

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Importância do diagnóstico laboratorial

Filipa Isabel Sousa Costa Guedes Vaz

Relatório de estágio orientada(o) pelo(a) Professora Isabel Bettencourt
Moreira da Silva

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Importância do diagnóstico laboratorial

Filipa Isabel Sousa Costa Guedes Vaz

Relatório de estágio orientada(o) pelo(a) Professora Isabel Bettencourt
Moreira da Silva

Mestrado em Análises Clínicas

2020

Índice Geral

Parte I	1
Índice – Parte I.....	4
Parte I.....	5
Parte II.....	7
Lista de Tabelas.....	8
Lista de Figuras.....	9
Introdução.....	10
Microrganismos de Interesse Clínico.....	11
<i>Staphylococcus spp.</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negativa.....	12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12
<i>Streptococcus spp.</i>	13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	13
<i>S. pneumoniae</i>	15
<i>Streptococcus Viridans</i>	16
<i>Enterococcus spp.</i>	16
<i>Enterobacteriaceae</i>	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Técnicas laboratoriais usadas no estudo de bactérias.....	18
Exame a fresco.....	18
Execução de esfregaços.....	18
Coloração de Gram.....	18
Coloração de Kinyoun.....	19
Meios de Cultura.....	20
Equipamentos.....	23
VITEK® 2.....	23
Mini API®.....	24
VITEK® MS.....	24
BacT/ALERT®.....	24
VersaTREK® - Micobactérias.....	24

Testes laboratoriais usados no auxílio à identificação de Bactérias	25
Teste da Oxidase	25
Teste da coagulase (Pastorex Staph – Plus).....	25
Teste da catalase	26
Análises efetuadas	26
Amostras do Aparelho Urinário	26
Urocultura	26
<i>Pesquisa do Ag Streptococcus pneumoniae</i> na urina.....	29
<i>Pesquisa do Ag Legionella pneumophila</i> na urina.....	29
Amostras do Aparelho Genital	29
Exsudado Vaginal	29
Exsudado Uretral	32
<i>Pesquisa de Streptococcus agalactiae</i> (grupo B).....	33
<i>Pesquisa Ag Chlamydia trachomatis</i>	34
<i>Pesquisa de Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum</i>	34
Aparelho Respiratório.....	35
Exsudado Nasal – estudo de colonização	35
Exsudado Orofaríngeo	35
<i>Pesquisa direta do antígeno de Streptococcus</i> do grupo A.....	36
RSV – Vírus Sincicial Respiratório	36
Expetoração e Secreções Brônquicas	37
Lavado Bronco-alveolar	41
Aparelho Gastrointestinal.....	41
Coprocultura	42
<i>Clostridium difficile</i>	43
Rotavírus.....	44
<i>Giardia lamblia</i>	44
Aparelho Circulatório	44
Sangue – Hemoculturas	44
Ponta de Cateter (Cateter Venoso Central- CVC)	48
Líquidos Orgânicos	49
Líquido Pleural	49
Líquido Sinovial	50

Líquido ascítico, Bólis	50
Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	50
Pele e Tecidos	53
Exsudado purulento superficial e aspirado subcutâneo	54
Biópsias	55
Exsudados oculares	55
Exsudados auriculares	57
Teste de Sensibilidade aos Antibióticos - TSA	58
Vitek 2	58
Sistema ATB	60
E-test	61
Exame Parasitológico de Fezes	61
Exame Micológico – Dermatófitos	62
Micobactérias - BK	62
Detecção de Micobactérias	63
TSA - Mycobacterium tuberculosis	65
Controlo de Qualidade	66
Conclusão	67
Bibliografia	68
Parte II	73
Lista de Figuras	79
Lista de Tabelas	80
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	81
1. Introdução	82
2. Epidemiologia	82
3. Etiologia e Patogénese	83
4. Classificação	90
4.1 Classificação FAB	90
4.2 Classificação OMS	91
5. Manifestações Clínicas	92
6. Diagnóstico	94
6.1 Anamnese e exame objetivo	94

6.2 Diagnóstico laboratorial.....	94
6.2.1 Hematologia e Observação morfológica em lâmina: sangue periférico/sangue medular.....	94
Parâmetros Bioquímicos	97
6.2.3 Avaliação do SNC.....	98
6.2.4 Citoquímica	98
6.2.5 Imunofenotipagem por Citometria de fluxo.....	99
6.3. Citogenética	109
6.3.1 Citogenética Convencional	109
6.3.2 FISH – Citogenética Molecular.....	115
6.4 Imagiologia	120
6.5 Diagnóstico diferencial	120
7. Tratamento	122
7.1 Terapêutica de Suporte	122
7.1.1 Complicações Metabólicas.....	122
7.1.2 Hiperleucocitose.....	123
7.1.3 Controlo de Infecção.....	123
7.2 Quimioterapia	123
7.2.1 Indução	123
7.2.2 Tratamento e profilaxia do SNC	124
7.2.3 Consolidação	124
7.2.4 Manutenção	124
7.2.5 Transplante hematopoiético	125
8. Prognóstico.....	125
9. Conclusão e Perspetivas	127
10. Bibliografia.....	128

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



PARTE I

Relatório de Estágio:

Estágio realizado no Grupo SYNLABHEALTH

Filipa Isabel Sousa Costa Guedes Vaz

Supervisionada pela Dr^a Anabela Cunha

Mestrado Análises Clínicas 2020

Resumo

O relatório de estágio compreende as atividades que realizei no estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, que decorreu em laboratórios do grupo SYNLABHEALTH.

No relatório está descrita a valência de Microbiologia que inclui as amostras utilizadas, métodos mais utilizados, equipamentos, interpretação dos resultados e a importância do controlo qualidade interno e controlo de qualidade externo.

O estudo laboratorial das doenças infecciosas de etiologia bacteriana, micológica e parasitológica é realizado através de um exame morfológico direto, do exame cultural, isolamento, identificação e determinação dos testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, dos microrganismos presentes nas diferentes amostras biológicas.

O estágio permite o enquadramento dos conhecimentos laboratoriais adquiridos ao longo do Mestrado e qual a sua aplicação à Clínica.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Microbiologia Clínica; Antibiograma; Exame Direto; Exame Cultural;

Abstract

The internship report comprehends the activities performed in the curricular period included in the Clinical Analysis Masters Degree which took place at SYNLABHEALTH laboratories.

The Microbiology Section report includes the more frequently used samples, working methods, equipments, result interpretation and the importance of quality control, be it internal or external.

The laboratorial study of infectious diseases of bacterial, fungous, or parasitic origin is done through a direct morphology examination, cultural examinations, isolation, identification and susceptibility testing to antimicrobial agents. The microorganisms present in biological samples are thus recognized as a probable cause of disease.

The internship allows the framing of laboratorial knowledge acquired during the Master degree and its application to everyday clinic

Keywords: Clinical analysis; Microbiology; Antibigram; Direct Morphology Examination; Cultural Examination

Índice – Parte I

Lista de Tabelas	8
Lista de Figuras	9
Introdução	10
Microrganismos de Interesse Clínico	11
<i>Staphylococcus spp.</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negativa.....	12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12
<i>Streptococcus spp.</i>	13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	13
<i>S. pneumoniae</i>	15
<i>Streptococcus Viridans</i>	16
<i>Enterococcus spp.</i>	16
<i>Enterobacteriaceae</i>	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Técnicas laboratoriais usadas no estudo de bactérias	18
Exame a fresco	18
Execução de esfregaços	18
Coloração de Gram	18
Coloração de Kinyoun	19
Meios de Cultura	20
Equipamentos	23
VITEK® 2	23
Mini API®	24
VITEK® MS.....	24
BacT/ALERT®.....	24
VersaTREK® - Micobactérias.....	24
Testes laboratoriais usados no auxílio à identificação de Bactérias.....	25
Teste da Oxidase	25
Teste da coagulase (Pastorex Staph – Plus).....	25
Teste da catalase	26

Análises efetuadas	26
Amostras do Aparelho Urinário	26
Urocultura	26
<i>Pesquisa do Ag Streptococcus pneumoniae</i> na urina.....	29
<i>Pesquisa do Ag Legionella pneumophila</i> na urina.....	29
Amostras do Aparelho Genital	29
Exsudado Vaginal	29
Exsudado Uretral	32
<i>Pesquisa de Streptococcus agalactiae</i> (grupo B).....	33
<i>Pesquisa Ag Chlamydia trachomatis</i>	34
<i>Pesquisa de Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum</i>	34
Aparelho Respiratório.....	35
Exsudado Nasal – estudo de colonização	35
Exsudado Orofaríngeo	35
<i>Pesquisa direta do antígeno de Streptococcus</i> do grupo A	36
RSV – Vírus Sincicial Respiratório	36
Expetoração e Secreções Brônquicas	37
Lavado Bronco-alveolar	41
Aparelho Gastrointestinal	41
Coprocultura	42
<i>Clostridium difficile</i>	43
Rotavírus	44
<i>Giardia lamblia</i>	44
Aparelho Circulatório	44
Sangue – Hemoculturas	44
Ponta de Cateter (Cateter Venoso Central- CVC)	48
Líquidos Orgânicos	49
Líquido Pleural	49
Líquido Sinovial	50
Líquido ascítico, BÍlis	50
Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	50
Pele e Tecidos	53

Exsudado purulento superficial e aspirado subcutâneo	54
Biópsias.....	55
Exsudados oculares.....	55
Exsudados auriculares.....	57
Teste de Sensibilidade aos Antibióticos - TSA	58
Vitek 2.....	58
ATB	60
E-test	61
Exame Parasitológico de Fezes	61
Exame Micológico – Dermatófitos	62
Micobactérias - BK.....	62
Detecção de Micobactérias	63
TSA - Mycobacterium tuberculosis	65
Controlo de Qualidade.....	66
Conclusão	67
Bibliografia.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação de <i>Streptococcus</i> spp. patogénicos mais comuns	13
Tabela 2 – Classificação do grupo Viridans	16
Tabela 3 – Meios de Cultura para sementeiras	21
Tabela 4 – Valorização de sementeiras de Uroculturas	28
Tabela 5– Agentes Mais e Menos Frequentes nos Diferentes Tipos de Pneumonias	38
Tabela 6 -Tabela de Murray e Washington	39
Tabela 7 - Volumes aconselhados para colheita de Hemoculturas:	46
Tabela 8– Agentes de Meningites Adquiridas na Comunidade e Meningites Nosocomiais	52
Tabela 9 – Principais Agentes presentes em Exsudados Oculares	56
Tabela 10 – Cartas de TSA	59
Tabela 11– Antibióticos na gravidez	60

Lista de Figuras

Figura 1 - Coloração de Gram	19
Figura 2 – Coloração de Kinyoun.....	20
Figura 3 – Oxidase Positiva.....	25
Figura 4 – Teste da Coagulase.....	25
Figura 5 – Teste da Catalase.....	26
Figura 6 - Sementeira de Uroculturas.....	27
Figura 7 - Bacilos de Doderlein.....	31
Figura 8– “Clue Cells”	31
Figura 9 - <i>N. gonorrhoeae</i> em lâmina corada de um exsudado vaginal.....	32
Figura 10 - Amostra respiratória grupo 5 segundo a Tabela de Murray e Washington .	39
Figura 11 - Amostra respiratória de má qualidade	39
Figura 12 – Sementeira em 4 quadrantes.....	40
Figura 13 – E-test	61
Figura 14 – Amostra respiratória com presença de BAAR.....	64

Introdução

O estágio das valências de microbiologia e hematologia foi realizado em laboratórios do grupo SYNLAB.

