completamente fechado em que o processo é realizado no escuro e, portanto, sem radiação interferente. Os parâmetros avaliados com as técnicas utilizadas estão descritos nas tabelas (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Provas Bioquímicas

Provas Bioquímicas – Architect® ci8200 Abbott diagnostics			
Fluido	Parâmetro	Objetivo	Técnica
Soro	Bilirrubina direta	Avaliação da função Hepática	Espectrofotometria
	Bilirrubina total		
	AST		
	ALT		
	GGT		
	ALP		
	LDH		
	Coolesterol total	Ficha Lipídica	
	HDL		
	LDL		
	Triglicerídeos		
	CK	Av. de lise Muscular	
	Ferro	Metabolismo do Ferro	
Soro e urina	Ca ²⁺	Iões importantes no metabolismo	
	Mg ²⁺		
	Fosfatos		
	Proteínas totais	Av. Proteica	
	Amilase	Av. da função Pancreática	
	Glucose	Glicémia	
	Albumina	Avaliação da função Renal	
	Creatinina		
	Ureia		
	Ácido úrico		
	K ⁺		Equilíbrio Hidro-Electrolítico
	Na ⁺		
	Cl		
Urina	Proteínas	Av. da função Renal	Turbidimetria
	Canabinóides, Opiáceos Anfetaminas, Cocaína	Despiste de consumo de drogas de abuso	Espectrofotometria

Tabela 5 - Provas Imunológicas

Provas Imunológicas – Architect® ci8200 Abbott diagnostics			
Fluido	Parâmetros	Objetivo	Técnica
Soro	FSH	Marcadores de função	Quimioluminescência
	LH	Hipotálamo Hipófise	
	Prolactina		
	Vitamina B12	Marcadores	
	Folato	metabólicos	
	Anti-TG	Marcadores da função	
	Anti-TPO	tiroideia	
	T3 livre e total		
	T4 livre e total		
	TSH		
	IgG	Imunoglobulinas	
	IgM		
	IgA		
	IgE		
	Hepatite A – IgG e IgM	Marcadores virais	
	Hepatite B – Anti-HBc, Anti-HBe e Anti-HBs; Antígeno HBs e Antígeno HBe		
	Hepatite C – Anti-HCV		
	VIH – Antígeno e Anticorpos		
	Citomegalovírus – Anticorpos IgG e IgM		
	Alfa-fetoproteína (AFP)	Marcadores tumorais	
	PSA livre e total		
	Sífilis – anti-treponema	Outros marcadores de doenças infecciosas	

Hematologia

No Centro de Saúde Militar de Coimbra (CSMC), o sector de Hematologia do laboratório está apto a analisar e quantificar vários parâmetros analíticos, nomeadamente: os elementos celulares presentes no sangue e a sua morfologia, obtendo-se o respetivo hemograma; a produção de proteínas plasmáticas pela determinação da velocidade de sedimentação e a avaliação da hemostase pela determinação do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e quantificação de fibrinogénio.

O sangue é um produto biológico utilizado frequentemente em análises clínicas. É um fluido de fácil acesso que permite uma análise global de vários sistemas para além do seu próprio e da eritropoiese. Uma amostra de sangue de um indivíduo é constituída (em percentagem por volume) por 55% de plasma, onde estão presentes proteínas, água e outros solutos e 45% de elementos formados entre os quais encontramos plaquetas, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos (Figura 3) [1].

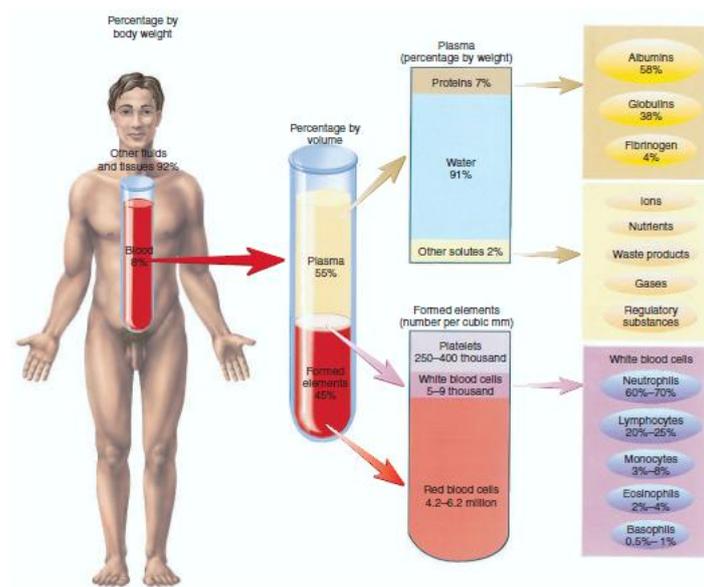


Figura 3 - Esquema ilustrativo da composição do sangue. Adaptada de SEELEY Rod, et al – *Anatomy and Physiology*. 2002

Hematopoiese

Ao longo da vida de cada indivíduo existe uma produção, eliminação e reposição constante das células sanguíneas por parte do tecido hematopoiético. Para que o ciclo decorra normalmente é necessário um sistema biológico saudável para que a produção da população

celular sanguínea seja correta e controlada. A medula óssea é a principal responsável pela hematopoiese e contém células sanguíneas nos seus mais diversos estádios de maturação. As células estaminais hematopoiéticas (HSC) são células pluripotentes, responsáveis tanto pela manutenção da produção celular no tecido hematopoético (autorrenovação) como pela regulação da população celular sanguínea (diferenciação) [2]. De acordo com a necessidade de regular uma determinada linha celular sanguínea, no organismo são libertados fatores extrínsecos e intrínsecos com o objetivo de promover a diferenciação celular no tecido hematopoiético, despoletando diferenciação das HSC e conseqüente perda da pluripotência das mesmas, ao longo desse processo [2].

Populações celulares sanguíneas

As populações celulares presentes no sangue periférico são, na sua grande maioria, células no seu estado maduro. Para que cheguem a este estado e sejam lançadas no sangue periférico, têm de passar por vários estádios de diferenciação, sendo então denominadas por precursores celulares [1]. O esquema da Figura 4 apresenta a diferenciação desde a HSC até às formas maduras.

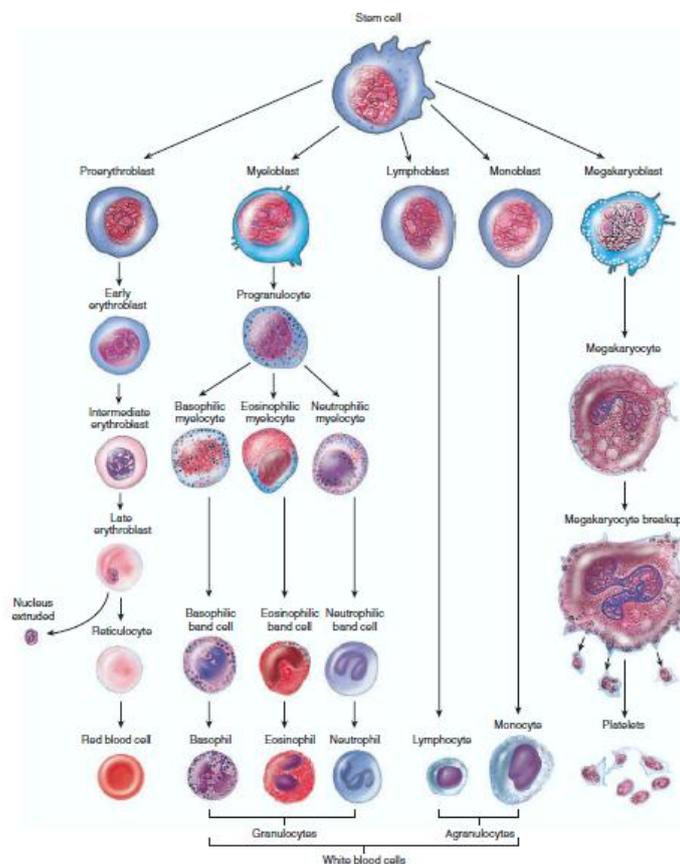


Figura 4 - Linhagens leucocitárias e eritrocitária. Adaptada de SEELEY Rod, et al – Anatomy and Physiology. 2002

Hemograma

Para a realização de um hemograma, é necessário fazer uma colheita de sangue periférico para um tubo contendo EDTA. Este anticoagulante é um quelante de cátions bivalentes, atuando no Ca^{2+} , interferindo na sua disponibilidade na cascata de coagulação.

O hemograma inclui informações sobre o número absoluto de leucócitos e das respectivas subpopulações celulares, assim como sobre o número total e características morfológicas dos eritrócitos e plaquetas. Os elementos quantificados no hemograma são leucócitos (GB – Glóbulos Brancos), neutrófilos (NEU), linfócitos (LIN), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS), basófilos (BASO). Os eritrócitos e as suas características são quantificados e calculadas em eritrócitos (GV – Glóbulos Vermelhos), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), dispersão do volume corpuscular médio (RDW). Relativamente às plaquetas e as suas características, estas são quantificadas e calculadas em plaquetas (PLT), volume plaquetar médio (VPM) e dispersão do volume plaquetar médio (PDW).

Cell Dyn ® Ruby Abbott Diagnostics

No laboratório de análises do CSMC é utilizado o aparelho automático *Cell Dyn ® Ruby* da *Abbott diagnostics* para determinação do hemograma.



Figura 5 - Cell Dyn ® Ruby da Abbott diagnostics

Este aparelho automático utiliza amostras colhidas para tubo com EDTA. Aspira um volume de sangue da amostra separando-a em 3 volumes diferentes para as 3 diferentes quantificações (GB – Glóbulos Brancos, GV/PLT – Glóbulos Vermelhos / Plaquetas, HGB - Hemoglobina). O aparelho utiliza a tecnologia MAPSS (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*), citometria de fluxo laser, para realizar a contagem e diferenciar as subpopulações celulares e

uma técnica colorimétrica para quantificar a hemoglobina. A técnica de citometria de fluxo usada na determinação dos elementos celulares, consiste na utilização de um volume exato da amostra biológica que é aspirada e é forçada a passar no canal ótico, onde um feixe de laser incide. À medida que o fluxo da amostra intersecta o feixe de laser, a dispersão da luz é medida por três detetores diferentes. Estes detetores situam-se dois no ângulo frontal (0° e 10°) e um no ângulo lateral (90°), sendo que o detetor frontal (*forward scatter*) avalia o tamanho da célula pela dispersão de luz, e o detetor lateral (*side scatter*) avalia a complexidade da célula pela dispersão da luz [4]. A combinação da informação obtida pelas duas medidas de dispersão permite tanto a contagem como a diferenciação das populações celulares. Na técnica colorimétrica, a hemoglobina é obtida após lise dos eritrócitos numa câmara de mistura, depois passa para uma célula de leitura onde é quantificada pela absorvância a 555nm por um fotodetector, sendo que a fonte de luz é um LED de baixa energia (a absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina) [5].

Como se pode verificar no resultado disponibilizado pelo *software* do aparelho *Cell Dyn® Ruby* (Figura 6) é possível obter a contagem celular e as características morfológicas após processamento da amostra. Durante a contagem, o aparelho faz corresponder a cada célula analisada um ponto, elaborando um gráfico de dispersão que permite distinguir as subpopulações, utilizando características morfológicas como o tamanho e a complexidade (granularidade/lobularidade).