As responsáveis pela secção de microbiologia são especialistas em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, sendo o restante corpo técnico constituído por técnicos de análises clínicas.

O equipamento do laboratório é moderno e automatizado dando resposta rápida e eficaz às análises requeridas pelo clínico.

A informatização dos serviços é completa possuindo uma rede de computadores conectando os equipamentos de modo a permitir uma correspondência entre o resultado analítico e o processo do doente, usando o programa informático *Apollo*.

Microrganismos de Interesse Clínico

Gram Positivos

Staphylococcus spp.

O género *Staphylococcus* spp. engloba um grupo grande e heterogéneo de bactérias, sendo em particular o *Staphylococcus aureus* um importante agente patogénico para o ser humano. A maioria, no entanto, faz parte da flora comensal, estando presentes na pele e mucosas.

São bactérias Gram positivas de forma redonda com tendência a um arranjo em cacho de uva, podendo também formar cadeias ou pares. São catalase positivo.

As espécies são aeróbias ou anaeróbias facultativas e crescem em meio contendo 10% de NaCl.(1)

Staphylococcus aureus

Em gelose de sangue apresenta-se em colónias douradas devido aos pigmentos carotenóides que se formam durante o crescimento, com β -hemólise. O *S.aureus* produz a enzima coagulase, enquanto quase todas as outras espécies de *Staphylococcus* spp. não produzem esta enzima, sendo por isso referidos como *Staphylococcus* coagulase-negativa. (1)

Faz parte da flora nasal, da pele e de membranas mucosas. Mas é um dos principais agentes patogénicos provocando um vasto leque de infeções, intoxicações alimentares e síndrome de choque toxico.(1)

Manifestações clínicas

O *S.aureus* causa doença principalmente através da produção da toxina ou por invasão direta e destruição de tecido. Uma entrada frequente é através da pele não intacta, por exemplo devido a um corte ou uma ferida cirúrgica. Outra hipótese é pela via respiratória, sendo a pneumonia por *S.aureus* uma complicação muito comum da infeção respiratória por vírus *Influenzae*.

Doenças devido às toxinas:

O Síndrome da Pele Escaldada por *Staphylococcus* spp. (SSS), é resultante da atividade da toxina. Origina um eritema que cobre todo o corpo com grandes bolhas e vesículas cutâneas.

A síndrome de choque tóxico origina febre elevada, *rash* cutâneo, vômitos, diarreia, hipotensão e compromisso multiorgânico.

A gastroenterite é causada por ingestão de alimentos contaminados com *S.aureus* produtor de enterotoxina.

Infeções cutâneas: O impetigo é uma infecção superficial que afeta principalmente crianças. É caracterizado por máculas e vesículas em diferentes fases de desenvolvimento. É normalmente causado por *S.aureus*, mas em 20% dos casos é devido a *S.pyogenes* que pode também provocar várias outras infecções cutâneas como foliculites e furúnculos. (1)

Bacteriemia e Endocardite: *S.aureus* é um agente comum de bacteriemia, sendo que mais de 50% das bacteriemias devidas a *S.aureus* são adquiridas em ambiente hospitalar após uma cirurgia ou por uso continuado de cateter. (1)

Pneumonia: Mais comum em doentes com fibrose quística, infecção prévia por *Influenza*, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPCO) e bronquietasias.

Artrite Séptica: O *S. aureus* é um agente comum de artrite séptica em crianças e adultos que recebem injeções intra-musculares, sendo substituído como agente principal de artrite séptica por *Neisseria gonorrhoeae* em adultos sexualmente ativos.(1)

Infeções Nosocomiais: *S. aureus* é um dos agentes mais comuns em infecções hospitalares, normalmente associado a feridas cirúrgicas ou bacteriemia associada a cateteres.

Staphylococos Coagulase negativa

Em gelose de sangue apresenta-se em colónias brancas e sem hemólise, após uma incubação de 24 horas. Não produzem a enzima coagulase.

Os *Staphylococcus* coagulase negativa fazem parte da flora normal da pele e mucosas, isolando-se frequentemente como contaminantes. No entanto também podem causar infecções hospitalares, facto que tem estado a aumentar nas últimas décadas devido ao crescente número de doentes imunodeprimidos.

Staphylococcus saprophyticus

Agente frequente de infecções do trato urinário em mulheres jovens e sexualmente ativas. Pode também ser um agente colonizador do trato urinário embora seja pouco frequente.(1)

***Streptococcus* spp.**

O género *Streptococcus* spp. engloba um grande e heterógeno grupo de bactérias, como é possível observar na tabela 1, sendo que algumas são importantes agentes patogénicos para o ser humano. A maioria, no entanto, faz parte da flora comensal.

São bactérias Gram positivas de forma ovóide ou esférica com tendência a formarem cadeias ou pares. São um género catalase negativo.

Na sua maioria, as espécies são anaeróbias facultativas e crescem bem em meios enriquecidos com sangue, soro ou hidratos de carbono entre 35°C e 37°C. Algumas delas necessitam de uma atmosfera enriquecida com dióxido de carbono para crescer, como o *Streptococcus pneumoniae* e alguns *Streptococcus* do grupo viridans.(1,3)

Tabela 1 – Classificação de *Streptococcus* sp. patogénicos mais comuns (1)

Classificação bioquímica	Classificação serológica (Lancefield)	Hemólise
<i>S.pyogenes</i>	A	Beta
Grupo <i>S. anginosus</i>	A, C, F, G, não agrupável	Beta, ocasionalmente alfa ou não hemolítico
<i>S.galactiae</i>	B	Beta, ocasionalmente não hemolítico
<i>S.dysgalactiae</i>	C, G	Beta
<i>S.bovis</i>	D	Alfa, não hemolítico, ocasionalmente beta
Grupo streptococci Viridans	Não agrupável	Alfa, não hemolítico
<i>S. pneumoniae</i>	Não agrupável	Alfa

Streptococcus pyogenes

Em gelose de sangue apresenta-se em colónias brancas e com β -hemólise, após uma incubação de pelo menos 24 horas. Nas estirpes encapsuladas as colónias têm uma aparência mais mucóide (em colónias frescas), enquanto que nas não encapsuladas as colónias são mais pequenas e brilhantes. (1)

Apresentam antigénio do grupo A (dímero de N-acetilglicosamina e ramnose) presente na parede celular e específico de *Streptococcus* do grupo A, o que o permite distinguir. Este antigénio é a base do teste rápido para detecção de *S.pyogenes*.

Manifestações clínicas

O *S.pyogenes* é um dos principais agentes bacterianos responsável pela faringite, mais frequente em crianças até aos 18 anos. Se não tratada, podem ser desenvolvidas complicações supurativas como abscesso periamigdalino, linfadenite cervical e mastoidite e complicações não supurativas. A complicação não supurativa mais importante é a febre reumática, sendo mais provável quando a faringite por *S.pyogenes* ocorre em criança do que em adulto. A febre reumática é caracterizada por um processo inflamatório que envolve o sistema cardiovascular, articulações e o tecido subcutâneo. A febre reumática pode resultar em lesões das válvulas cardíacas. Está associada a uma elevação de anticorpos anti-estreptolisina O.(1,4)

É provável que alguns antigénios bacterianos de *S.pyogenes* possuam epitopos comuns aos tecidos cardíacos e renais. Estes antigénios bacterianos provocam uma resposta imune cruzada e, nalguns doentes ocorre assim uma reação autoimune atingindo estruturas do coração e dos rins. As doenças pós-estreptocócicas imunológicas são felizmente relativamente raras, sendo uma consequência de ter havido produção de anticorpos contra a bactéria.

A medição do título de anti-estreptolisina (TASO) é útil na confirmação de febre reumática, visto que os anticorpos aparecem uma semana após a infeção do trato respiratório superior, subindo rapidamente até ao valor máximo entre as 3 e as 6 semanas. No entanto, as infeções da pele não estimulam uma boa resposta do TASO.(5)

Infeções da pele: O impetigo afeta principalmente crianças entre os 2 e os 5 anos. Primeiro são afetadas as zonas expostas da pele, seguindo-se os tecidos subcutâneos. Desenvolvem-se vesículas que se tornam pústulas. Também pode ser causado pelo *S.aureus*. A erisipela ocorre maioritariamente em crianças ou jovens adultos. É uma infeção aguda da pele que causa dor, inflamação, aumento dos nódulos linfáticos. Normalmente é precedida por infeções com *S.pyogenes* no trato respiratório ou na pele. Podem também provocar infeções como celulite ou fascíte.

Doenças devido às toxinas: A escarlatina ocorre muitas vezes após uma faringite causada por *S. pyogenes*. A língua recobre-se de uma camada branca amarelada que, após descamação apresenta cor vermelho morango.

Síndrome de choque tóxico, semelhante ao do *Staphylococcus aureus*, que dá uma falência multiorgânica e muitas vezes mortal, ocorre principalmente em doentes de risco elevado. (1)

S. pneumoniae

Cresce em gelose de sangue sendo que a morfologia das colónias é variável e são anaeróbios facultativos. As colónias das estirpes encapsuladas são maiores e mucóides, enquanto que as colónias das estirpes não encapsulas são mais pequenas e de aspeto achatado. Todas as colónias após uma incubação prolongada apresentam no centro uma depressão em resultado da autólise. As colónias produzem uma α -hemólise em atmosfera de aerobiose, devido à produção de uma enzima, a pneumolisina, que degrada a hemoglobina produzindo um pigmento verde. Se for utilizada uma atmosfera de anaerobiose as colónias podem parecer ter uma β -hemólise. (1,3)

O *Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria de crescimento lento obtendo um melhor crescimento com 5% de CO₂. Necessita que o meio contenha uma fonte de catalase, como o sangue, para neutralizar a grande quantidade de peróxido de hidrogénio produzida. (1,3)

Na coloração de Gram apresenta-se em cocos Gram positivos de forma lanceolada, normalmente aos pares, diplococos, ou em cadeias curtas. (1,3)

Manifestações clínicas

O *S. pneumoniae* é um membro da flora normal da nasofaringe, aparecendo até cerca de 40% dos adultos e crianças saudáveis, sem quaisquer efeitos adversos. O risco de infeção é maior nas crianças entre os 6 meses e os 4 anos de idade e adultos com mais de 60 anos. As crianças podem sofrer de otite pneumocócica média antes dos 5 anos de idade.