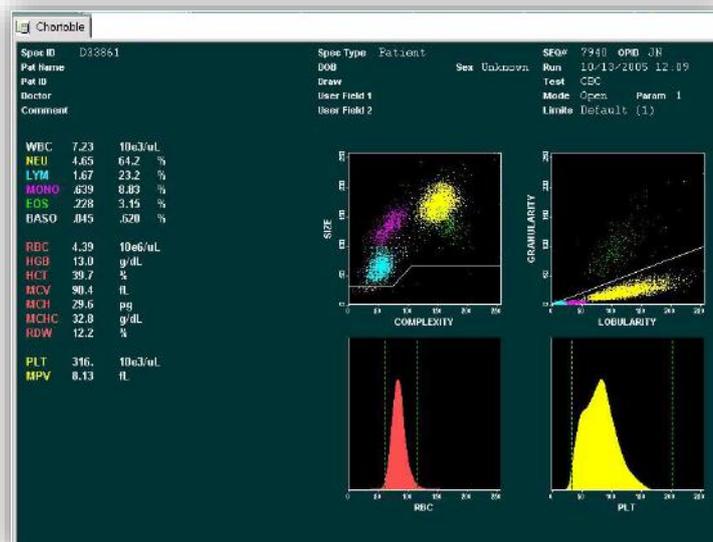


Figura 6 - Software Cell Dyn® Ruby

Parâmetros Leucocitários

Contagem de Leucócitos (GB)

A quantificação de leucócitos (GB) na amostra é obtida por citometria, baseada na tecnologia de MAPSS. O resultado é expresso em $GB \times 10^9/l$ sendo este valor utilizado para calcular as subpopulações, como foi referido no ponto anterior, relativo ao funcionamento do aparelho *Cell Dyn Ruby*[®]. Os valores de referência absolutos e relativos das subpopulações leucocitárias estão apresentados na Tabela 6 [6].

Tabela 6 - População Leucocitária [6]

	Valore absoluto ($\times 10^9/l$)	Valor relativo (%)
Leucócitos (GB)	4,0 – 10,0	100
Neutrófilos	2,0 – 7,0	40 – 80
Linfócitos	1,0 – 3,0	20 – 40
Monócitos	0,2 – 1,0	2 – 10
Eosinófilos	0,02 – 0,5	1 – 6
Basófilos	0,02 – 0,1	1 – 2

Parâmetros Eritrocitários

Contagem de Eritrócitos (GV)

A quantificação dos eritrócitos na amostra é obtida por citometria, como já foi referido. A contagem é feita utilizando a tecnologia de MAPSS e o resultado é expresso recorrendo à fórmula:

$$GV \times 10^{12}/l$$

Os valores de referência são $5 \pm 0,5 \times 10^{12}/l$ (homens) e $4,3 \pm 0,5 \times 10^{12}/l$ (*mulheres*) [6].

Contagem de Reticulócitos (RTC)

Os reticulócitos (RTC) são eritrócitos imaturos que possuem ARN ribossomal remanescente, sendo que este ARN pode ser detectado com o recurso a um corante específico [9]. No equipamento *Cell Dyn Ruby*®, esta determinação é feita numa amostra colhida para um tubo específico para quantificação de reticulócitos, o qual contém corante tiazínico, e outros componentes que eliminam possíveis interferentes como os leucócitos na contagem (GB). Pela tecnologia de MAPSS os reticulócitos são contabilizados juntamente com os GV maduros, mas são separados no histograma pelas medidas de dispersão, sendo o seu resultado dado pela fórmula:

$$\frac{RTC}{GV} \times 100$$

Os valores de referência tabelados são 0,5 % a 2,5 % de reticulócitos [6].

Concentração de Hemoglobina (HGB)

A quantificação de hemoglobina é baseada numa técnica colorimétrica, já referida anteriormente. Os seus valores de referência são variáveis, conforme as características populacionais, a localização geográfica, o sexo e a idade do indivíduo. O resultado é dado em *g/dL*, e os valores de referência tabelados para a maioria da população são 15 ± 2 *g/dL* (*homens*) e $13,5 \pm 1,5$ *g/dL* (*mulheres*) [6].

Hematócrito (HCT)

O hematócrito (HCT) é a relação entre o volume total de eritrócitos (GV) e o volume de sangue total (*v/v*). Os valores de referência, expressos em percentagem são 45 ± 5 % (*homens*) e 41 ± 5 % (*mulheres*) [6]. No caso do aparelho *Cell Dyn Ruby*®, o hematócrito é calculado a partir da seguinte fórmula matemática:

$$HCT (\%) = \frac{GV (10^6/\mu l) \times VCM(fL)}{10}$$

Volume Corpuscular Médio (VCM)

O volume corpuscular médio (VCM) representa o volume médio dos glóbulos vermelhos e determina-se calculando a média dos tamanhos de cada eritrócito presente na amostra e é explicitado na unidade *fL* (*fentolitros*). Os valores de referência são 92 ± 9 *fL* (*homem e mulher*) [6].

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

A hemoglobina corpuscular média (HCM) é a quantidade média de hemoglobina por eritrócito (em picogramas). Os valores de referência são $29,5 \pm 2,5$ *pg* (*homem e mulher*) [6]. A HCM é calculada a partir da relação entre o número de eritrócitos e a hemoglobina total (HGB). O resultado é obtido pela equação:

$$HCM (pg) = \frac{HGB (g/dL)}{GV (10^6/\mu l)} \times 10$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

A concentração de hemoglobina corpuscular média consiste na concentração média de hemoglobina por eritrócito. Os valores de referência são $33 \pm 1,5$ *g/dL* (*homens e mulheres*) [6]. Para calcular este parâmetro é utilizada a quantificação da hemoglobina total e o valor do hematócrito. O resultado é apresentado em *g/dL* pela equação:

$$CHCM (g/dL) = \frac{HGB (g/dL)}{HCT(\%)} \times 100$$

Índice de Dispersão de Volume dos Eritrócitos (RDW)

O índice de dispersão de volume dos eritrócitos é a medida que permite avaliar a heterogeneidade na população dos eritrócitos. Está relacionada com o desvio padrão do volume corpuscular médio dos eritrócitos e o resultado é dado em percentagem, tendo como valores de referência são $12,8 \pm 1,2$ % (*homem e mulher*) [6].

Índice de Mentzer

Nas anemias microcíticas / hipocrômicas um método auxiliar na diferenciação entre anemias ferroprivas e β -talassemias consiste na utilização do índice de Mentzer [7]. Este índice determina-se através do cálculo da razão entre VCM e GV:

$$\text{Índice Mentzer} = \frac{VCM}{GV}$$

Quando o valor da razão é superior a 13, este é indicativo de deficiência em ferro, detetando-se a diminuição de ambos os parâmetros, mas, principalmente, a da produção eritrócitaria (GV). Quando o resultado obtido é inferior a 13 torna-se sugestivo talassemia, devido à variação das características dos eritrócitos (diminuição do VCM) e à contagem eritrócitaria não alterada [7].

Existem outros índices para além do de Mentzer (Figura 7), que se baseiam noutros parâmetros para caracterização da patologia associada [7]. No entanto, este é referenciado na literatura como mais fiável na distinção entre anemias ferroprivas e talassemias.

Hematological index	Formula
Mentzer index (MI) (1973)	MCV/RBC
RDWI (1987)	MCV \times RDW/RBC
Shine and Lal (S and L) (1977)	MCV \times MCV \times MCH/100
Srivastava (1973)	MCH/RBC
Green and King (G and K) (1989)	MCV \times MCV \times RDW/Hb \times 100
Sirdah (2007)	MCV - RBC - (3 \times Hb)
Ehsani (2005)	MCV - (10 \times RBC)
England and Fraser (E and F) (1973)	MCV - (5 \times Hb) - RBC - 3.4
Ricerca (1987)	RDW/RBC
MDHL (1999)	(MCH/MCV) \times RBC

Figura 7 - Índices aplicados além do índice de Mentzer. Adaptada de VEHAPOGLU Aysel, et al. – Hematological Indices for Differential Diagnosis of Beta Thalassemia Trait and Iron Deficiency Anemia. 2014

Parâmetros Plaquetares

Contagem Plaquetar (PLT)

A quantificação das plaquetas é feita segundo o mesmo princípio de quantificação dos eritrócitos, baseando-se a distinção destes dois elementos no tamanho. No momento em que

são separados, estes são quantificados individualmente e o resultado das plaquetas é dado em $PLT \times 10^9/l$. Os valores de referência das plaquetas são $280 \pm 130 \times 10^9/l$ [6].

Volume Plaquetar Médio (PMV)

O volume plaquetar médio é obtido pela média do volume das plaquetas contabilizadas. O resultado é dado em fL e os valores de referência são 7,9 a 13,7 fL (homens) e 8 a 13,2 fL (mulheres) [6].

Índice de Dispersão de Volume Plaquetar (PDW)

Este índice é a medida que permite avaliar a heterogeneidade da população plaquetar. Está relacionada com o desvio padrão do volume plaquetar médio.

Esfregaço de Sangue Periférico

Ao analisar o hemograma de um indivíduo, são seguidas as normas de avaliação do laboratório estabelecidas pelo diretor técnico, segundo as quais determinadas alterações em certos parâmetros tornam prioritária a realização de um esfregaço sanguíneo da amostra, utilizando a coloração de *MayGrünwald-Giemsa*, para observação por microscopia ótica. Os critérios estabelecidos no laboratório são os seguintes:

- Leucócitos superiores a $8,0 \times 10^9/l$
- Inversão de fórmula igual ou superior a 10%
- Monócitos superiores a 14%
- Basófilos superiores a 2%
- RDW superior a 15
- RDW superiores a 14 se constantes eritocitárias alteradas
- Plaquetas inferiores a $150 \times 10^3/\mu l$ (se não houver histórico de trombocitopenia)
- Outras situações que o exijam, tais como alarmes do aparelho, leucocitoses elevadas

As vantagens da observação do esfregaço sanguíneo consistem na contagem manual com observação das características morfológicas das células (leucócitos, eritrócitos e plaquetas), na deteção de células imaturas e até na deteção de parasitas sanguíneos (por exemplo *Plasmodium spp*). Este trabalho é realizado por um profissional, devidamente habilitado na área de hematologia laboratorial, e com experiência na observação de esfregaços de sangue periférico por microscopia ótica.

Elaboração de um Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço de sangue periférico consiste em colocar uma gota de sangue venoso, com anticoagulante EDTA, próxima da extremidade de uma lâmina. Utilizando uma lamela é feita a aproximação e contacto com a gota de sangue, num ângulo de 30/45 graus de inclinação, para o lado oposto ao sentido de deslizamento. Ao deslizar a lamela sobre a lâmina, a gota é espalhada de uma forma uniforme sobre a superfície da lâmina (Figura 8). Esta técnica permite criar uma camada fina de células, facultando a observação das células sem estas estarem sobrepostas.

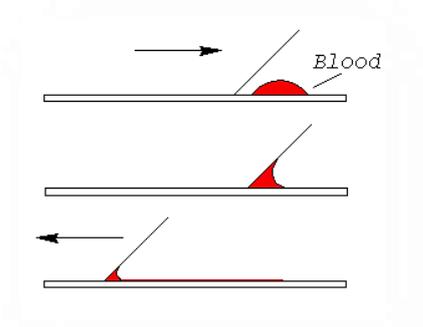


Figura 8 - Técnica de Esfregaço de sangue periférico

Coloração MayGrünwald-Giemsa

Após a realização do esfregaço é necessário deixar secar bem (fixação física) para corar assim que possível. A técnica de coloração usada no CSMC para diferenciação morfológica e citoquímica das células utilizada é a de *MayGrünwald-Giemsa*, que consiste na coloração dos elementos celulares ácidos por parte da eosina, e na coloração dos elementos básicos por parte do azul-de-metileno. A coloração consiste:

Elaboração da solução corante (diariamente):

1 Volume de *Giemsa* + 2 Volumes de *MayGrünwald* + 3 Volumes de Água tamponada

Coloração da lâmina:

1º – Cobrir toda a lâmina com metanol (esperar 3 minutos); 2º – Desprezar o metanol; 3º – Cobrir a lâmina com solução corante (2 minutos); 4º – Lavar a lâmina com água destilada; 5º – Deixar secar a lâmina

Observação do Esfregaço de Sangue Periférico

Após realização do esfregaço e respectiva coloração, é determinada a fórmula leucocitária por microscopia ótica pela observação de vários campos na zona fina do esfregaço (onde os eritrócitos não estão sobrepostos mas sim justapostos) e pelo uso objetiva de 100x com óleo de imersão. São contados os leucócitos, assim como cada subpopulação (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos), até perfazer um total de 100, usando-se, para isso, um contador manual. A contagem manual e observação do esfregaço é importante para confirmar e avaliar leucocitoses, leucopenias, falsas trombocitopenias, características morfológicas dos eritrócitos e das plaquetas. Também é possível detectar células estranhas ao sangue periférico, alterações morfológicas fisiológicas e presença de organismos parasitários.