Uma infeção por *S. pneumoniae* ocorre quando o microrganismo que coloniza a nasofaringe e a orofaringe invade outros locais como o pulmão, seios peri-nasais, ouvido e meninges.

Se a bactéria conseguir alcançar a corrente sanguínea pode originar septicémia e causar endocardites em doentes com patologia cardíaca.

As otites médias das crianças são muitas vezes causadas pelo pneumococo e são precedidas habitualmente por uma infeção respiratória alta a vírus.(6)

A Vacina

A vacinação com a Pn13, Prevenar 13®, no âmbito do Programa Nacional de Vacinação (PNV), iniciou-se no dia 1 de julho de 2015. A Pn13 é uma vacina conjugada

de 13 valências contra *Streptococcus pneumoniae* (serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F).

Esta vacina confere proteção individual para os serotipos nela incluídos (com diferentes eficácias consoante o serotipo) e confere imunidade de grupo da qual podem beneficiar outros grupos etários como os idosos, sendo expectável um impacto positivo na Saúde Pública com a introdução da vacina Pn13 no PNV. Há uma estratégia subjacente para o controlo da infeção de doença, redução da prevalência e da transmissão dos serotipos incluídos na vacina, que são os que mais frequentemente causam doença invasiva pneumocócica e exibem maior resistência aos antibióticos.(7)

Streptococcus Viridans

É constituído por *Streptococcus* α -hemolíticos e não hemolíticos. A maioria produz um pigmento verde na gelose de sangue, α -hemólise.

Tabela 2 – Classificação do grupo Viridans (1)

Grupo	Espécie
<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. anginosus</i>
<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i> , <i>S. alactolyticus</i> , <i>S. equinus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. crista</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. macacae</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. thermophilus</i>

Os *Streptococcus Viridans* são muito prevalentes na cavidade oral mas também se encontram no trato respiratório superior, no trato genital feminino, no trato gastrointestinal e na flora da pele. Sendo comensais nestes locais estes microrganismos podem também, por vezes, causar infeção.(8)

Enterococcus spp.

Cresce em gelose de sangue apresentando-se em colónias brancas a acinzentadas que podem ser β -hemolíticas, α -hemolíticas ou não hemolíticas, após uma incubação de pelo menos 24 horas. São anaeróbios facultativos com um crescimento ótimo a 35°C.

Apresenta-se em cocos esféricos Gram positivos em pares ou cadeias curtas na coloração de Gram.(1)

Existem pelo menos 16 espécies, sendo o *E. faecalis* o mais frequentemente isolado de amostras clínicas, seguido pelo *E. faecium*. (1)

São um dos principais agentes de infecções nosocomiais, sendo responsáveis por 10% destas. Os locais envolvidos são principalmente o trato urinário e a corrente sanguínea. Sendo mais comum em doentes com cateteres urinários ou intravasculares, doentes que necessitam de cirurgia abdominal extensa, transplantes, em diálise peritoneal e que estejam internados por longos períodos de tempo e fazer uma antibioterapia de largo espectro. (1)

Gram Negativos

Enterobacteriaceae

As Enterobacteriaceas contêm a maioria dos bacilos Gram negativos clinicamente importantes. Encontram-se no solo, na água, na vegetação e fazem parte da flora intestinal normal de muitos animais, incluindo os humanos.

Existem enterobacteriaceas que também são comensais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*. A *E. coli* associada à gastroenterite torna-se patogénica quando adquire fatores de virulência através de bacteriófagos, plasmídeos ou ilhas de patogenicidade. Algumas são sempre agentes patogénicos como *Salmonella typhi*, a *Shigella sp.* ou *Yersinia enterocolitica*.

São bacilos Gram negativos, não esporulados, catalase positivos, oxidase negativos e crescem rapidamente em meios não seletivos como a gelose de sangue ou em meios seletivos como o MacConkey. Na maioria são bacilos móveis com movimentos peritricos, com a exceção da *Klebsiella sp.*, *Shigella sp.* e *Yersinia enterocolitica*. Podem ser aeróbios, anaeróbios ou anaeróbios facultativos. Algumas podem fermentar a lactose como a *E. coli*, a *Klebsiella sp.*, o *Enterobacter sp.*, o *Citrobacter sp.* e a *Serratia marcescens*.

Pseudomonas aeruginosa

São bacilos Gram-negativos geralmente móveis, que podem ser ligeiramente curvados, tipicamente dispostos em pares. Produzem um pigmento esverdeado quando cultivados em meio sólido.

Possuem fatores estruturais, enzimas, toxinas que melhoram a sua virulência e torna-as resistentes a antibióticos.

Estão implicadas em infeções do trato respiratório, do trato urinário, pele e tecidos moles, ouvido e ocular, assim como bacteriemia e endocardite. É um importante agente oportunista especialmente problemático em infeções nosocomiais. (1)

Técnicas laboratoriais usadas no estudo de bactérias

Exame a fresco

O exame direto requer uma preparação de uma suspensão da amostra em solução salina em lâmina. Seguidamente colocar uma lamela e observar ao microscópio numa objetiva de 10x e seguidamente a 40x.

Execução de esfregaços

Para pesquisa e identificação presuntiva de microrganismos em diferentes amostras biológicas, é feito um esfregaço. Se a amostra for mais líquida, o esfregaço pode ser feito pela colocação do produto sobre a lâmina, estendendo em camada fina. Se a amostra for mais espessa ou purulenta (ex. expetoração) deve ser utilizada a técnica de estiramento. Colocando uma porção do produto sobre uma lâmina e pressionando com outra lâmina, fazendo deslizar as duas lâminas ao longo uma da outra, várias vezes. O esfregaço deve secar e posteriormente ser fixado (calor ou metanol).

Coloração de Gram

A coloração de Gram é um dos métodos de coloração mais utilizados em laboratórios de microbiologia. Esta coloração é usada para distinguir bactérias Gram-positivas de Gram-negativas e também permite a determinação da morfologia celular, tamanho e arranjo característico.

O princípio da coloração de Gram baseia-se na diferente constituição da parede celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas.

O primeiro corante utilizado na coloração é o cristal-violeta. O iodo é adicionado como mordente para melhorar coloração com violeta cristal, para a formação de um complexo iodo-cristal-violeta. A descoloração é o passo seguinte e é o mais crítico no

processo. As bactérias Gram-negativas são descoradas por uma solução de álcool-acetona enquanto que as Gram-positivas não o são.

As bactérias gram-negativas podem, assim, ser coradas pelo corante de safranina. Após uma coloração de Gram bem-sucedida, as Gram positivas observam-se a roxo enquanto que as gram-negativas a vermelho rosado, como observado na figura.

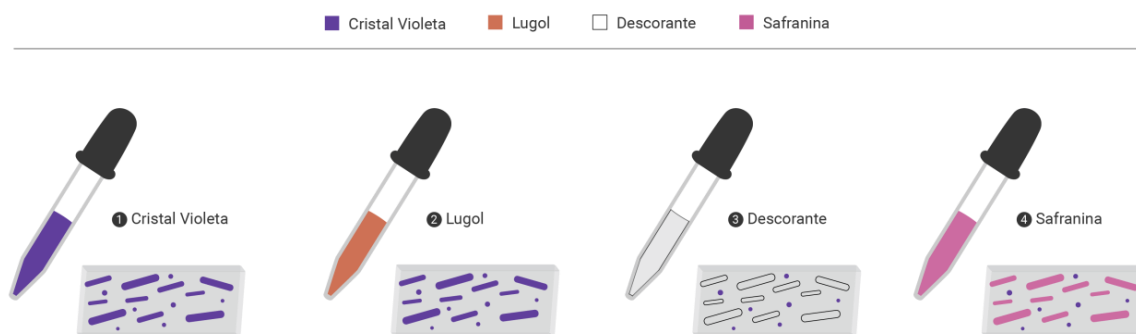


Figura 1 - Coloração de Gram

A parede das bactérias gram-negativas têm um elevado teor lipídico, devido à membrana externa e uma camada mais fina de peptidoglicano do que as Gram-positivas. O álcool-acetona funciona como descolorante visto que remove a camada lipídica, fazendo com que a parede Gram-negativos, mais porosa, não seja capaz de reter o complexo cristal violeta-iodo.

As bactérias Gram-positivas têm uma camada de peptidoglicano mais espessa, sendo por isso maior o grau de ligação, devido ao ácido teicóico, assim retém o complexo iodo-violeta de cristal de forma mais eficaz, fazendo a parede dos Gram-positivos menos suscetível a descoloração(1)

Coloração de Kinyoun

A coloração de Kinyoun é útil na identificação de bacilos de álcool-ácido resistente, sendo um método de diagnóstico presuntivo rápido e preliminar da tuberculose.

O método baseia-se na capacidade de alguns microrganismos, designadamente o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, ser capaz de reter o corante primário quando tratado com álcool ácido. A presença de ácidos micólicos nas paredes celulares dos bacilos álcool-ácido é a base para esta coloração diferencial. O ácido micólico é uma substância cerosa que dá às células álcool-ácido resistentes maior

afinidade para o corante primário e resistência à descoloração por uma solução de álcool-ácido.

No método de Kinyoun o primeiro corante utilizado é a carbolfucsina um composto fenólico solúvel em lípidos e capaz de corar a parede das células. O passo seguinte é o uso de álcool-ácido em que apenas as bactérias que sejam álcool-ácido resistentes são capazes de manter a coloração primária. Por último é usado azul-de-metileno, um corante de contraste.

Assim numa observação microscópica podem-se visualizar os bacilos álcool-ácido resistentes a rosa e os restantes a azul.(9)



Figura 2 – Coloração de Kinyoun

Meios de Cultura

Um meio de cultura é um substrato nutritivo capaz de permitir a nutrição e o crescimento dos microrganismos fora do seu ambiente biológico natural sendo assim possível o crescimento de microrganismos em laboratório.

Meios não seletivos: contêm nutrientes que favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos

Meios seletivos: contêm um ou mais agentes que inibem todos os microrganismos exceto os que se pretendem.

Meios diferenciais: contêm fatores que permitem às colónias bacterianas exibir certas características que podem ser utilizadas para a sua diferenciação de outras bactérias que também crescem no mesmo meio. Podem por exemplo dar informação acerca do comportamento e do metabolismo dos microrganismos, permitindo a visualização das características fermentativas do microrganismo em estudo.

Meios cromogénicos: permitem a deteção simples e rápida de bactérias usando substratos cromogénicos. Certas enzimas, produzidas por algumas bactérias, podem hidrolisar estes substratos, resultando na coloração diferente destas colónias de bactérias sendo facilmente diferenciadas da flora comensal.(10)

Tabela 3 – Meios de Cultura para sementeiras

Meio	Uso	Características
COS: Gelose de sangue	Meio diferencial e não seletivo permite o crescimento da maioria das bactérias.	Composto por 5 a 10% de sangue que enriquece o meio em nutrientes. Neste meio os glóbulos vermelhos estão intactos fornecendo assim informação acerca da capacidade hemolítica dos microrganismos. Distingue as bactérias não hemolíticas (gama-hemólise) das bactérias alfa-hemolíticas (hemólise parcial) e das bactérias beta-hemolíticas (hemólise total).
CNA: Columbia colistina-acido nalidixico	Meio seletivo para Gram positivos	Composto por 5 a 10% de sangue que enriquece o meio em nutrientes. Contém agentes antimicrobianos, colistina, ácido nalidíxico e aztreonam que torna o meio seletivo para bactérias Gram-positivas.
SCS: Gelose Schaedler	Meio seletivo para bactérias anaeróbias	A presença de vários fatores de crescimento, nomeadamente hemina, extrato de levedura, vitamina K3, facilitam o crescimento de bactérias anaeróbicas
HEKT: Gelose Hektoen	Meio seletivo e diferencial para <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.	As bactérias Gram-positivas são inibidas pela presença de sais biliares. As colónias de <i>Salmonella</i> spp. são esverdeadas a negras (produtoras de H ₂ S) e as de <i>Shigella</i> spp. são esverdeadas.
MCK: Gelose MacConkey	Meio seletivo e diferencial para enterobactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose	Contém sais biliares e o corante violeta de cristal para inibir o crescimento de bactérias Gram positivo permitindo que as Gram negativas cresçam. Contém lactose e um indicador de pH (vermelho neutro) permitindo distinguir entre as que fermentam (colónias rosas) e as que não fermentam (colónias transparentes) a lactose.
PVX: Gelose de Chocolate	Meio não seletivo, recomendado para estirpes de crescimento exigente como <i>Neisseria</i> sp. e <i>Haemophilussp.</i>	Composto por sangue e enriquecido com um suplemento polivitaminico PolyViteX e fatores X (hemina) e V (NAD) (devido à hemólise dos glóbulos vermelhos) fornecidos pela hemoglobina.

VCAT: Gelose de chocolate	Meio seletivo para isolamento de <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Composto por sangue e enriquecido com um suplemento polivitaminico, PolyViteX, e fatores X (hemina) e V (NAD - devido à hemólise dos glóbulos vermelhos) fornecidos pela hemoglobina. A presença de Vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim permite a seletividade do meio.
CAM: Gelose Campyloset	Meio seletivo para isolamento de <i>Campylobacter</i> sp.	A presença de agentes antibióticos e antifúngicos presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos. As colónias características <i>Campylobacter</i> spp. são pequenas e acinzentadas
MRSM	Meio seletivo, diferencial e cromogénico para MRSA	As colónias de MRSA são rosadas.
GRAN: Gelose Granada	Meio seletivo, diferencial e cromogénico para <i>Streptococcus agalactiae</i>	As colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i> são de cor laranja
HAEM: Gelose de chocolate Haemophilus	Meio seletivo para Haemophilus	Composto por sangue e enriquecido com um suplemento polivitaminico PolyViteX e fatores X (hemina) e V (NAD) (devido à hemólise dos glóbulos vermelhos) fornecidos pela hemoglobina. A seletividade do meio é obtida pela combinação de agentes antimicrobianos e antifúngicos.
CLED: Cystine Lactose Electrolyte Deficient Media	Meio seletivo, diferencial e cromogénico para isolamento de microrganismos do trato urinário.	Contém lactose e um indicador de pH (azul de bromotimol) que permite detetar se o açúcar é ou não metabolizado. Permite travar o crescimento em <i>swarming</i> de <i>Proteus</i> spp.
SGC2: Gelose Sabouraud	Meio de seleção para fungos e leveduras	A presença de Gentamicina permite inibir a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O pH do meio é ligeiramente ácido, favorecendo o crescimento dos fungos.
Mueller-Hinton	Meio não seletivo usado para o estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos	
Meios Líquidos		
BHI: Brain-Heart Infusion	Meio não seletivo de enriquecimento utilizado para o crescimento da maioria das bactérias	
Selenito	Meio de enriquecimento para <i>Salmonella</i>	O selenito de sódio inibe a maioria das Enterobacteriaceae.
TODD	Meio de enriquecimento para <i>S. agalactiae</i>	

Meio de Lowenstein-Jensen	Permite isolar Mycobacterium Tuberculosis
----------------------------------	---

Consoante as necessidades de oxigénio das bactérias é necessário a utilização de uma atmosfera adequada para o seu melhor crescimento. São utilizadas jarras que fecham hermeticamente e saquetas que contêm carvão ativado, ascorbato de sódio e outros componentes orgânicos e inorgânicos cuja percentagem varia consoante a atmosfera a criar. A mistura é ativada assim que entra em contacto com o ar.

Para criar uma atmosfera de anaerobiose, necessária ao crescimento de bactérias anaeróbias, utiliza-se uma jarra e uma saqueta de anaerobiose *GENbag anaer*.

Para microaerófilos como *Campylobacter jejuni* as necessidades de oxigénio são em menores concentrações do que as que existem na atmosfera (< 21%) sendo que crescem melhor com concentrações de oxigénio entre 1 e 15%. Assim é utilizada *uma GENbag microaer* para criar a atmosfera adequada.

Para bactérias que crescem melhor numa atmosfera enriquecida em CO₂ são utilizadas as saquetas *GENbag CO₂* para criar esta atmosfera.

Equipamentos

VITEK® 2

Sistema automatizado de identificação de microrganismos e de realização de testes de sensibilidade aos antibióticos (TSA), através da monitorização contínua do crescimento dos microrganismos no interior das cartas. Esta função é feita pelo sistema ótico. Este sistema baseia-se numa leitura de luz inicial do poço, antes do início do crescimento microbiano e posteriormente mede o crescimento microbiano através da quantidade de luz que é impedida de atravessar o poço.

As cartas para identificação e para o antibiograma são inoculadas, automaticamente, por uma suspensão feita a partir de colónias puras com uma densidade determinada segundo a escala de McFarland. No laboratório foram utilizadas as seguintes cartas de identificação bacteriana:

GN – Identificação de bactérias Gram negativas;

GP – Identificação de bactérias Gram positivas.

Para a identificação de bactérias as cartas utilizadas têm um conjunto de poços com determinadas reações químicas. As cartas utilizadas para o antibiograma utilizam o

método das diluições em meio líquido para a determinação das concentrações mínimas inibitórias. São utilizados determinados antibióticos em diluições standardizadas correspondentes aos pontos de corte de sensibilidade estabelecidos pela EUCAST.

Mini API®

Sistema semi-automatizado de leitura, utilizando um método colorimétrico, de galerias para a determinação da suscetibilidade a antibióticos.

VITEK® MS

É um sistema de identificação de bactérias e fungos que utiliza o método de espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz. As amostras microbianas são analisadas e os resultados são exibidos sob forma de espectro que é comparado com os espectros da base de dados podendo assim ser interpretados para identificação de cada amostra.

BacT/ALERT®

O BacT/ALERT® é um equipamento automatizado que monitoriza continuamente o crescimento microbiano de bactérias, leveduras e fungos. São usadas garrafas com meio de cultura com características diferentes para microrganismos aeróbios e anaeróbios. Existem garrafas para microrganismos aeróbicos e anaeróbicos que devem levar um volume de amostra de cerca de 10 ml e garrafas pediátricas que levam até 4 ml de amostra, sendo as amostras de sangue ou líquidos orgânicos estéreis. Tem por base um método colorimétrico que deteta sensores existentes no fundo de cada garrafa de cultura. Estes sensores mudam de cor se ocorrer uma alteração de pH em resposta ao aumento da concentração de CO₂ produzido pelos microrganismos.

VersaTREK® - Micobactérias

O VersaTREK® é um equipamento automatizado que monitoriza o crescimento de micobactérias através da taxa de oxigénio consumido em cada garrafa de cultura.

As garrafas contêm um meio de cultura líquido, um suplemento de crescimento e um suplemento com antibiótico para espécies potencialmente contaminantes. É utilizada uma matriz de crescimento de esponjas de celulose que permite uma melhor deteção das micobactérias.

Testes laboratoriais usados no auxílio à identificação de Bactérias

Teste da Oxidase

Deteta a presença da enzima intracelular Citocromo Oxidase, uma enzima que catalisa a reação final da cadeia respiratória transferindo elétrons para o oxigénio formando água. Neste teste esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina, para formar um composto colorido violeta, o indofenol.

Assim as colónias de bactérias que contenham esta enzima ficam violetas. Esta enzima é característica do género *Neisseria* spp. e da maioria das espécies de *Pseudomonas* spp.

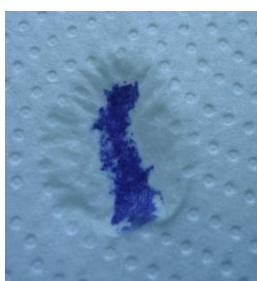


Figura 3 – Oxidase Positiva

Teste da coagulase (Pastorex Staph – Plus)

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogénicos mais frequentes encontrados em amostras clínicas. Este teste permite a distinção entre o *Staphylococcus aureus* e as outras espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo.

O teste deteta a presença do fator de afinidade para o fibrinogénio (*clumping factor*), a proteína A e polissacáridos capsulares característicos do *S. aureus*. Esta combinação permite a deteção de espécies muito e pouco encapsuladas.

Para a realização são misturadas colónias isoladas com uma gota de reagente no cartão de aglutinação. A visualização macroscópica de aglutinação é indicativa de *S.aureus*.



Figura 4 – Teste da Coagulase

Teste da catalase

Este teste é utilizado para detetar organismos que produzam a enzima catalase. Esta característica permite a distinção entre o *Staphylococcus* spp., catalase positiva, e *Streptococcus* spp., catalase negativa.

No metabolismo celular são produzidas moléculas tóxicas para a célula, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio. As bactérias aeróbicas e anaeróbias facultativas produzem enzimas como a superóxido dismutase e a catalase capazes de decompor estas moléculas. A catalase converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio segundo a seguinte reação química.