Alterações nos Leucócitos

Existem alterações associadas aos leucócitos que são detectadas no hemograma (leucopenias, inversão de fórmula e leucocitose) e alterações morfológicas que são detectadas por observação do esfregaço de sangue periférico. Pelo esfregaço sanguíneo é possível avaliar as leucopenias e leucocitoses assim como identificar células precursoras de cada linhagem e variações da morfologia das células ^[3,6].

Neutrófilos

Num adulto saudável, os neutrófilos são mais de metade dos leucócitos em circulação. Eles são os principais responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas (neutrofilia). Um neutrófilo normal possui um núcleo segmentado, e quando corado (*MayGrünwald-Giemsa*), apresenta um citoplasma rosado/alaranjado com uma granulação fina. A maioria dos neutrófilos apresenta 3 segmentos nucleares conectados por uma fina banda de cromatina ^[3,6]. Contudo, indivíduos saudáveis podem também apresentar núcleos com 4 ou 5 segmentos ou até mesmo neutrófilos sem núcleo segmentado (em N ou em Banda) por norma em quantidades mínimas ^[3,6].

As células com alterações morfológicas que se identificam com mais frequência em esfregaços de rotina, são neutrófilos com granulação tóxica (infecções severas) (Figura 9), neutrófilos hipogranulares (Síndrome mielodisplásico) (Figura 10), corpos de *Döhle* (infecção

bacteriana) (Figura 11), neutrófilos anormais típicos da anomalia de Alder-Reilly (Figura 12) e neutrófilos hipossegmentados (Anomalia de Pelger-Huët) [3, 6].

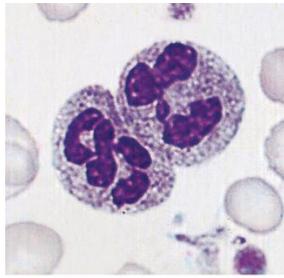


Figura 9 - Neutrófilos com granulação tóxica. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

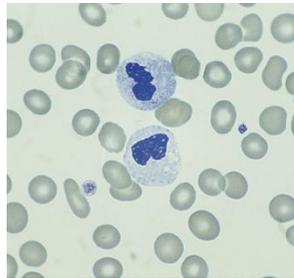


Figura 10 - Neutrófilos hipogranulares. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

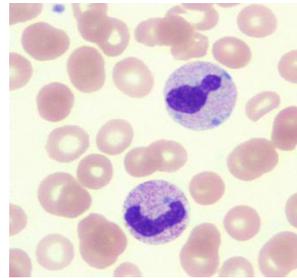


Figura 11 - Neutrófilos com presença de Corpos de Döhle. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

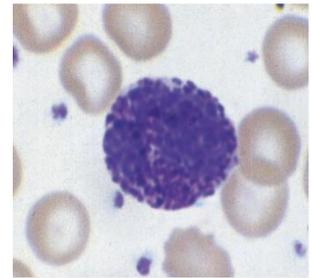


Figura 12 - Neutrófilo com anomalia de Alder-Reilly. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Linfócitos

O segundo tipo de leucócitos mais prevalente em circulação são os linfócitos. Estes são, na sua maioria, células pequenas com muito pouco citoplasma e o seu núcleo é uniforme, preenchendo a maioria do espaço intracelular. Aproximadamente 85% dos linfócitos em circulação são linfócitos T ou NK (*Natural Killer cells*) sendo que os outros 15% são linfócitos B. Em infecções, tanto virais como bacterianas, são visíveis linfócitos (B) transformados (imunoblastos) cujo núcleo é arredondado, abundante e o citoplasma fortemente basofílico [3] [6]. Contudo, estes linfócitos podem maturar para plasmócitos sendo estes vistos, ocasionalmente, no sangue em infecções severas (Figura 13). Em infecções virais, aparecem em circulação linfócitos reativos. Estas células apresentam um núcleo maior e mais estendido assim como uma maior área de citoplasma, ainda que irregular (Figura 14) [3,6]. São células fortemente presentes em casos de mononucleose infecciosa.

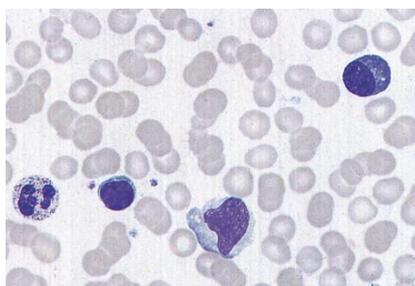


Figura 13 - Imunoblasto e Plasmócito. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

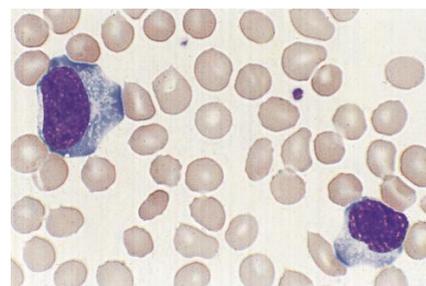


Figura 14 - Linfócitos reativos. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Em circulação também poderão estar presentes células linfóides que têm uma enorme variação na sua morfologia. Entre as doenças malignas associadas à presença deste tipo de células destacam-se a leucemia linfocítica crónica, leucemia prolinfocítica, leucemia linfoblástica aguda (Figuras 15, 16 e 17 respectivamente), assim como diferentes formas de linfomas ^[3,6].

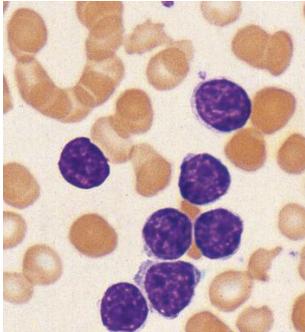


Figura 15 - Células linfóides - Leucemia linfocítica. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Pratical Haematology. 2006*

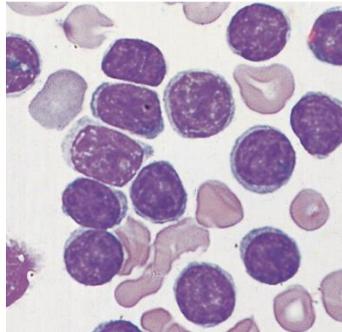


Figura 16 - Células linfóides - leucemia prolinfocítica. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Pratical Haematology. 2006*

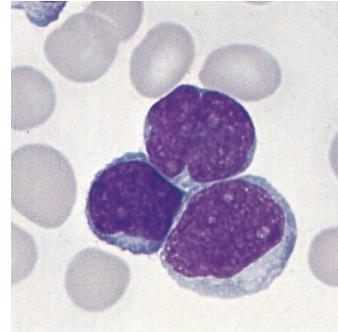


Figura 17 - Células linfóides - leucemia linfoblástica aguda. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Pratical Haematology. 2006*

Monócitos

Os monócitos são os maiores leucócitos em circulação. Possuem um citoplasma de cor azul esbatido, núcleo grande e curvado sem segmentação. O aumento desta população celular ocorre em algumas doenças crónicas e em doenças inflamatórias tais como a tuberculose, a doença de *Crohn* e a leucemia mieloide crónica (Figura 18) ^[3,6].

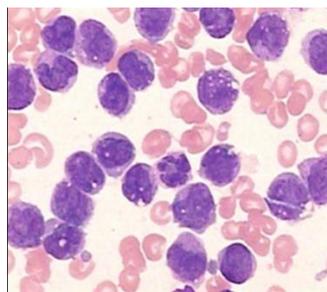


Figura 18 - Aumento de monócitos em circulação. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Pratical Haematology. 2006*

Eosinófilos e Basófilos

Os eosinófilos são um pouco maiores que os neutrófilos. Usualmente têm dois lobos nucleares e o seu citoplasma está preenchido com grânulos esféricos laranjas (eosinofílicos). Situações de eosinofilia moderada ocorrem em casos de alergia, verificando-se que incidentes

severos de eosinofilia estão relacionados com infecções parasitárias, eosinofilia reativas, leucemia eosinofílica, e síndrome idiopático hipereosinofílico [3,6].

Os basófilos são os leucócitos em circulação em menor número. Os seus segmentos nucleares tendem a enrolar-se, originando um núcleo irregular, denso e compacto, semelhante a uma flor de lótus. O seu tamanho é variável e o citoplasma é preenchido por grânulos roxos/azuis escuros [3,6]. Como têm um núcleo carregado, a sua identificação torna-se simplificada por esta característica. As ocorrências de basofilia estão normalmente ligadas a infecções parasitárias e, em casos mais graves, a síndromes mieloproliferativos, mais especificamente, a leucemia mieloide crónica [3,6].

Alterações no Eritrócito

As alterações na população eritrocitária podem ter impacto profundo no organismo. Estão frequentemente associadas a anemias e outras alterações como aumento da concentração de hemoglobina (fumadores, alta altitude), alterações estruturais do eritrócito e alterações na disposição dos eritrócitos, esta última causada pela presença de anticorpos no plasma sanguíneo [3,6]. O tempo de vida médio do eritrócito em circulação é aproximadamente 120 dias.

Anemias

A hemoglobina é o constituinte fundamental dos eritrócitos, que atribui a esta célula a capacidade de transportar o O_2 e o CO_2 no organismo através do sistema circulatório. A patologia mais comum na população eritrocitária é a anemia que está diretamente ligada aos níveis de hemoglobina [8].

A hemoglobina é uma proteína de estrutura quaternária, composta por quatro cadeias polipeptídicas (globinas) ligadas a quatro grupos heme (anel de porfirina com um ião de Fe^{2+} no centro). É ela a responsável pela ligação ao oxigénio disponível. As quatro globinas constituintes da hemoglobina num indivíduo normal adulto são constituídas por duas cadeias alfa e duas cadeias beta [8]. Uma anemia é definida pelo défice de hemoglobina no organismo. Esta alteração pode influenciar o VCM da população eritrocitária, o que possibilita separar as anemias em três grupos (Tabela 7) [8].

Tabela 7 - Anemias [8, 9]

Anemias (diferenciadas por MCV)		
Microcítica HGB baixa e VCM baixo	Normocítica HGB baixo e VCM normal	Macroscítica HGB baixo e VCM alto
<ul style="list-style-type: none"> Baixa concentração de Ferro (Anemia ferropriva) 	<ul style="list-style-type: none"> Perda de sangue, por hemorragia externa ou interna (Anemia hemorrágica aguda) 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa concentração de folato (dieta) (Def. em ácido fólico) Def. Vitamina B12
<ul style="list-style-type: none"> Efeito inibitório das proteínas inflamatórias (Anemia por doença crónica) 	<ul style="list-style-type: none"> Défice de produção de eritropoietina (Anemia por Insuf. Renal Crónica) 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa concentração de vitamina B12 (absorção) (Anemia perniciosa)
<ul style="list-style-type: none"> Deficiência da produção do grupo Heme (Anemia sideroblástica) 	<ul style="list-style-type: none"> Hipotiroidismo Hipertiroidismo <i>Síndrome Cushing</i> Insuficiência na pituitária (Anemia por Disf. Endócrina) 	<ul style="list-style-type: none"> Hemólise induzida por fármacos
<ul style="list-style-type: none"> Hemólise provocada envenenamento (Chumbo) 	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpos autoimunes (Anemia hemolítica autoimune) 	<ul style="list-style-type: none"> Alcoólicos Deficiência da hormona reguladora do ferro – hepcina (Doença hepática)
<ul style="list-style-type: none"> Anormalidades nas cadeias de globinas constituintes da hemoglobina (Hemoglobinopatias) Alfa e Beta Talassémia (Talassémia) 		<ul style="list-style-type: none"> Produção ineficaz das linhagens celulares sanguíneas (Síndrome mielodisplásico)

Alterações Morfológicas

Alterações na morfologia normal do eritrócito sugerem patologia eritrócitaria, sendo a causa da patologia associada, diretamente ou indiretamente, ao eritrócito. Os responsáveis pela alteração morfológica podem ser estruturais a nível do citoesqueleto e membrana celular, ou associados a processos de divisão e maturação dos eritrócitos (hemoglobina, hormonas, ferro, vitaminas). Para uma melhor explicação de cada alteração morfológica e respectivo fator responsável, as morfologias mais frequentemente observadas por microscopia serão descritas e devidamente explicadas nos tópicos seguintes [3, 9].

Macrocitoses e Microcitoses

A macrocitose e a microcitose são alterações morfológicas que se definem pela alteração do tamanho da população eritrocitária. O parâmetro presente no hemograma que avalia esta alteração é o VCM e, no esfregaço sanguíneo, o principal indicador desta alteração é o aumento ou diminuição do tamanho da população eritrocitária [3, 9].

Células em Alvo

Os eritrócitos com esta morfologia são distintos dos normais pela sua característica típica de célula em alvo: a zona central do eritrócito é mais carregada de hemoglobina assim como a zona periférica da célula (Figura 19). Estas células são particularmente comuns em hemoglobinopatias e em deficiências severas em ferro, podendo também surgir em anemias hemolíticas e após esplenectomia [3, 9].

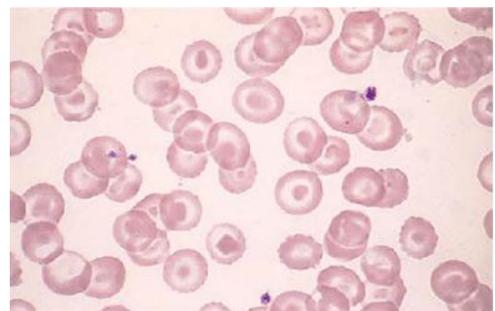


Figura 19 - Células em Alvo. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Drepanócitos (Sickle Cells)

A drepanocitose apresenta morfologia característica. Devido a uma malformação da hemoglobina que precipita, o eritrócito adquire uma morfologia em forma de foice. Esta deficiência é causada por, pelo menos, uma mutação no gene responsável pela produção de hemoglobina, o que leva o organismo a produzir hemoglobina S (responsável pela morfologia) (Figura 20). A drepanocitose é a variação morfológica típica de anemia falciforme, que pode por consequência cursar com anemia hemolítica (devido à instabilidade e ao menor tempo de vida dos eritrócitos) [3, 9].

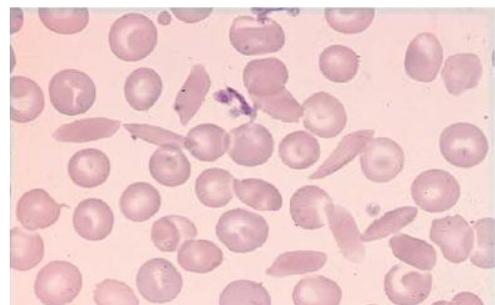


Figura 20 - Drepanócitos: Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Estomatócitos

A morfologia característica dos estomatócitos é um enrolar da célula que, na coloração, se apresenta como um sinal de “sentido proibido” (Figura 21). Estas células são encontradas em estomatocitoses muito raras, em outras anemias e em indivíduos alcoólicos [3, 9].

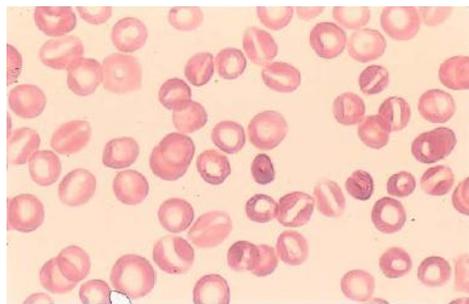


Figura 21 - Estomatócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Esferócitos

Os esferócitos são visíveis pela alteração da típica da forma do eritrócito (bicôncava) para uma forma esférica. Esta modificação ocorre devido à instabilidade da membrana da célula (Figura 22) e surge associada a mutações no gene da banda 3 surgindo à esferocitose hereditária e anemia hemolítica autoimune [3, 9].

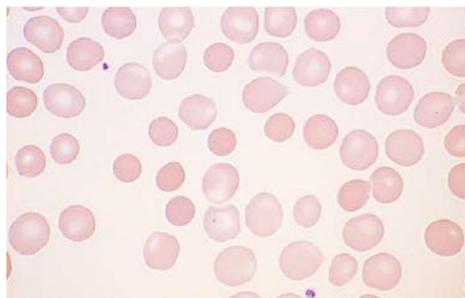


Figura 22 - Esferócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Acantócitos

A morfologia eritrócitaria é caracterizada por uma superfície celular irregular, normalmente bem visível (Figura 24). Os acantócitos estão presentes em anomalias hereditárias raras tal como α - β -lipoproteinémia. Estão também relacionados com casos de urémia (falência hepática), sabendo-se que a presença de um elevado número de acantócitos é considerada mau prognóstico [3, 9]. A formação de acantócitos também está ligada ao abuso de álcool e de alguns tipos de drogas.

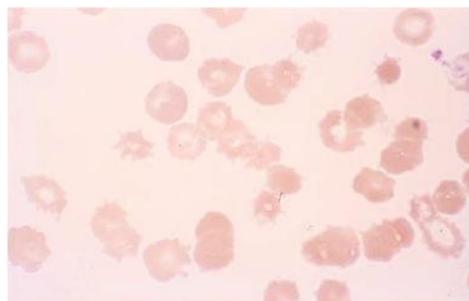


Figura 23 - Acantócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Eliptócitos

Os eliptócitos são eritrócitos anormais e estão relacionados com deficiências na membrana da célula que lhes conferem a forma em “charuto” (Figura 23). Os eliptócitos estão associados à eliptocitose hereditária [3, 9].

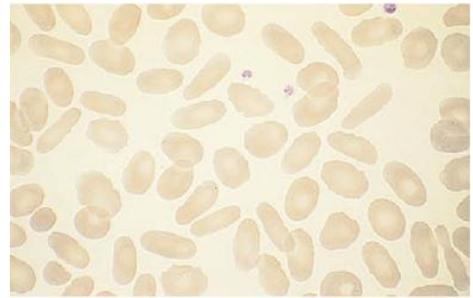


Figura 24 - Eliptócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Corpos de Heinz

Os corpos de Heinz são visualizados como inclusões no interior dos eritrócitos, inclusões estas compostas de hemoglobina desnaturada (Figura 25). Esta alteração morfológica está associada a hemoglobinas instáveis e anemias hemolíticas [3, 9].

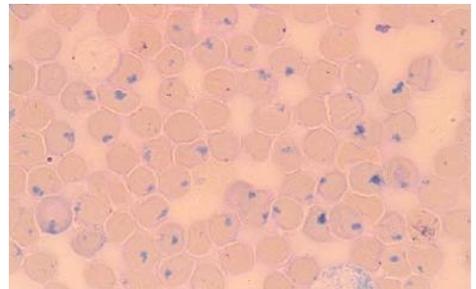


Figura 25 - Corpos de Heinz. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology*. 2006

Eritrócitos em “Rouleaux”

No caso de visualização de eritrócitos empilhados (“pilha de moeda” ou *Rouleaux*), a alteração que se verifica não é ao nível morfológico do eritrócito mas sim ao nível da sua anormal distribuição na lâmina (Figura 26). Este acontecimento está relacionado com casos de mieloma múltiplo e macroglobulinemia, situações em que se deteta um aumento acentuado das proteínas plasmáticas que promovem a agregação eritrócitaria (globulinas, albumina e fibrinogénio) [3, 9].

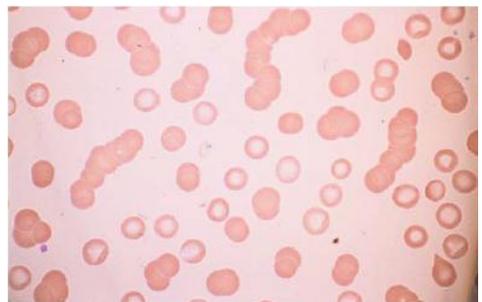


Figura 26 - Eritrócitos em “rouleux”. Adaptada de LEWIS S., et al. – *Dacie and Lewis: Practical Haematology* 2006

Corpos Howell Jolly

Corpos de Howell-Jolly são inclusões eritrócitárias, arredondadas, compostas de fragmentos de ADN (Figura 27). Este fenómeno pode resultar de uma fragmentação do núcleo ou por uma expulsão nuclear incompleta no processo de maturação. Estes corpos são, normalmente, removidos da circulação pelo baço, embora possam ser encontrados no sangue periférico após esplenectomia e na ocorrência de anemias megaloblásticas [3, 9].

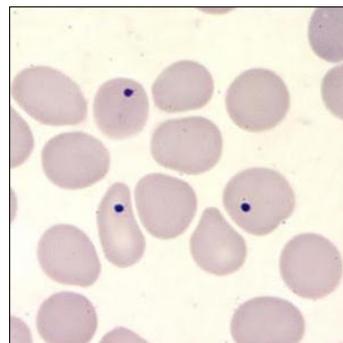


Figura 27 - Corpos de Howell Jolly. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Outras colorações para visualização hematológica

Siderócitos

Os siderócitos são eritrócitos que contêm grânulos de ferro (Figura 28). São comuns em anemias hemolíticas severas, aparecem também em casos de envenenamento por chumbo e de anemia perniciosa [3, 9]. A coloração de *Perls* é utilizada na observação de esfregaços de medula óssea.

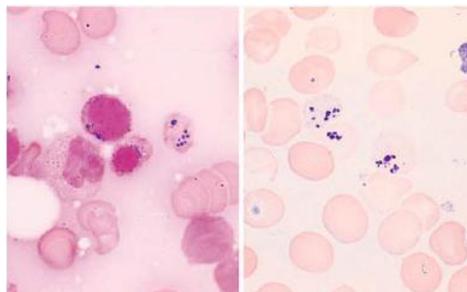


Figura 28 - Siderócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Reticulócitos

Os reticulócitos são células precursoras do eritrócito no estágio imediatamente anterior ao da célula madura. Contudo, podem ser libertados no sistema circulatório precocemente, para colmatar a baixa concentração de RBC ou alterações na eritropoiese [3, 9]. Como ainda têm presente, no seu citoplasma, resíduos de ARN ribossomal podem ser identificados por uma coloração supravital com azul de cresil brilhante (novo azul de metileno) (Figura 29).

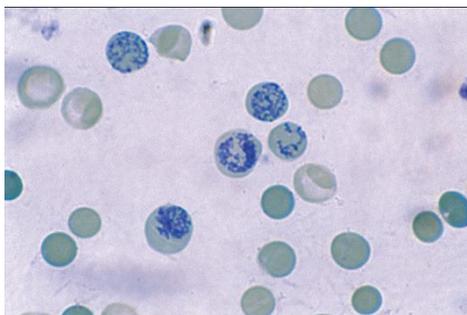


Figura 29 - Reticulócitos. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Alterações plaquetares

Plaquetas gigantes

Esta alteração morfológica está normalmente associada a um número baixo de plaquetas (hemograma) e conseqüentemente à presença de plaquetas gigantes no esfregaço de sangue periférico (Figura 30). Estas estão associadas ao síndrome mielodisplásico [3, 9].