Assim bactérias que produzam a catalase podem ser detetadas usando uma solução de peróxido de hidrogénio (água oxigenada) e uma colónia do microrganismo selecionado. Num resultado positivo é observada a formação de bolhas imediatamente.

Ao utilizar colónias provenientes de uma gelose de sangue é necessário não tocar no meio ao retirar a colónia ou utilizar colónias provenientes de outro meio, visto que as células sanguíneas contendo catalase podem originar falsos positivos. No agar de chocolate não existe este problema pois as células estão lisadas. A utilização de culturas com mais de 24 horas pode originar falsos negativos. (11)



Figura 5 – Teste da Catalase

Análises efetuadas

Amostras do Aparelho Urinário

Urocultura

As infeções do trato urinário (UTI) incluem uretrite, cistite e prostatite.

A maioria das infeções do trato urinário resulta da contaminação da uretra de microrganismos provenientes do colon por via ascendente. No entanto, a via de

contaminação também poderá ser descendente, secundária a uma septicemia, ou exógena (cateter).

A *Escherichia coli* é o agente mais comum das infecções do trato urinário. O *Staphylococcus saprophyticus* é a segunda causa mais comum em mulheres sexualmente ativas. Nos casos complicados provenientes de obstruções anatómicas ou de cateterismos as causas mais comuns são *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus*, e *Pseudomonas aeruginosa*.

As mulheres têm UTI mais frequentemente que os homens, devido a diferenças anatómicas, visto que a uretra feminina é mais curta e está muito próxima ao ânus. A incidência destas infecções aumenta com a idade e com a atividade sexual.

No homem verifica-se um aumento significativo destas infecções a partir da quinta década de vida, cuja causa é a hiperplasia benigna da próstata.

Entre os utentes com risco elevado encontram-se diabéticos, utentes acamados, mulheres com DIU e pessoas em desidratação. (4)

Colheita

A colheita deve ser preferencialmente a primeira urina da manhã, rejeitando a primeira porção do jato urinário ou após retenção vesical de 2 a 3 horas. Nunca colher urina do saco da algália.

A colheita pode ser por saco coletor em bebés.

Exame Cultural

Semear com uma ansa calibrada de 1µl o meio de cultura CLED, incubação por 24h em atmosfera de aerobiose, segundo o padrão visualizado na imagem abaixo.

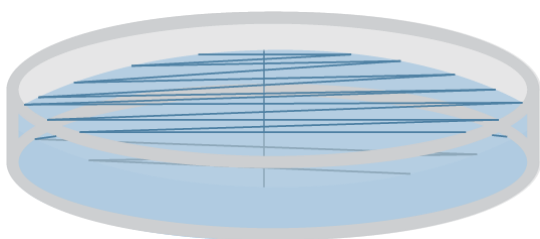


Figura 6 - Sementeira de Uroculturas

Exame Microscópico

Para a visualização do sedimento urinário é centrifugada a amostra a 1500 rpm durante 5 minutos.

Exame fresco do sedimento urinário: observação qualitativa de elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e possível presença de leveduras e bactérias.

Exame do esfregaço de urina corado por coloração de Gram: observação qualitativa de elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e possível presença de leveduras e bactérias.

Interpretação

Uma análise urinária deve ser feita em pessoas sintomáticas com UTI para determinar o pH urinário e a existência de piúria e bacteriúria.

Embora seja importante demonstrar a presença de microrganismos na urina (habitualmente estéril) há que considerar a existência de contaminações acidentais de microrganismos da região genital e períneo. Estes microrganismos podem multiplicar-se à temperatura ambiente dando lugar a interpretações erradas.

Na Tabela 4 podemos ver a interpretação habitual da contagem de bactérias na urina.

Tabela 4 – Valorização de sementeiras de Uroculturas

Nº colónias	UFC/ml	Interpretação
10 Colónias	10^4	Possível infeção urinária. O resultado deve ser valorizado tendo em conta a sintomatologia
100 Colónias	10^5	Infeção urinária
Presença de colónias de mais de 3 tipos de bactérias		Amostra polimicrobiana. Deve ser solicitada nova colheita

Se a colheita for obtida por cateterismo uma contagem de 10^4 UCF/ml é indicativa de bacteriúria importante. Caso seja inferior indica uma provável infeção.

No caso da urina por punção vesical supra-púbica ou renal percutânea lombar qualquer contagem deve ser considerada como existindo bacteriúria.

As culturas polimicrobianas indicam contaminação por flora microbiana.

A principal causa de culturas negativas com leucocitúria é a realização de tratamento antibiótico anterior. (12)

Se o pH da urina for superior a 7.9 e a urina contiver bactérias e leucócitos a causa da infecção será *Proteus* spp. devido à produção de urease. O pH não se encontra elevado por outras bactérias.

A presença de nitritos na urina é indicativo de UTI, visto várias bactérias (*E.coli* e outras bactérias Gram negativas) convertem nitratos em nitritos. No entanto existem bactérias como *Enterococcus* spp. e *S. saprophyticus* que não são capazes de fazer esta conversão de nitratos em nitritos. (4)

Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

Pesquisa do Ag Streptococcus pneumoniae na urina

Colheita

Urina ocasional em contentor estéril

A deteção do antigénio do *Streptococcus pneumoniae* é feita através de um ensaio imunocromatográfico de membrana. Podem ser utilizadas amostras de urina (diagnóstico presuntivo de pneumonia) ou de LCR (diagnóstico de meningite). O teste tem uma sensibilidade e uma especificidade entre 80% a 90 %.

Pesquisa do Ag Legionella pneumophila na urina

Colheita

Urina ocasional em contentor estéril

A deteção do antigénio da *Legionella pneumophila* serogrupo 1 é feita através de um ensaio imunocromatográfico de membrana, sendo utilizada uma amostra de urina para a sua realização. O teste tem uma sensibilidade e uma especificidade de 95%.

Amostras do Aparelho Genital

Exsudado Vaginal

O corrimento vaginal diário é o meio que o corpo tem de manter uma mucosa vaginal saudável. O corrimento normal é habitualmente claro ou leitoso sem odor. Alterações na quantidade, na cor, no cheiro e irritação, comichão ou sensação de

queimadura na região vaginal podem ser devidas a desequilíbrios da flora microbiana normal provocando vaginite. A vaginite é o problema mais comum na saúde da mulher que a leva a procurar ajuda médica. Ocorre vaginose bacteriana quando existe aumento do crescimento dos organismos da flora normal. Isto pode ocorrer quando elementos da flora normal como *Lactobacillus* sp. que diminuem e não conseguem conter o crescimento dos organismos causadores da vaginose bacteriana. Os fatores que podem prejudicar o equilíbrio da flora normal incluem gravidez, obesidade, diabetes, contraceptivos orais, corticosteróides, antibioterapia e má higiene. A atividade sexual pode também transmitir vaginose bacteriana. A principal causa desta condição é a *Gardnerella vaginalis*, um bacilo Gram positivo variável anaeróbico facultativo.

A vaginite por *Candida* sp. constitui cerca de 1/3 de todas as vaginites em mulheres em idade fértil, segundo dados espanhóis. Embora também possa aparecer em meninas e mulheres pós-menopausadas. A maioria dos casos deve-se ao crescimento excessivo de *Candida albicans*, que está habitualmente presente na mucosa vaginal.

A *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado possui uma motilidade característica que se descreve como um movimento de oscilação e rotação. Este tipo de movimento quando visto em exame a fresco ajuda ao diagnóstico desta infecção. A *Trichomonas vaginalis* é um agente comum tanto no homem como na mulher e a incidência está relacionada com a higiene e a atividade sexual.

A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria de crescimento fastidioso e frágil, sendo muito sensível a mudanças de temperatura, ambiente seco e outras possíveis causas de stress. Requer meios de cultura enriquecidos, contendo hemoglobina, NAD, extrato de levedura e outros suplementos como aminoácidos, purinas, pirimidinas e vitaminas. Deve ser utilizada uma atmosfera húmida enriquecida com CO₂ a uma temperatura entre 35-37°C. Cresce em gelose de chocolate, mas não em gelose de sangue, as colónias são brancas acinzentadas e brilhantes, de bordos lisos irregulares. Pode ser utilizada uma gelose de chocolate com adição de antibióticos, vancomicina, colistina, trimetoprim e nistatina para inibir o crescimento de bactérias Gram positivas, Gram negativas (incluindo quase todas as *Neisserias* saprófitas) e leveduras. Se a estirpe de *N. gonorrhoeae* for sensível a vancomicina não irá crescer neste meio.(13,14)

A gonorreia é uma doença sexualmente transmissível na qual a mucosa do cérvix e da uretra é infetada pela *N. gonorrhoeae*. Estas infecções são adquiridas por contacto sexual e no homem afeta a membrana da uretra, embora possa disseminar-se para uma variedade de tecidos. O mecanismo patogénico está relacionado com ligação

da bactéria às células epiteliais não ciliadas e a produção de uma endotoxina lipopolissacarídea. *N. gonorrhoeae* é sempre considerado como um agente patogénico causando doença, nunca fazendo parte da flora saprófita (1,4)

Colheita

A colheita deve ser feita com zaragatoa em meio de transporte Stuart com carvão. A mulher não deve estar menstruada e deve evitar a colocação de cremes ou óvulos vaginais na véspera da colheita.

Exame microscópico

Exame a fresco: observação da presença ou não de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes e quantificação de leucócitos e células

Gram: descrição da flora existente, possível presença de “Clue Cells”, leveduras, morfologia bacteriana e quantificação de Bacilos de Doderlein.

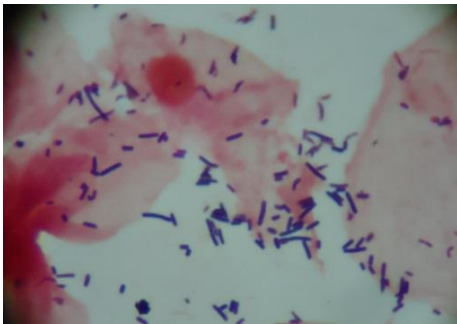


Figura 7 - Bacilos de Doderlein

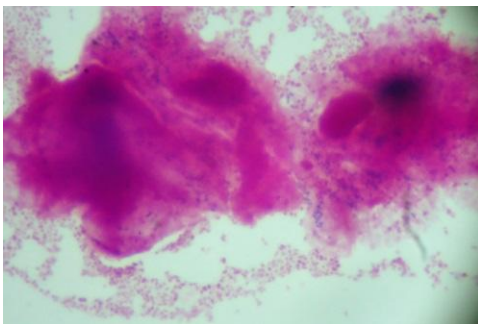


Figura 8- “Clue Cells”

Exame Cultural

Semear o meio de cultura COS e SGC, incubação de 48h em atmosfera de aerobiose e meio de VCAT colocar em incubação por 72h numa atmosfera enriquecida em CO₂.