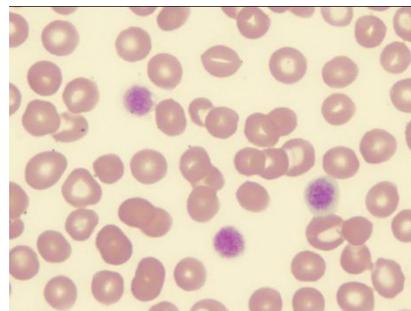


Figura 30 - Plaquetas gigantes. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Agregados plaquetares

Este fenômeno caracteriza-se por uma contagem baixa de plaquetas no hemograma, sendo visíveis no esfregaço por microscopia óptica, plaquetas agrupadas que formam aglomerados de tamanhos variados (Figura 31). Esta formação plaquetar é provocada pela ação de auto anticorpos na superfície plaquetária [3,9]. Esta ocorrência está associada à pseudotrombocitopenia na presença de EDTA. Nestes casos é usado citrato ou heparina como anticoagulante alternativo.

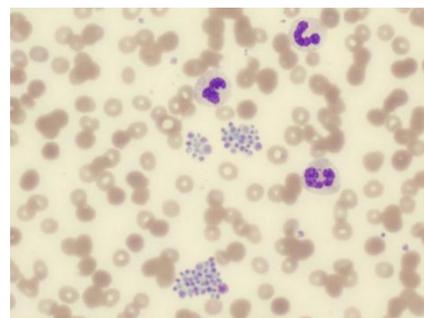


Figura 31 - Agregados plaquetares. Adaptada de LEWIS S., et al. – Dacie and Lewis: *Practical Haematology*. 2006

Hemostase

A hemostase é um processo fisiológico que tem como principal objetivo parar uma hemorragia após uma lesão vascular. Este processo está em constante equilíbrio e pretende manter a fluidez na circulação sanguínea (cascata da coagulação e sistema fibrinolítico). Os seus intervenientes são o tecido vascular, as plaquetas e os fatores de coagulação (pró-coagulantes e anticoagulantes). O evento é constituído por três fases que se desenrolam durante todo o processo, desde o início da lesão até à sua regeneração. Estas fases denominam-se de hemostase primária, coagulação e fibrinólise [10, 11]. Existem fatores de coagulação em circulação nas formas ativa e inativa que contribuem e atuam nas fases

enunciadas. Estes fatores atuam de forma sequencial, constituindo um sistema de reações em cascata com o objetivo de formar um coágulo de fibrina. Os fatores de coagulação são 12 (descritos em numeração romana), sendo sucedidos da letra *a* quanto estão na sua forma ativa [10, 11]. Na sua grande maioria são enzimas, excetuando os fatores IV (ião), V e VII sendo os último dois glicoproteínas. Os 12 fatores de coagulação estão indicados na Tabela 8 assim como os seus locais de produção [10, 11].

Tabela 8 - Fatores de Coagulação [10, 11]

Fatores de Coagulação		
Fator	Nome	Local de síntese
I	Fibrinogénio	Fígado
II	Protrombina	Fígado - Vit.K dependente
III	Fator tecidual	Vários tecidos
IV	Cálcio	-
V	Proacelerina	Fígado
VII	Proconvertina	Fígado - Vit.K dependente
VIII	Fator anti hemofílico	Vários tecidos
IX	Factor Christmas	Fígado- Vit.K dependente
X	Factor Stuart-Prower	Fígado- Vit.K dependente
XI	Tromboplastina plasmática	-
XII	Factor Hageman	-
XIII	Estabilizador Fibrina	Fígado

A hemostase primária ocorre imediatamente após uma lesão vascular, em que o endotélio e o tecido conjuntivo endotelial lesado libertam fatores que provocam vasoconstrição no respetivo vaso, e, em simultâneo, ocorre um espasmo muscular (musculo liso do vaso) que provoca a contração do mesmo [10, 11]. O tecido lesado liberta colagénio que, ao ser exposto após a lesão, se liga à proteína de superfície das plaquetas presentes. Esta ligação é mediada pelo fator de *vonWillebrand*. Durante este processo, inicia-se a ativação plaquetar, em que as plaquetas mudam a sua conformação e segregam grânulos com tromboxano A2, ADP e fator de agregação plaquetário, que promovem a agregação das plaquetas, formando o chamado trombo hemostático primário [10, 11].

Após a hemostase primária, inicia-se o processo de coagulação, que resulta num coágulo de fibrina insolúvel. Neste processo atuam os fatores de coagulação numa reação em

casca, descrita em duas vias distintas: a via intrínseca e via extrínseca, como está referido na Figura 32, obtida por simulação *in vitro* (esquema e vias são apenas para efeitos académicos e laboratoriais).

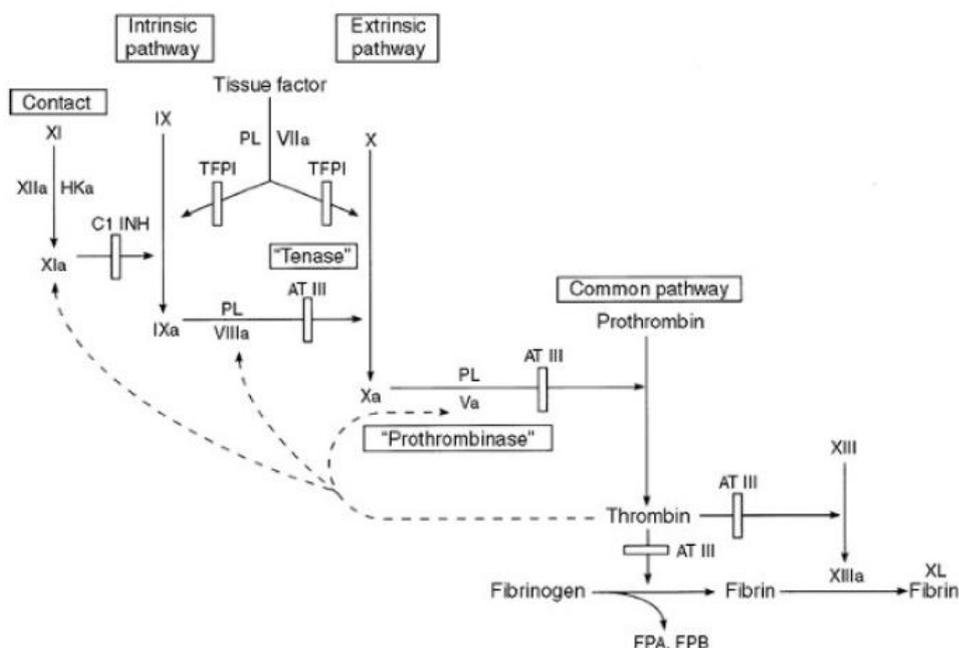


Figura 32 - Esquema da Cascata de coagulação. Adaptada de COLMAN Robert, et al. – Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice

A fibrinólise consiste na degradação do excesso de fibrina de modo a não comprometer o sistema vascular. É um processo localizado e catalisado pela própria fibrina. A dissolução ou degradação do coágulo de fibrina é feita pela plasmina (obtida a partir do plasminogénio). Para tal é necessária uma cascata de eventos ocorridos de um modo semelhante ao da coagulação. As células endoteliais libertam tPA (*tissue-type plasminogen activator*) após uma estimulação provocada pela trombina, que se liga fortemente à fibrina. A fibrina atua como um cofator eficiente na conversão de plasminogénio em plasmina, catalisada pelo tPA. A plasmina degrada a fibrina, obtendo-se produtos da degradação, que inibem a ação da trombina e da polimerização da fibrina, atuando como anticoagulantes naturais ^[10, 11]. Existe um segundo mecanismo de ativação do plasminogénio, mediado pelo uPA (*urokinase plasminogen activator*) e pelas enzimas lisossomais. A sequência da cascata de eventos está exposta na Figura 33.

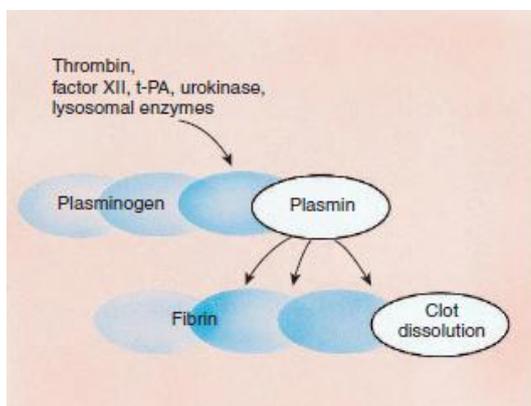


Figura 33 - Esquema da Fibrinólise. Adaptada de COLMAN Robert, et al. – Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.

Todo o processo de fibrinólise é sujeito a múltiplos mecanismos regulatórios, com o objetivo de equilibrar os processos de coagulação e anti-coagulação, mantendo a hemostase controlada.

Avaliação laboratorial da hemostase

No CSMC são feitos testes utilizando o plasma, que permitem a avaliação da coagulação, sendo estes caracterizados pela quantificação da concentração de fibrinogénio, pela determinação do tempo de protrombina (TP) e pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Para determinar tais parâmetros é utilizado o aparelho semiautomático, *OPTION 4 PLUS*, da *BioMerieux* (Figura 34), que se baseia na técnica de turbidimetria para a obtenção dos seus resultados.



Figura 34 - OPTION 4 PLUS da Biomerieux

A técnica de turbidimetria consiste num método que avalia a formação de partículas na amostra, através da dispersão da luz (turbidez da amostra). Para fazer a determinação o aparelho utiliza uma fonte de luz (lâmpada), luz essa que atravessa uma *cuvette* com a amostra, incidindo num detetor sensível à luz ^[5]. No aparelho *OPTION 4 PLUS*, o detetor avalia a quantidade de luz recebida durante um período de tempo e marca o tempo que a amostra leva até ficar turva (formação do coágulo). O princípio da técnica para determinação dos parâmetros é igual para todos os referidos, sendo que os reagentes utilizados e os tempos de reação são diferentes para cada um. Para estas determinações é usada uma amostra de sangue periférico, colhido para tubo com citrato de sódio, e centrifugado durante 10 minutos a 3000 rotações por minuto, para obtenção de plasma.

Tempo de Protrombina (TP)

O TP corresponde ao tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina após adição por excesso de tromboplastina (tecidual) e cálcio ao plasma. É um teste utilizado para monitorizar a terapêutica anticoagulante (varfarina), avaliar distúrbios da cascata de coagulação e como prova de função hepática. Este teste sugere principalmente a existência de deficiências na via extrínseca da coagulação (protrombina e fatores V, VII e X). Se existirem alterações

graves a nível do fibrinogénio, estas provocarão resultados anormais do TP, uma vez que o teste depende de um mecanismo da fibrina para produzir o coágulo.

Na determinação do TP, com objetivo de reduzir as diferenças entre os vários tipos de testes utilizados, procedeu-se a uma padronização das tromboplastinas, atribuindo-se a cada uma o seu ISI (índice de sensibilidade internacional). O INR (*International normalized ratio*) é obtido pela fórmula:

$$INR = \left[\frac{TP \text{ (indivíduo)}}{TP \text{ (controlo)}} \right]^{ISI}$$

Os valores de referência de INR são de 0,9 – 1,1, sendo que o INR recomendado na maioria dos casos de doentes hipocoagulados é entre 2 – 3.

Tempo Parcial de Tromboplastina ativada (TTPa)

O TTPa é uma determinação que avalia a atividade das vias intrínseca e comum da coagulação. É um teste ótimo para o diagnóstico de distúrbios na coagulação que não envolvam o fator VII (via extrínseca ou a função plaquetária). Este parâmetro é útil no rastreio da hemofilia A e B (entre outras coagulopatias), na deteção de inibidores da coagulação e na monitorização de terapias com anticoagulantes (heparina). O teste é realizado no plasma (livre de Ca^{2+} e de plaquetas), ao qual é adicionado cálcio, um fosfolípido que mimetiza as plaquetas, e, para dar início à reação, um ativador. O resultado desta análise é dado pelo tempo de formação do coágulo (em segundos). Os valores de referência variam de laboratório para laboratório, por razões relativas ao controlo, aos aparelho e aos reagentes.