Interpretação

Presença de leveduras no meio de SCG nomeadamente espécies de *Candida* spp. é indicativo de uma vulvovaginite por *Candida* sp.

A presença de “Clue Cells” é indicativa de diagnóstico de vaginose bacteriana.

Valorizar a presença de *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco.

A visualização de cocobacilos gram-negativos é sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae* no entanto ao contrário do homem, na mulher não é suficiente para o diagnóstico devido à presença de flora saprófita. (15)

O crescimento de pequenas colónias branco opaco elevadas e brilhantes que refletem à luz são indicativas de *Neisseria gonorrhoeae* e deve ser feita a sua identificação.

Exsudado Uretral

Colheita

Deve ser feita com zaragatoa de alumínio em meio de transporte Stuart com carvão, se possível antes da primeira micção.

Exame microscópico

Exame a fresco: Qualificação de leucócito, células, e presença ou ausência de *Trichomonas vaginalis* e de elementos leveduriformes.

Gram: Descrever a flora existente

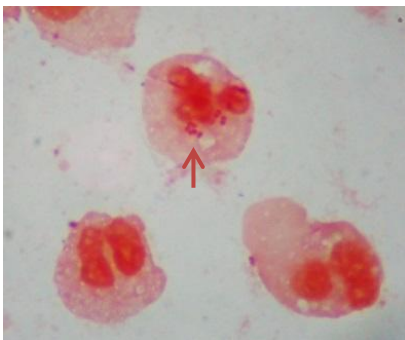


Figura 9 - *N. gonorrhoeae* em lâmina corada de um exsudado vaginal

Exame Cultural

Semear o meio de cultura SGC, incubação 48h em atmosfera de aerobiose e meio de VCAT incubação por 72h numa atmosfera enriquecida em CO₂

Interpretação

Valorizar a presença de *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco.

A observação de cocobacilos Gram negativos dentro de neutrófilos é suficiente para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae* nos homens devido à rara flora saprófita. (15)

Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B)

O *S. agalactiae* faz parte da flora do trato gastrointestinal e genitourinário e pode haver colonização de forma assintomática.

O *Streptococcus* do grupo B é uma causa relevante a nível mundial de infecção neonatal. É importante fazer rastreio nas grávidas no final da gravidez (35 a 37 semanas de gestação), para verificar se estão colonizadas, apesar deste microrganismo não constituir qualquer problema para a mãe. A contaminação do recém-nascido é a grande preocupação visto que pode originar bacteriemia, meningite e pneumonia. É essencial uma terapêutica antibiótica pré-parto caso a grávida esteja colonizada. (16)

Cresce em gelose de sangue apresentando-se em colónias brancas e com β -hemólise (1-2% das estirpes são não hemolíticas). É encapsulado e anaeróbio facultativo. Na coloração de Gram apresentam-se como cocos Gram positivos em cadeia.

O meio de Granada permite uma interpretação simples tendo uma especificidade e sensibilidade elevada. Tem por base a deteção do pigmento expressado por *S. agalactiae*. A pigmentação nestes meios é específica de *S. agalactiae* não ocorrendo noutros *Streptococcus* de outros grupos ou noutros microrganismos. Assim, no meio de Granada, o *S. agalactiae* cresce em colónias de cor laranja em atmosfera de anaerobiose.(3)

Colheita

A colheita deve ser realizada com zaragatoa em meio de transporte e deverá incluir uma colheita vaginal e rectal.

Exame Cultural

Semear o meio líquido TODD, meio de enriquecimento para *Streptococcus* sp., colocar em estufa a 37°C durante 24h e seguidamente semear com uma ansa o meio de Granada, incubação de 48h em atmosfera de anaerobiose.

Interpretação

Caso haja crescimento de colónias alaranjadas no meio de Granada procede-se ao seu reisolamento para o meio de COS para que sejam possíveis a sua identificação e a realização de TSA.

Pesquisa Ag *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis é uma bactéria Gram-Negativa muito pequena, sendo uma bactéria intracelular obrigatório.

Na maioria dos casos são infeções assintomáticas, embora possam conduzir a complicações sérias se não forem tratadas. O quadro clínico inclui corrimento característico mucopurulento, bartolinite, cervicite, endometrite, salpingite e uretrite.

Os doentes assintomáticos são um reservatório importante para a transmissão da *C. trachomatis*. No homem a infeção genital é sintomática. (1)

Colheita

Zaragatoa de dacron em tubo sem meio de transporte para a colheita do exsudado endocervical.

A detecção do antígeno de *Chlamydia trachomatis* é feita através de um ensaio imunocromatográfico de membrana no qual o antígeno é extraído através de calor e de um reagente. Podem ser utilizadas amostras de urina (homem) e uretral ou através de um exsudado endocervical (mulher). O teste tem uma sensibilidade e uma especificidade maior que 90 % em amostras femininas.

Pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*

As bactérias do género *Mycoplasma* spp. representam um grupo de microrganismos complexos sofisticados e únicos entre os procariotas. Possuem uma relação íntima com o hospedeiro com localização intracelular, o que os torna parte da flora microbiana vaginal. As espécies que se comportam como patogénicas ocasionam infeções geralmente crónicas, muito raramente agudas. No entanto *M. hominis* e *U. urealyticum* estão associados a patologia do trato urogenital dos adultos, do feto e do recém-nascido. O *M. hominis* contribui muito para as complicações da gravidez, provavelmente porque está implicado na vaginose bacteriana.(17)

Colheita

Para amostras endocervicais e uretrais a colheita deve ser feita utilizando uma zaragatoa de dacron. Para urina deve ser usado um contentor estéril.

A identificação de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* nas amostras ocorre através do seu crescimento. Este crescimento é verificado pela mudança de cor do indicador de pH de amarelo-laranja para vermelho ou rosa.

O teste tem uma sensibilidade e uma especificidade superior a 90 %.

Aparelho Respiratório

Exsudado Nasal – estudo de colonização

Colheita

Em zaragatoa em meio de transporte de Stuart

Exame cultural

Semear o meio de MSRM, incubar por 24h em atmosfera de aerobiose

Interpretação

Só para pesquisa de portadores de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA). O crescimento de colónias rosas é indicativo da presença de MRSA.

Exsudado Orofaríngeo

Sendo a principal causa de faringite viral, na faringite bacteriana a principal causa é o *Streptococcus pyogenes*. Outras causas de faringite são *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* e *Corynebacterium diphtheriae*, devendo a pesquisa destes agentes ser feita exclusivamente quando existe suspeita clínica e por solicitação específica do médico.(1)

Colheita

Deve ser utilizada uma zaragatoa com meio de transporte de Stuart, passar a zaragatoa nas áreas de exsudação, membranas ou locais de evidente inflamação e nas criptas amigdalinas, de uma forma vigorosa evitando tocar nas paredes laterais da boca.

Exame cultural

Semear o meio de COS colocar em atmosfera de CO₂ por 48h

Pesquisa direta do antígeno de *Streptococcus* do grupo A

O *S. pyogenes* é um dos principais agentes bacterianos responsável pela faringite, mais frequente em crianças até aos 18 anos.

Apresentam o antígeno do grupo A (dímero de N-acetilglicosamina e ramnose) presente na parede celular. Este antígeno é a base do teste rápido para detecção de *S.pyogenes*.

Colheita

Deve ser utilizada uma zaragatoa sem meio transporte, sendo a colheita idêntica ao exsudado faríngeo.

A detecção do *Streptococcus* do grupo A é realizado por teste de Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*) através da detecção do antígeno. O teste tem uma sensibilidade e especificidade superior a 90%.

RSV – Vírus Sincicial Respiratório

Colheita

Secreções Brônquicas

RSV é o agente mais comum de bronquiolite e pneumonia entre lactentes e crianças menores de 2 anos de idade. A fase de epidemia tende a durar 5 meses, começando no outono entre o final de outubro a meados de dezembro, terminando no início da primavera.

Uma infecção por RSV é mais comum em crianças que não são amamentadas, frequentam o infantário, vivem num ambiente com familiares fumadores e socialmente desfavorecido. Reinfecção também é comum porque os anticorpos RSV não fornecem uma imunidade duradoura.(18)

O diagnóstico definitivo de RSV como o agente causador é realizado por teste de Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*) através da detecção do antígeno. A amostra

utilizada para este teste são secreções brônquicas, tendo o teste uma sensibilidade e especificidade superior a 90%.

Expetoração e Secreções Brônquicas

A pneumonia é definida como uma condição inflamatória do pulmão na qual os alvéolos se enchem de líquido.

São numerosos os microrganismos causadores de pneumonia, sendo as bactérias as responsáveis na maioria dos casos. As causas habituais de pneumonia dependem do estado da imunidade do doente, do local onde adquiriu a pneumonia, da idade e do tipo de pneumonia apresentada pelo doente. As pneumonias de origem viral são normalmente menos graves que as de origem bacteriana.

A pneumonia adquirida na comunidade é uma entidade clínica muito frequente que regista uma morbidade importante (35% requerem hospitalização) e uma mortalidade significativa. Cerca de 40% destas pneumonias são causadas por *Streptococcus pneumoniae*, e cerca de 30% são de origem viral. (19)

A pneumonia nosocomial é uma das principais causas de infeção hospitalar e define-se como uma pneumonia que ocorre após 48h de internamento. É essencial encontrar o agente responsável dado que este tipo de pneumonia é bastante mais grave que a pneumonia adquirida na comunidade, sendo a principal causa de morte por infeções nosocomiais. Identificando o agente causal, permite a administração rápida do antibiótico adequado.

Nos doentes hospitalizados regista-se uma substituição drástica das bactérias gram-positivas da flora orofaríngea normal por bactérias gram-negativas ou mesmo multirresistentes.

Na seguinte tabela é possível observar quais os agentes mais e menos frequentes nos diferentes tipos de pneumonias. (4)

Tabela 5– Agentes Mais e Menos Frequentes nos Diferentes Tipos de Pneumonias

	Agentes mais frequentes	Agentes menos frequentes
Pneumonia Adquirida na comunidade	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>H.influenzae</i> ,	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Pneumonia nosocomial Sem ventilação assistida	<i>P. aeruginosa (>50%)</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>S. aureus</i>	<i>Legionella</i> , <i>S pneumoniae</i>
Pneumonia nosocomial Com ventilação assistida	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>enterobacterias</i> <i>P.aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>S.maltophilia</i>	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Legionella</i>
Doente imunodeprimido	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>enterobacterias</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>micobactérias</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>Legionella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Histoplasma</i>
Pneumonia por aspiração	<i>Prevotella melaninogenicus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Anaeróbios</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>bacilos gram-negativos</i>	

Colheita

A colheita deverá ser de uma expetoração profunda e não de saliva. De preferência, primeira amostra da manhã em jejum, após higiene da boca

Exame microscópico

Preparar esfregaços de uma parte purulenta da amostra para a coloração de Gram e Kinyoun.