Concentração de fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína sintetizada no fígado. Pela sua quantificação, é possível caracterizar não só hepatopatias ligeiras ou moderadas como outras patologias por esta ser uma proteína de fase aguda (marcador de risco cardiovascular).

O teste é efetuado numa amostra de plasma, colocada numa *cuvette* de reação (a 37°C), e à qual é adicionado um reagente (trombina em excesso), com o objetivo de iniciar a formação do coágulo. O fibrinogénio é quantificado por uma relação entre a velocidade de formação de

coágulo e a concentração presente na amostra (a concentração é inversamente proporcional ao tempo de formação do coágulo). Existe uma curva de calibração elaborada com valores conhecidos de concentração de fibrinogénio em função do tempo de formação do coágulo. Desta forma é possível quantificar o fibrinogénio presente na amostra. O resultado é dado em mg/dL e os valores de referência são de 232 – 504 mg/dL [6].

Velocidade de Sedimentação

A determinação da velocidade de sedimentação é um teste pouco específico mas sensível. A sua determinação é clinicamente útil em distúrbios associados ao aumento da produção de proteínas de fase aguda em inflamações e outras hiperproteinémias.

A velocidade de sedimentação é medida, na maior parte dos casos pelo método de *Westergren* (leitura manual ou automática). Este método consiste na utilização de um tubo específico com anticoagulante, em que, pela sedimentação dos eritrócitos, é possível avaliar em mm, a velocidade de sedimentação dos mesmos [5].

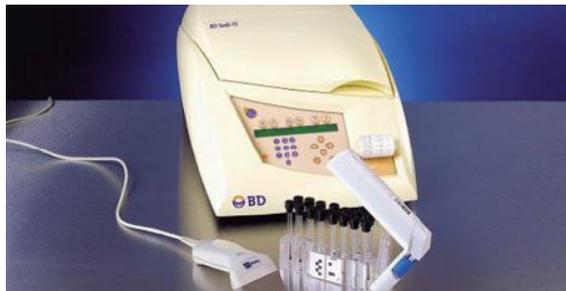


Figura 35 - BD Sedi-15 da Becton Dickinson

Este método pode ser feito manualmente, fazendo-se a leitura é feita ao fim de 1 hora, ou automaticamente, por um aparelho que faz uma extrapolação do tempo nas várias horas, baseando-se em apenas uma medida. No CSMC é usado o aparelho *BD Sedi-15*, da *Becton Dickinson* (Figura 35), que faz a leitura automática dos tubos. Os valores de referência à 1ª hora são 0-20 mm para o sexo feminino e 0-15 mm para o masculino [6].

Microbiologia Clínica

A Microbiologia Clínica engloba as áreas de bacteriologia, virologia, micologia e parasitologia, cada uma com a sua evolução nas últimas décadas. A ligação que estas áreas têm em comum é o estudo das infeções e consequentes patologias, causadas por microrganismos. A descoberta e a aplicação de antibióticos e vacinas teve um grande impacto em várias doenças infecciosas, sendo o tratamento das infeções um assunto que continua importante e em contínua evolução na sociedade científica da atualidade. Novos organismos patogénicos e novas estirpes que apresentam resistências aos antibióticos são constantemente descobertos, tornando os tratamentos pouco eficazes ou até mesmo ineficazes ^[15].

A abordagem à microbiologia focar-se-á na caracterização dos produtos biológicos usados na identificação e microrganismos patogénicos, assim como nos métodos, equipamento e processamento usados na análise.

Bacteriologia

Processamento Inicial dos Produtos Biológicos

No laboratório estão implementadas as seguintes normas e procedimentos adequados à colheita, transporte e receção dos produtos biológicos:

Colheitas dos produtos biológicos

- As amostras devem ser colhidas antes da terapêutica antibiótica ser instituída.
- A colheita deve ser feita tendo em conta, o tipo e o local da infeção, tentando evitar a contaminação com a flora comensal.
- No caso de pesquisa de M.O. anaeróbios, é imprescindível que as amostras sejam diretamente colhidas para um recipiente com meio de transporte apropriado, sem oxigénio.
- Os recipientes utilizados devem ser apropriados para o produto biológico pretendido: tamanhos adequados, materiais resistentes, identificáveis, estéreis e com o devido isolamento.
- O material e equipamento utilizados para a colheita são esterilizados, de modo a evitar contaminação do produto biológico colhido.

- A quantidade de produto biológico colhido deve ser suficiente para realizar os estudos pretendidos.

Transporte dos Produtos biológicos

Após a colheita dos produtos biológicos, estes devem chegar o mais rapidamente possível ao laboratório para serem processados e analisados. Para o transporte das amostras colhidas são necessários recipientes adequados (estanques e inquebráveis) assim como alguns cuidados, para que seja evitada a perda de viabilidade de alguns microrganismos ou o crescimento da flora indígena. Para transportar e preservar os produtos biológicos, o procedimento adequado consiste em:

- Utilizar meios de transporte específicos (se necessário).
- Manter as amostras à temperatura ambiente (mínimo tempo possível) se forem logo processadas, caso contrário, colocá-las a uma temperatura entre os 2 e os 8°C (no caso do microrganismo suspeito suportar essa temperatura).

Receção dos Produtos Biológicos

Na receção dos produtos biológicos, é obrigatório dar em especial atenção às seguintes condicionantes:

- se a amostra vem colhida no recipiente ou em meio adequado;
- se a amostra vem devidamente identificada, local anatómico da colheita, dados do doente e respetiva requisição do médico;
- se os tempos e material de transporte do produto biológico foram os adequados;
- se a quantidade de produto biológico é suficiente para realizar as determinações necessárias e se é a indicada para o estudo pedido na requisição clínica.

Exame Microscópico e Cultura de Produtos Biológicos

Coloração de Gram

A técnica de Gram foi desenvolvida por Hans Christian Gram e foi pela primeira vez mencionada numa publicação científica em 1883. Atualmente é a coloração mais utilizada em microbiologia. O processo da coloração, após fixação, está descrito resumidamente na Figura 36 e permite diferenciar as bactérias em dois grupos: bactérias de Gram positivo e de Gram

negativo. Devido à sua morfologia, estas bactérias coram de roxo (corante primário – violeta genciana) ou rosa-avermelhado (corante secundário – fucsina diluída) após a aplicação da coloração numa amostra biológica ^[12].



Figura 36 - Coloração de Gram

Avaliação primária

Pela observação microscópica é feita uma avaliação primária da flora bacteriana, em alguns produtos, como é o caso da expetoração, em que são quantificados os leucócitos e células epiteliais.

Após a avaliação primária são escolhidos os meios de cultura indicados para os principais agentes infecciosos do produto biológico em causa, onde é semeado o produto e incubado em estufa, a diferentes temperaturas e atmosferas de acordo com a natureza da amostra e o estudo pretendido. Após a incubação, é feita uma avaliação macroscópica das culturas, como se representa na Figura 37.



Figura 37 - Parametros da avaliação macroscópica

Meios de Cultura Sólidos e Líquidos

Gelose de Columbia com 5% de Sangue de Carneiro

Este meio de cultura é um meio de isolamento primário em que crescem a maioria das bactérias ^[13]. A sua principal característica é o uso de:

- Sangue de carneiro que permite a avaliação da hemólise.

Gelose de Columbia com 5% de Sangue de Carneiro com CNA

A base do meio de cultura é Gelose de Columbia com 5% de sangue de carneiro e CNA: Colistina e Ácido nalidíxico.

Estes antimicrobianos selecionam o crescimento de bactérias de Gram positivo ^[13].

Gelose de Chocolate *PolyViteX*

Meio seletivo para isolamento de *Haemophilus spp* ^[13]. As principais características deste meio são:

- Base nutritiva com fatores X (hemina) e V (NAD);
- *PolyViteX* (fornece fator V).

Gelose de Chocolate *PolyViteX* VCAT3

Meio seletivo para isolamento de *Neisseria spp* ^[13]. As principais características deste meio são:

- Base nutritiva com factores X (hemina) e V (NAD);
- *PolyViteX* (fornece fator V);
- VCAT (Vancomicina, Colistina, Anfotericina B e Trimetoprim-sulfametoxazole).

A associação destes antibióticos oferece seletividade ao meio, inibindo a maior parte das bactérias e leveduras presentes nas amostras ^[13].

CLED (Cysteine lactose electrolyte deficient)

Meio de cultura usado frequentemente em bacteriologia em amostras de urina, pela sua particularidade de evitar a proliferação (“swarming”) de espécies de *Proteus spp* e promover a identificação das outras espécies ^[13]. As suas principais características são o uso de:

- Extrato de carne, peptonas de caseínas e gelatina (nutrientes);
- Lactose (permite a deteção de organismos que a fermentem);
- Azul de bromotimol (indicador de pH);
- Fontes de eletrólitos reduzidas (minimiza a proliferação de espécies de *Proteus spp*).

Hektoen

O meio Hektoen é um meio seletivo utilizado na cultura de microrganismos entéricos Gram negativo, especialmente para o isolamento de *Shigella spp* e da *Salmonella spp* provenientes de amostras fecais ^[13]. As principais características do meio são a existência de:

- Sais biliares (inibem as bactérias de Gram positivo e reduzem o crescimento de algumas bactérias de Gram negativo);
- Lactose, sacarose e salicina (fermentação);
- Azul de bromotimol e fucsina ácida (indicador de pH);
- Citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio (permite deteção da produção de sulfureto de hidrogénio da *Salmonella spp*).

Neste meio é possível distinguir não só colónias de *Salmonella spp* pelo centro negro (produção de H₂S) das colónias incolores de *Shigella spp*, como detetar também colónias de *Escherichia coli* pela alteração do pH do meio (fermentação dos açúcares presentes no meio) ^[13].

XLD (Xylose lysine Deoxycholate)

O meio de XLD possui características que o permitem isolar e identificar as estirpes de *Shigella spp* e *Salmonella spp* ^[13]. A principal composição deste meio é:

- Desoxicolato de sódio: tem ação inibitória nas bactérias de Gram positivo;

- Xilose: que permite distinguir a *Shigella spp* das outras bactérias, porque não fermenta a xilose;
- Lisina: que permite diferenciar a estirpe de *Salmonella spp*, pela descarboxilação deste aminoácido;
- Citrato férrico amoniacal e tiosulfato de sódio: que permitem a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio pela *Salmonella spp*;
- Vermelho de Fenol: indicador de pH.

Neste meio é possível diferenciar a *Salmonella spp*, pela formação de um halo rosa (descarboxilação da lisina) e centro negro (produção de H₂S), a *Shigella spp* pelas suas colónias incolores e a *Escherichia coli* pela alteração do pH do meio e colónias amarelas (fermentação da lactose e sucrose) ^[13].

CIN

O meio de CIN é um meio seletivo utilizado no isolamento de *Yersinia enterocolitica* ^[13]. Os constituintes do meio que provocam uma inibição seletiva da maioria das bactérias de Gram positivo e negativo são:

- Manitol (fermentado pela *Yersinia enterocolitica*);
- Cristal violeta (inibidor bacteriano);
- Desoxicolato de sódio (inibidor bacteriano);
- Antimicrobianos;
- Vermelho Neutro (indicador de pH).

Sabouraud

O meio de *Sabouraud* é utilizado na cultura e isolamento de fungos provenientes de amostras clínicas. A elevada concentração de glucose no meio proporciona uma vantagem no desenvolvimento dos fungos (osmotolerantes), contrariando o comportamento da maioria das bactérias que não toleram a elevada concentração de glucose. Além das concentrações de açúcar o meio também tem um baixo pH, ideal para os fungos e prejudicial para as bactérias ^[13]. Os principais constituintes deste meio são:

- Glucose;
- Peptonas (caseína e tecido animal).

Este meio pode ser suplementado com antibióticos (ex: cloranfenicol) quando o objetivo é de evitar o crescimento de estirpes bacterianas e promover o crescimento de fungos ^[13].

Caldo Cérebro Coração (*Brain heart infusion*)

Este é um meio de cultura nutritivo, tamponado, que contém infusões de tecido cerebral, cardíaco e peptonas. Estes componentes contribuem com proteínas e outros nutrientes para o crescimento de microrganismos. Na constituição deste meio também encontramos cloreto de sódio, que atua como um agente seletivo, interferindo no desenvolvimento dos microrganismos intolerantes ao sal ^[13].

“Cooked Meat”

O Cooked-Meat é um meio de cultura líquido de enriquecimento, utilizado na cultura de pequenas quantidades de amostra. A observação deste meio permite interpretar e diferenciar metabolismos dos microrganismos, pela formação de gás, digestão da carne e pela turvação do meio. Na sua formulação, o meio contém carne cozida, tecido animal digerido, dextrose e cloreto de sódio ^[13].

Caldo GN

O caldo GN tem como objetivo promover o crescimento das bactérias de Gram negativo. Contém hidrolisados enzimáticos de caseína e de tecido animal que fornecem os aminoácidos e outras substâncias azotadas que sustentam o crescimento bacteriano. O manitol está presente em elevada concentração em detrimento das outras fontes de energia (dextrose), para otimizar o crescimento das espécies fermentadoras de manitol *Salmonella spp* e *Shigella spp*, limitando o crescimento de outras bactérias fermentadoras da dextrose ^[13].

Produtos biológicos

Urina

As amostras de urina podem ser colhidas por punção suprapúbica, através de sonda, ou por jato intermédio. O jato intermédio é colhido na primeira urina da manhã, normalmente pelo doente, existindo a necessidade de instruí-lo para que realize uma recolha adequada do produto, tendo como finalidade evitar possíveis contaminações. A punção suprapúbica é um ato médico (método invasivo), realizado em doentes com suspeita de infeção por bactérias anaeróbias ou com incapacidade de urinar. A colheita a partir de sonda vesical é utilizada em indivíduos imobilizados ou incapazes de urinar. A cultura de urina por rotina é realizada nos meios e condições que estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Meios de cultura para urina ^[13]

Meios de cultura para urina (ança de 10µl)			
Meios	Atmosfera/temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
CLED	Aerobiose / 35-37°C	18-24 horas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp</i>
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Aerobiose / 35-37°C	18-24 horas	<i>Streptococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Staphylococcus spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas spp</i>

Após o tempo de incubação é feita uma observação visual dos meios, seguida de uma quantificação das unidades formadoras de colónias (UFC), que permitem avaliar se estamos perante uma infeção bacteriana ($UFC \geq 10^5$ UFC/ml).

Fezes

A análise a este produto biológico é realizada em situações de suspeita de infeção bacteriana persistente ou suspeita de infeção parasitária. As amostras de fezes devem ser colhidas em frascos de plástico de boca larga, estéreis, sendo que, em casos de suspeita de infeções de infeção parasitária, são feitas 3 colheitas, em dias diferentes, do produto biológico.

Na chegada da amostra ao laboratório, deve ser realizada uma avaliação macroscópica das características das fezes pela observação da sua consistência (sólidas, pastosas ou líquidas), assim como uma verificação da existência de sangue, pus ou muco. Na rotina laboratorial, quando é pedida uma coprocultura, são realizadas culturas e testes direcionados à pesquisa de *Salmonella spp* ou de *Shigella spp*. Na rotina, é utilizado um meio de enriquecimento, nomeadamente caldo GN, incubado em estufa a 37°C, durante 4 a 6 horas. O GN promove o crescimento de *Shigella spp* e da *Salmonella spp* pela inibição do crescimento das outras bactérias e exige-se uma posterior repicagem em meio sólido seletivo. Sempre que existir suspeita de outros microrganismos ou é pedida uma pesquisa orientada, são utilizados meios de cultura específicos para o isolamento dos mesmos. Os meios seletivos, utilizados na rotina do laboratório, estão referidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Meios de cultura para fezes [13]

Meios de cultura para fezes			
Meios	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
XLD	Aerobiose / 37°C	18-24 horas	<i>Salmonella spp</i> , <i>Shigella spp</i>
Hektoen	Aerobiose / 37°C	18-24 horas	<i>Salmonella spp</i> , <i>Shigella spp</i>
CIN	Aerobiose / 25°C	24 horas	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Campyloset	Microaerofilia / 42°C	4 - 5 dias	<i>Campylobacter jejuni</i>

Exsudados Purulentos e Líquidos de Derrame

É necessária uma especial atenção ao tecido e colheita do material biológico quando se suspeita da presença de microrganismos anaeróbios (purulência, odor pútrido e tecidos necrosados). Como tal é utilizada, na colheita, a zaragatoa (pesquisa de M.O aeróbios) ou a aspiração em seringa (pesquisa de M.O anaeróbios). Produtos biológicos obtidos por zaragatoa são imediatamente inoculados nos respetivos meios de cultura. Produtos biológicos obtidos por aspiração são transportados e inoculados em anaerobiose, assim como em meio líquido de enriquecimento (“Cooked-Meat” ou Brain-heart). Os meios de cultura utilizados e respetivas condições estão referidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Meios de cultura para Exsudados Purulentos, e Líquidos de derrame [13]

Meios de cultura para Exsudados Purulentos, Líquidos de Derrame			
Meios	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Anaerobiose / 37°C	24 horas	<i>Bacteroides spp</i> ; <i>Prevotella spp</i> ; <i>Actinomyces spp</i> ; <i>Clostridium spp</i>
Columbia c/ CNA	Aerobiose / 37°C	24 horas	<i>Staphylococcus spp</i> ; <i>Streptococcus spp</i>
Chocolate c/ bacitracina	Aerobiose / 37°C	24 horas	<i>Haemophilus influenza</i>
Sabouraud c/ Gentamicina e Cloranfenicol	Aerobiose / 25°C	Variado (depende da suspeita do fungo)	Todo o tipo de Fungos

Sangue

O sangue é um fluido biológico estéril. Quando existe suspeita de septicemia ou bacteriemia, é feita a colheita dentro do período febril (2 a 3 locais diferentes) de 10 ml de sangue para um frasco de hemocultura. Nas situações em que o doente já tenha iniciado a terapêutica, a colheita deverá ser feita imediatamente antes da toma da próxima dose.

Os frascos de hemocultura são colocados no aparelho automático BacT /ALERT 3D que agita os frascos, incuba e faz leituras periódicas para determinar a positividade da cultura. A hemocultura é dada como negativa ao fim de 7 dias sem sinais de positividade, sendo que, em caso de suspeita de microrganismos fastidiosos, o período de incubação aumenta para 14 ou 21 dias, o mesmo ocorrendo quando solicitada a pesquisa de *Brucella spp*.

Em caso de positividade da hemocultura é feito um exame direto por coloração de Gram para facilitar a interpretação do exame cultural e a orientação da terapêutica, por parte do médico. Os meios de cultura e condições utilizados na rotina estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Meios de cultura para sangue [13]

Meios de cultura para Sangue			
Meios	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Aerobiose / 37°C	24 horas	Streptococcus spp; Staphylococcus spp; Salmonella spp; E.coli

Exsudados da Oro/Rinofaringe e Ouvidos

A colheita de exsudados Oro/Rinofaringe e Ouvidos é feita com a ajuda de zaragatoas, sendo que para os produtos da cavidade oral é necessário cuidado para não tocar nas paredes. Na colheita de exsudados nasais, dever-se-á rodar a zaragatoa contra a mucosa nasal. No que diz respeito aos ouvidos, é realizada uma terapia empírica ou colheita com zaragatoa.

A cultura de exsudados da Oro/Rinofaringe tem como finalidade identificar M.O responsáveis por infeção, assim como detetar portadores de *Staphylococcus aureus* MRSA.

Após avaliação primária dos exsudados, é escolhido o meio adequado à sua cultura Tabela 13.

Tabela 13 - Meios de cultura para Exsudados da Oro/Rinofaringe e Ouvidos [13]

Meios de cultura para Exsudados da Oro/Rinofaringe e Ouvidos			
Meio	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Aerobiose / 37°C	24 horas	Streptococcus spp; Staphylococcus spp; Candida spp
Columbia c/CNA	Aerobiose / 37°C	24 horas	Staphylococcus spp; Streptococcus spp
Chocolate c/ PolyViteX	Aerobiose / 37°C	24 horas	Neisseria meningitidis; Haemophilus influenzae
Chocolate c/Bacitracina	Aerobiose / 37°C	24 horas	Haemophilus spp

Exsudados Vaginais e Uretrais

Na presença de doenças sexualmente transmissíveis, a colheita do exsudado é realizada com a ajuda de uma zaragatoa posteriormente semeada num meio de cultura sólido. Todavia, no caso de pesquisa de *Clamydia trachomatis* é realizado PCR do produto biológico (organismo intracelular). Em lesões vulvares ou uretrais, após limpeza da área lesada, deverá ser feita uma colheita, a partir da base das úlceras, obtendo-se o líquido seroso, por aspiração, num tubo esterilizado (pesquisa direta de *Treponema pallidum* em microscopia de fundo escuro). Em mulheres grávidas é feito o rastreio de *Streptococcus spp* do grupo B (relacionado com infeção graves nos recém nascidos). Numa avaliação primária do exsudado, é possível detetar o provável M.O patológico (*Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*). As culturas destas amostras são realizadas nos meios e condições na Tabela 14.

Tabela 14 - Meios de cultura para Exsudados Vaginais e Uretrais ^[13]

Meios de cultura para Exsudados Vaginais e Uretrais			
Meio	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Anaerobiose / 37°C	24 horas	<i>Gardnerella vaginalis</i> ;
Chocolate c/ PolyViteX	Anaerobiose / 37°C	24 horas	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Sabouraud c/cloranfenicol	Anaerobiose / 25°C	2 a 3 dias	<i>Candida spp</i>
Chocolate c/ VCA 3	Atmosfera de 3 a 7 % de CO ₂ / 36°C	24 – 48 horas	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

Em doentes com suspeita de infeção no Sistema Nervoso Central (SNC), é realizada uma punção lombar (ato médico) para obtenção do LCR. O produto biológico deve ser recolhido de forma asséptica para dois tubos estéreis (um para testes bioquímicos e outro para contagem citológica e exame microbiológico). A pesquisa poderá ser orientada para *Cryptococcus neoformans* (coloração com tinta da China) ou *Treponema pallidum* (serologia ou microscopia de fundo escuro) conforme a suspeita do clínico. A amostra é colocada em meio de enriquecimento líquido (*Brain-Heart*) e são realizadas culturas em condições como as especificadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Meio de cultura para LCR ^[13]

Meio de cultura para LCR			
Meios	Atmosfera / temperatura	Tempo de incubação	M.O mais frequentes
Columbia c/ 5% de sangue de carneiro	Aerobiose / 37°C	24 - 72 horas	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
Chocolate c/ PoliViteX	Aerobiose / 37°C	24 – 72 horas	<i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i>

Aparelhos Automáticos

VITEK 2

O laboratório está equipado com 2 aparelhos VITEK 2, que identificam e determinam a suscetibilidade antimicrobiana de um modo automático. O aparelho incuba e faz leituras de cartas de identificação, previamente escolhidas de acordo com a suspeita do M.O. Estas cartas são constituídas por poços de testes bioquímicos convencionais, identificam os M.O através da mudança de cor dos poços (indicadores de pH). Estas cartas são inoculadas com uma suspensão microbiana (a partir de culturas puras) segundo a escala de *McFarland* indicada para cada microrganismo, a leitura é realizada automaticamente por espectrofotometria ^[5, 15].

O estudo de suscetibilidade é feito por turbidimetria em cartas específicas compostas por poços com concentrações definidas de antibióticos, em que é adicionada uma suspensão do microrganismo ^[5, 15].