A avaliação da lâmina de Gram é essencial para garantir qualidade das amostras, já que a presença de células epiteliais é indicadora de contaminação orofaríngea. Esta avaliação é segundo o critério de Murray e Washington, Tabela 6. Segundo este critério devem ser processadas as amostras que se englobem no grupo 4 e 5, visto serem as de boa qualidade para o exame bacteriológico habitual. (9)

As lâminas das amostras pertencentes ao grupo 4 e 5 são vistas na objetiva de 100x para observar a possível presença e predomínio de bactérias.

Tabela 6 -Tabela de Murray e Washington

	Células epiteliais: ampliação (10 X)	Leucócitos: ampliação (10 X)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	< 10	25

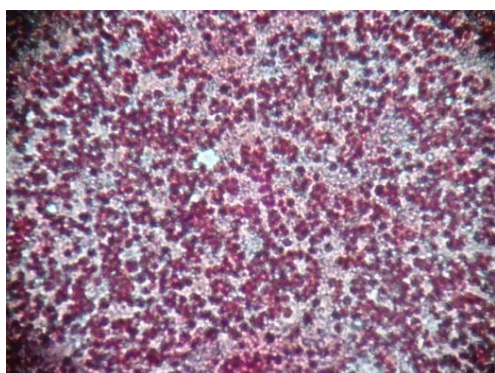


Figura 10 - Amostra respiratória grupo 5 segundo a Tabela de Murray e Washington

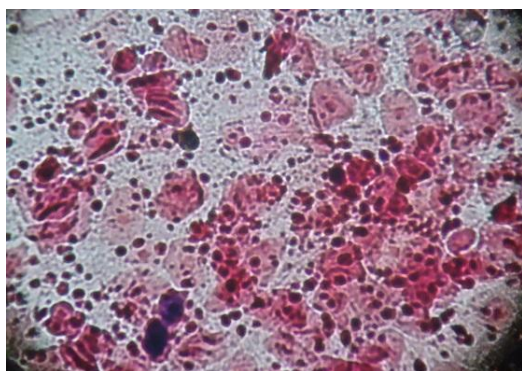


Figura 11 - Amostra respiratória de má qualidade

A primeira imagem é um exemplo de uma amostra do grupo 5, apresenta mais de 25 PMN e menos de 10 células epiteliais por campo. Sendo assim considerada uma amostra de boa qualidade é feito o seu processamento. A segunda imagem é um exemplo de uma amostra que apresenta mais de 25 células por campo não é considerada uma amostra de boa qualidade.

Exceções: Este critério não deverá ser aplicado em doentes neutropênicos. De ter em conta que certos microrganismos, como *Mycobacterium tuberculosis*, devem ser sempre valorizados independentemente da qualidade da amostra.

O esfregaço ao qual se procedeu a coloração de Kinyoun tem por objetivo a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes sugestivos de tuberculose.

Exame Cultural

Se for considerada uma amostra de boa qualidade, procede-se ao exame cultural. De uma porção purulenta selecionada, semear com ansa esterilizada calibrada de 10µl, segundo o método dos quatro quadrantes, o meio de cultura McK incubação por 48h e COS e HAEM incubação por 48h numa atmosfera enriquecida em CO₂.

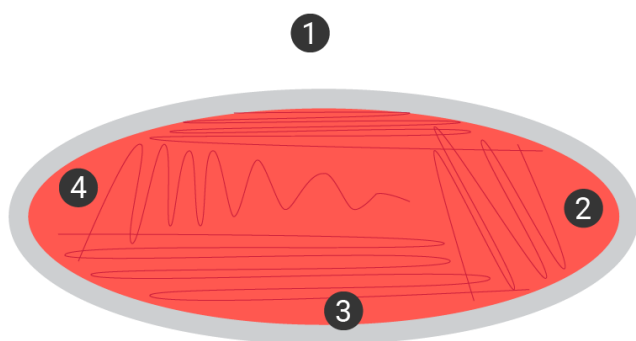


Figura 12 – Sementeira em 4 quadrantes

Interpretação

A expetoração, além de microrganismos, contém uma mistura de elementos variados como células do epitélio respiratório, proteínas e outros materiais de secreção produzidos nos pulmões como resultado da resposta inflamatória. A expetoração deve ser obtida espontaneamente a partir de um acesso de tosse profunda e deverá conter secreções purulentas típicas do trato respiratório inferior. Devem descartar-se as amostras de saliva ou secreções pós-nasais. As secreções brônquicas serão obtidas por aspiração endotraquial nos doentes entubados ou com ventilação mecânica.

O diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade.

Nas amostras consideradas de boa qualidade é necessário observar a flora microbiana na lâmina de Gram procurando se existe um tipo predominante que posteriormente poderá crescer em quantidades significativas nas geloses no segundo e terceiro quadrante, sendo assim passíveis de serem consideradas para valorização. Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

Espécies de *Candida spp.* não são causa de pneumonia, são normalmente colonizantes da orofaringe. (9,19)

Lavado Bronco-alveolar

O lavado bronco-alveolar é obtido por instilação e aspiração de uma solução de NaCl 0,85% através de um broncoscópio.

Deve ser centrifugado por 15 minutos a 1500 rpm antes de se proceder à realização dos esfregaços e do exame cultural.

Exame microscópico

Na coloração de Gram procede-se a uma semi-quantificação e caracterização morfológica dos microrganismos presentes e da ausência ou presença de polimorfonucleares.

O esfregaço ao qual se procedeu a coloração de Kinyoun tem por objetivo a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes sugestivos de tuberculose

Exame Cultural

Semear com ansa esterilizada calibrada de 10µl os meios de COS e HAEM incubação por 48h numa atmosfera enriquecida em CO₂

Interpretação

Após observação da flora microbiana na lâmina de Gram, procura-se um tipo predominante que posteriormente poderá crescer em quantidades significativas nas geloses no segundo e terceiro quadrante, sendo assim passíveis de serem consideradas para valorização. Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA

Aparelho Gastrointestinal

A nível mundial as infeções gastrointestinais continuam a ser uma das causas mais importantes de mortalidade e morbidade entre lactentes e crianças. Na clínica das gastroenterites destacam-se a febre, os vómitos, as dores abdominais e a diarreia moderada a intensa.

Os principais agentes patogénicos bacterianos são *Shigella* sp., a *Salmonella* sp. e o *Campylobacter* sp.

O género *Shigella* spp. é constituído por bacilos Gram-negativos, não capsulados e que não fermentam a lactose. É dividido em quatro espécies: *S. dysenteria*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. A sua presença é sempre patogénica, a sua transmissão faz-se por água contaminada, comida, mosca e por pessoa-pessoa. A *S. sonnei* é a causa mais comum de shigelose nos países desenvolvidos, enquanto que a *S. flexneri* é mais comum nos países em desenvolvimento (limitada ao trato gastrointestinal e raramente provoca bacteriemia). A *S. dysenteria* produz a exotoxina Shiga cujo efeito é semelhante ao da *E. coli* enterohemorrágica que provoca diarreia evoluindo para dores severas no epigastro e tenesmo com pus e sangue abundantes nas fezes.

O género *Salmonella* spp. é constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis (flagelos peritricos). Divide-se em duas espécies *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. Os serogrupos *S. typhi* e *S. paratyphi* apenas causam doença em hospedeiros humanos. A transmissão é feita por ingestão de água ou alimentos contaminados. Mais frequentemente contaminados são aves, ovos, gado bovino e porcino ou portadores assintomáticos que manipulam e contaminam alimentos. Raramente a transmissão é feita de pessoa a pessoa em infantários e hospitais. A infeção localiza-se no ílion e o colon, havendo penetração das células epiteliais. Entre as formas clínicas provocadas nas infeções por *Salmonella* sp., a enterite é a forma mais comum, advindo com o quadro clássico de gastroenterite, com duração de 2 dias a 1 semana e resolução espontânea. A septicémia é mais comum crianças, idosos e imunodeprimidos podendo ter consequências graves. Pode provocar febre entérica também chamada febre tifóide com disseminação para vários órgãos. A colonização assintomática é rara.

O género *Campylobacter* spp. são bacilos Gram negativos pequenos em forma de espiral, oxidase positivo e móveis devido a um flagelo polar. A maioria das espécies são micro-aeróbicas o que leva à utilização de uma atmosfera apropriada. A gastroenterite por *Campylobacter* sp. é uma infeção habitualmente auto-limitada, necessitando apenas reposição de líquidos e eletrólitos.

Coprocultura

A coprocultura é o método de diagnóstico usado para o diagnóstico de infeções bacterianas intestinais. Por norma são pesquisadas apenas *Shigella* sp., *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp.

Exame cultural

Semear os meios de HEKT, Mck e Selenito por 24h em atmosfera de aerobiose. O meio líquido Selenito após 24h é feita uma passagem para o meio de HEKT. Semear o meio de CAMPY e colocar por 5 dias em atmosfera de microaerofilia.

Interpretação

A *Shigella* sp. forma colónias verdes transparentes no meio de Hektoen, não há fermentação de lactose nem produção de ácido.

A *Salmonella* sp. forma colónias esverdeadas, a maioria das estirpes tem um centro preto ou são completamente pretas.

Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

O *Campylobacter* sp. apresenta colónias pequenas, brilhantes e de cor transparente acinzentada, que são oxidase e catalase positiva. Pode também ser feita uma coloração onde são observáveis bacilos Gram negativos pequenos em forma de espiral.

Clostridium difficile

Clostridium difficile é um bacilo Gram positivo anaeróbico. A manifestação clínica é a diarreia causada pelas toxinas A e B, sendo a principal causa de diarreia nosocomial nos países desenvolvidos. Esta condição clínica é consequência da ingestão de esporos de *C. difficile* resistentes à ação do ácido gástrico que colonizam em seguida o colon. As suas toxinas provocam a diarreia e a formação de pseudomembranas.

C. difficile faz parte da flora intestinal normal num pequeno número de pessoas saudáveis e hospitalizadas. No entanto é responsável por gastroenterites associadas a antibioterapia, podendo o quadro clínico ir de uma diarreia benigna auto-limitada até uma colite pseudomembranosa severa com risco de vida. Nos seis primeiros meses de vida é comum que o recém-nascido seja portador assintomático (quase 50%). A doença é rara nesta faixa etária porque o seu intestino não possui recetores para a toxina.