VITEK Ms

O aparelho automático VITEK Ms utiliza-se na identificação de M.O, recorrendo à técnica de espectrometria de massa ^[14]. O aparelho realiza a leitura numa placa específica (metálica), inoculada com colónias dos M.O a estudar. Cada placa permite inocular um conjunto de 16 M.O, sendo que o controlo é feito por uma estirpe ATCC, procedendo à sua leitura após positividade do controlo. A identificação é feita por comparação dos gráficos obtidos com a base de dados do aparelho.

miniAPI

O miniAPI é um sistema semi-automático que realiza leituras colorimétricas das galerias de identificação API, previamente escolhidas de acordo com a suspeita do M.O, para identificação de bactérias e fungos leveduriformes. O aparelho também realiza leituras por turbidimetria das galerias para testes de suscetibilidade (antibiogramas) [5, 15].

Testes Bioquímicos e Serológicos – Manuais

Teste da Catalase

O teste da catalase é utilizado para detetar esta enzima intracelular, encontrada na maioria dos M.O, e consiste na adição de uma colónia pura, com a ajuda de uma ança de plástico, a uma gota de peróxido de hidrogénio que, em caso de positividade, liberta oxigénio como um dos produtos finais (é visível a formação de bolhas). Este teste é utilizado na rotina para diferenciar os géneros *Streptococcus spp* (negativo) de *Staphylococcus spp* (positivo), mas também se usa na diferenciação de *Streptococcus spp* (negativo) de *Lysteria monocytogenes* (positivo) [13, 15].

Teste da Coagulase

O teste é utilizado para detetar se a enzima coagulase é produzida pelo M.O a testar. Consiste na adição de uma pequena quantidade de colónia pura a uma gota de plasma de coelho, observando-se a formação de um coágulo (positividade). Este teste é utilizado na rotina para diferenciar a espécie de *Staphylococcus aureus* das outras espécies de *Staphylococcus spp* [13, 15].

Teste da Oxidase

O teste da oxidase deteta a produção da enzima oxidase intracelular. As bactérias que possuem atividade do citocromo-oxidase provocam oxidação na tira de teste (impregnada

com indicador) que, no estado reduzido, é incolor. Todavia, desenvolve uma coloração púrpura quando oxidada. Este teste é utilizado na rotina para diferenciar o género *Pseudomonas spp* (oxidase positiva) de outras bactérias semelhantes ^[13, 15].

Outros Métodos de Identificação

A utilização de outros métodos consiste na pesquisa de antígeno específico nos produtos biológicos, com a finalidade de identificar espécies de M.O responsáveis pela patologia. No laboratório, são utilizados kits comerciais que se baseiam em testes imunocromatográficos para deteção de antígenos (*Clostridium difficile*, *Plasmodium spp*, *Legionella spp*), e a técnica de aglutinação recorrendo ao uso de antisoros (*Salmonella spp*) ^[13, 15].

Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos Manuais

A determinação de testes de suscetibilidade microbiana a antibióticos é realizada de acordo com os seguintes métodos:

Método de Difusão

O método de difusão é realizado pela técnica de *Kirby Bauer*, utilizando o meio de *Mueller Hinton*. É realizada uma suspensão a partir de uma cultura pura, segundo a escala de McFarland adequada para o microrganismo e inocula-se o meio. Colocam-se no meio os discos de antibiótico a testar cada um dos quais impregnados com concentrações conhecidas ^[15]. Após incubação de 18 a 24 horas, os halos de inibição de crescimento são medidos em milímetros e comparados com as *guidelines* da EUCAST ou CLSI, permitindo classificar a bactéria como sensível, intermédia ou resistente.

E – Teste

O processo é semelhante ao descrito no método de difusão, exceto no que diz respeito aos antibióticos. Os antibióticos neste métodos vêm impregnados em tiras de plástico num gradiente de concentração conhecido. Após incubação, observa-se uma zona elíptica de inibição à volta da tira, lendo-se as concentrações mínimas inibitórias na zona de interseção da zona elíptica com a escala da tira ^[15].

Infeção por Micobactérias

As micobactérias são bacilos ácido-álcool resistentes, sendo *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, a espécie mais estudada. Quando pedida a pesquisa de micobactérias no laboratório, os produtos biológicos usados são expetoração, aspirados brônquicos e lavados bronco-alveolares. É importante referir que este material é processado numa câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contágios. O produto biológico é submetido a um processo de descontaminação/homogeneização que inibe o crescimento bacteriano indesejável assim como homogeneiza a amostra (por ação mucolítica). Após este processo, a amostra liquefeita é neutralizada e centrifugada para obtenção das micobactérias.

A partir do sedimento faz-se:

- Observação ao microscópio, após coloração de *Tan-Thian-Hok*;
- Inoculação em tubo BBL MGIT (*Mycobacteria Grow indicator tube*) e colocado no sistema BacTEC MGIT 960 a 37°C durante 42 dias;
- Cultura em meio *Löwenstein-Jensen* a 37°C no escuro durante 42 dias (observação das culturas a cada 1 semana).

Nos casos de positividade para micobactérias nos testes referidos, são realizados estudos moleculares para determinar a espécie de micobactéria em causa ^[13, 15].

Parasitologia

No que diz respeito à pesquisa de parasitas, os produtos biológicos que chegam ao laboratório com mais frequência são as fezes e sangue.

No exame parasitológico de fezes, logo após a chegada do produto biológico ao laboratório, é realizado um exame macroscópico, onde deve ser observada a consistência, a presença de muco e/ou sangue e a existência de parasitas ou dos seus fragmentos. Realizada a observação macroscópica, é feita a observação microscópica por exame direto. Esta consiste na colocação de uma amostra de fezes frescas entre lâmina e lamela (se as fezes forem consistentes, adiciona-se uma gota de solução salina), e, pelo método de Ritchie que consiste na centrifugação da amostra, ressuspensão do sedimento e adição de uma gota entre a lâmina e lamela (adicionando lugol). Inicialmente a preparação é observada na objetiva de menor ampliação (10x), mas, percorrendo toda a lâmina, na pesquisa de parasitas de maior tamanho,

tais como ovos, larvas ou seres adultos. Após esta primeira observação, é realizada uma segunda, com a objetiva de 40x, para pesquisa de parasitas de menor tamanho tal como quistos. É importante informar o doente sobre os cuidados a ter com a alimentação, pois alimentos fibrosos, com pequenas sementes ou grânulos, interferem na observação microscópica, pela sua semelhança a estruturas parasitárias ^[15].

O exame parasitológico de sangue é realizado em casos de suspeita de *Plasmodium spp*, e faz-se por gota espessa (coloração de Giemsa) e por esfregaço sanguíneo (coloração de Wright). Também são realizados exames diretos em casos de suspeita de *Trypanosoma spp* e *Leishmania spp* ^[15].

Controlo de Qualidade

Controlo de Qualidade Interno

No laboratório são utilizadas estirpes padrão ATCC (“American Type Control Collection), provenientes de uma coleção de microrganismos conhecidos, que são analisadas em paralelo com as amostras de doentes. Este tipo de controlo permite avaliar o grau de precisão na identificação feita pelos métodos automatizados.

Controlo de Qualidade Externo

O laboratório participa no programa “*U.K National External Quality Assessment Schem for Microbiology (NEQAS)* ” que consiste no estudo microbiológico de quatro amostras liofilizadas, recebidas mensalmente e processadas em conjunto com as amostras dos doentes. Os resultados são enviados à instituição de referência que os avalia. Deste modo, é comparada a precisão e exatidão dos métodos microbiológicos utilizados em laboratórios distintos e são conhecidas as distribuições de frequência dos resultados em função das condições em que se processaram.

Conclusão

Durante o estágio curricular e elaboração do relatório de estágio, foram aplicados os conhecimentos, tanto teóricos como práticos, adquiridos durante os dois anos em que frequentei o Mestrado em Análises Clínicas. Possuindo como base uma licenciatura direcionada para a investigação, escolhi este Mestrado com a intenção de adquirir conhecimentos nos processos e metodologias que são aplicados, atualmente, na rotina laboratorial. Ao abordar durante estes dois anos, variadíssimos temas, consegui aperceber-me do dinamismo e cumplicidade que tem de existir entre as mais diversas áreas da saúde para chegar a bons resultados e a boas interpretações biológicas.

Grande parte do estágio foi realizado no laboratório CSMC onde fui muito bem integrado. Acompanhado por toda a equipa profissional, foi-me permitindo uma aprendizagem serena no exercício da rotina diária. Foi-me dada a oportunidade de contactar com aparelhos automáticos, reproduzir técnicas manuais e integrar-me em toda a dinâmica de cada sector contribuindo o decorrer do estágio para a minha independência nos processos de cada sector. Fui presenteado com a opção de complementar e finalizar o meu estágio no CHUC, proposta que imediatamente aceitei. Fui afavelmente recebido e acompanhado por todos os profissionais, tendo consolidado e adquirido novos conhecimentos sobre o sector que mais aprofundei neste trabalho. É importante referir que esta experiência no CHUC foi única e tendo em consideração o historial e a importância deste Hospital no País, sinto-me particularmente honrado por ter estagiado nesta instituição.

Após a conclusão do Mestrado em Análises Clínicas, sinto que completei algo que faltava há minha visão e interpretação da área saúde na sociedade. Ao terminar este percurso da minha vida, tenho a certeza que quero trabalhar na área da saúde, com a convicção que este Mestrado terá um grande impacto nas minhas futuras escolhas profissionais.

Bibliografia

- [1] SEELEY Rod; STEPHENS Trent; TATE Philip – Anatomy and Physiology. 6th Edition. USA: McGraw Hill Higher Education, 2002. ISBN 978-0071150903
- [2] HOFFBRAND A.; CATOVSKY Daniel; TUDDENHAM Edward – Postgraduate Haematology. 5th Edition. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. ISBN 1-4051-0821-5
- [3] SHINTON N.K, et al. – Desk Reference for Hematology. 2nd Edition. NW: Taylor & Francis, 2008. ISBN 978-0-8493-3393
- [4] SUZUKI S.; EQUCHI N. – Leukocyte differential analysis in multiple laboratory species by a laser multi-angle polarized light scattering separation method. Exp Anim, 1999. PMID 10374072
- [5] BURTIS Carl, et al. – Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Edition. Philadelphia: Elsevier, 2008. ISBN 978-0-7216-3865-2
- [6] LEWIS S.; BAIN Barbara; BATES Imelda – Dacie and Lewis: Practical Haematology. 10th Edition. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. ISBN 0443-06660-4
- [7] VEHAPOGLU Aysel, et al. – Hematological Indices for Differential Diagnosis of Beta Thalassemia Trait and Iron Deficiency Anemia. Journal Anemia Hindawi Publishing corporation, 2014. PMC 4003757
- [8] KAUSHANSKY Kenneth, et al. – Williams Hematology. 8th Edition. USA: The McGraw-Hill Companies, 2010. ISBN 978-0-07-162144-1
- [9] LOFFLER H.; RASTETTER J.; HAFERLACH T. – Atlas of Clinical Hematology. 6th Edition. New York: Springer, 2005. ISBN 3-540-65085-1
- [10] COLMAN Robert, et al. – Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 1-6083-1906-7
- [11] HOFFMAN Ronald, et al. – Hematology: Basics Principles and Practice. 4th Edition. Philadelphia: Elsevier, 2005. ISBN 0-443-06628-0
- [12] POPESCU A.; DOYLER RJ – The Gram stain after more than a century. Biotech Histochem, 1996. PMID 8724440
- [13] ZIMBRO Mary, et al. – Difco™ & BBL™: Manual of Microbiological Media. 2nd Edition. USA: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 0-9727207-1-5
- [14] INTELICATO – YOUNG J; FOX A. Mass spectrometry and Tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods, 2013. ISSN 0127-7012
- [15] KAYSER Fritz, et al. – Color Atlas of Medical Microbiology. 10th Edition. Stuttgart: Thieme, 2005. ISBN 978-0071150903