Os principais fatores de risco são a antibioterapia recente, a idade superior a 65 anos, internamentos hospitalares prolongados, doença de base severa, nutrição por sonda nasogástrica e quimioterapia (20)(1)

O teste rápido é uma técnica imunoenzimática que utiliza anticorpos específicos do glutamato desidrogenase (GDH) e das toxinas A e B do *C. difficile* para a deteção do antígeno e das toxinas, respetivamente.

A GDH é uma enzima da parede celular do *C. difficile* produzida em quantidade muito superior às outras toxinas. Não é uma técnica específica dado que se encontra em várias estirpes (produtoras ou não de toxinas). Um resultado positivo necessita a confirmação por deteção das toxinas.

Para a realização do teste é formado um complexo amostra conjugado (composto por anticorpos de glutamato desidrogenase e anticorpos das toxinas A e B). Este complexo liga-se. Os complexos de conjugado antígenos-anticorpo migram através de uma membrana onde são captados pela glutamato-desidrogenase e pelos anticorpos específicos das toxinas A e B presentes nas linhas da membrana. Esta ligação produz uma linha colorida.

O teste tem uma sensibilidade e uma especificidade superior a 90%.

Nos casos em que a GDH é positiva é necessário fazer a confirmação da toxina por PCR.

Rotavírus

As gastroenterites agudas são responsáveis por uma alta taxa de morbidade e mortalidade entre crianças em todo mundo, sendo que o rotavírus constitui um dos principais agentes etiológicos de diarreia.

A deteção do rotavírus é feita por um teste de imunocromatografia cuja sensibilidade e especificidade é superior a 95%, sendo as fezes a amostra necessária para a sua realização.

Giardia lamblia

A deteção de *Giardia lamblia* é feita por um teste rápido imunocromatográfico.

Aparelho Circulatório

Sangue – Hemoculturas

Define-se como bacteriemia a presença de bactérias no sangue. Revela-se pelo seu isolamento nas hemoculturas. Como o sangue é um produto biológico estéril o crescimento de um microrganismo é geralmente agente etiológico da infeção.

A bacteriemia e a fungemia ocorrem quando os microrganismos invadem a corrente sanguínea, multiplicando-se a um ritmo que supera a capacidade para eliminá-los do sistema reticulo endotelial, são complicações graves das infeções bacterianas e

fúngicas. Dado que têm uma metodologia de diagnóstico muito semelhante, serão descritas conjuntamente.

O foco infeccioso pode ser extravascular, cuja disseminação se faz pelos capilares sanguíneos ou pelos vasos linfáticos, ou pode ser intravascular (endocardite, infecção de cateteres intravenosos ou arteriais). A incidência da bacteriemia depende do tipo de doentes estudados (5-30 casos por 100 doentes hospitalizados) e pode aparecer em qualquer idade principalmente em doentes com graves patologias de base e nos doentes submetidos a procedimentos que alteram os mecanismos de defesa. (21)

Os focos mais frequentes de bacteriemia são o trato genito-urinário, abscessos, feridas cirúrgicas, trato biliar e os cateteres intravasculares. O foco é desconhecido em cerca de 25% dos casos. (21)

A maioria dos microrganismos é capaz de invadir a corrente sanguínea provocando bacteriemias transitórias, intermitentes ou persistente (endocardite). Atualmente, os Gram positivos, em particular *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. podem igualar ou superar em frequência de bacteriemias que ocorrem nas bactérias Gram negativas. As causas disto são múltiplas, principalmente a utilização de antibióticos de largo espectro, o uso generalizado de cateteres intravasculares e o emprego de métodos de diagnóstico invasivo. Também o aumento de doentes imunodeprimidos por terapêuticas anti-neoplásicas ou infecções por HIV teve como consequência de bacteriemias por agentes que no passado raramente eram menos comuns.

Colheita

A colheita do sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de qualquer das veias periféricas. É muito importante a desinfecção. Quando são realizadas mais do que uma hemocultura sequencialmente, as colheitas devem ser em diferentes veias periféricas.

Anteriormente à inoculação dos frascos deve ser feita uma desinfecção e secagem da rolha de borracha dos frascos. Não deve haver uma mudança de agulha para a introdução do sangue no frasco.

É importante respeitar as quantidades, já que a concentração dos microrganismos é baixa na maioria dos casos, sobretudo quando o doente está sob terapêutica antibiótica. Nas crianças a concentração dos microrganismos é muito mais alta que nos adultos, sendo assim suficientes, volumes menores de sangue. (9,21)

Tabela 7 - Volumes aconselhados para colheita de Hemoculturas:

Recém-nascido	1 a 2 ml para frasco de aerobiose. Não exceder 4,5% do peso corporal
Crianças	2 a 4 ml por punção venosa para frasco de aerobiose
Adultos	20 ml por punção venosa, distribuídos por 2 frascos 10 ml cada (aeróbio/anaeróbio)

De forma geral as colheitas devem ser feitas antes de se iniciar a terapêutica antimicrobiana e sempre que exista suspeita clínica de *sepsis*, meningite, osteomielite, pielonefrite, infecção intra-abdominal, artrite, infecções graves da pele e de tecidos moles, pneumonia, endocardite e febre de origem indeterminada.

A diminuição súbita da vitalidade em crianças pequenas ou em idosos também é uma indicação para a colheita de hemoculturas, já que nestes grupos etários a bacteriemia pode cursar de forma assintomática.

Número de hemoculturas e intervalo de colheita

A colheita feita de uma única punção venosa é inoculada habitualmente em dois frascos (aeróbio e anaeróbio). Considera-se ótimo para cada episódio de bacteriemia 2 a 3 colheitas de lugares diferentes, com um intervalo de 1h. Com este método conseguem detetar-se mais de 95% das bacteriemias. Nos doentes com suspeita de endocardite é útil um maior de número de colheitas. (21)

Não se deve colher sangue para hemocultura no pico febril. Se possível, a colheita deve realizar-se após a aparição dos primeiros sintomas já que as bactérias são eliminadas rapidamente do sangue pelas células do sistema reticulo-endotelial.

Se houver urgência em iniciar antibioterapia, colher as duas hemoculturas seguidas e de locais diferentes. A colheita de sangue deve ser efetuada antes da administração de antibioterapia. No entanto, a toma de antibiótico, não exclui a hemocultura. A colheita, neste caso, deve ser executada no momento em que houver em circulação uma menor concentração de antibiótico, ou seja, antes da próxima administração.

Exame Cultural

É utilizado um sistema automático de monitorização contínua, BacT/Alert®. A deteção do crescimento bacteriano é efetuada automaticamente por medição do CO₂ produzido.

As garrafas de hemocultura depois de inoculadas devem ser inseridas no BacT/Alert®, onde ficam em incubação durante 5 dias.

O sistema avalia se as garrafas de hemocultura são positivas ou negativas, conforme haja ou não crescimento microbiano.

No caso de a hemocultura ser positiva, quando o equipamento deteta positividade, deve-se realizar uma passagem para meio sólido, normalmente gelose de sangue com incubação em atmosfera de aerobiose durante 24h. Na garrafa de anaerobiose é feita também uma passagem para um meio de SCS e colocado em atmosfera de anaerobiose. É possível a realização de passagens para diferentes meios e atmosferas de incubação de acordo com a visualização da lâmina de Gram.

Exame Microscópico

Quando uma hemocultura é considerada positiva pelo BacT/Alert® é feito um esfregaço que será corado pelo método de Gram de modo a ser possível observar a morfologia do microrganismo presente na garrafa.

Interpretação

Com o objetivo de obter resultados o mais cedo possível, é visualizada a lâmina de Gram. Pela observação microscópica pode ser possível através da morfologia das bactérias fazer uma identificação presuntiva e caso seja necessário, informar o médico responsável pelo doente do resultado crítico

É muito importante haver uma distinção entre uma bacteriemia efetivamente verdadeira e inquinação. Um dos dados que auxilia nesta distinção é o tipo de bactéria identificado. Enquanto bactérias como o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outras enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* são responsáveis por causar bacteriémias em 90% dos casos em que são isolados, outros microrganismos como os *Staphylococcus* coagulase negativa, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp. e algumas espécies de *Clostridium*, por fazerem parte da flora microbiana da pele do doente nem sempre representam uma bacteriemia quando isolados. Neste caso, calcula-se que apenas 5% sejam bacteriémias verdadeiras.(9,21)

Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

Ponta de Cateter (Cateter Venoso Central- CVC)

É cada vez mais frequente a utilização de cateteres intravasculares com fins de diagnósticos ou terapêuticos, particularmente em doentes em situação crítica ou com patologias agudas ou crónicas graves. Os microrganismos que produzem com mais frequência infeções associadas a CVC são os que pertencem à flora habitual da pele. Os casos observados são causados habitualmente (60%) por diferentes espécies de *Staphylococcus* sp., embora se registre nos últimos anos um aumento de *Enterococcus* sp. Os bacilos Gram negativos e diferentes espécies do género *Candida* spp. também têm sido observados. (22)

A contaminação dos dispositivos intravasculares é uma causa frequente e grave de infeção hospitalar. Para o clínico determinar de forma curial a origem provável desta contaminação é necessária a cultura do cateter e hemoculturas.

Colheita

Imediatamente antes de se retirar o cateter deve-se colher sempre sangue para hemocultura através de uma veia periférica (nunca através do cateter), pois só assim será possível valorizar o exame cultural do mesmo.

É importante fazer a desinfeção da pele do orifício de entrada do cateter, seguidamente retirar o cateter e cortar cerca de 3-5 cm distais e enviar para o laboratório.

Exame Cultural

Semear segundo a técnica de *Maki*, COS 48h numa atmosfera de aerobiose.

Este método tem por objetivo cultivar a superfície externa da ponta do cateter. A técnica consiste em rodar cerca de 4 a 5 vezes sobre a superfície do meio de COS. A técnica de *Maki* é um método semi-quantitativo para semear a ponta de cateter. Tem uma especificidade de 76% e devido à sua simplicidade foi adotado pela maioria dos laboratórios de microbiologia como a técnica de referência. (22)

Interpretação

Se na cultura não se observa crescimento ou se este for inferior a 15 colónias, é considerado como um resultado negativo. Se for superior a 15 colónias considera-se um resultado positivo valorizável até três microrganismos diferentes.

A bacteriemia ou a fungemia relacionada com o cateter, obtida após a remoção do mesmo, necessita que o mesmo microrganismo seja isolado na hemocultura extraída de uma veia periférica e na cultura da ponta do cateter para ser valorizada, num doente com quadro clínico de *sepsis* e sem outro foco aparente de infeção. (22)

Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

Líquidos Orgânicos

Os líquidos orgânicos são normalmente estéreis e qualquer microrganismo encontrado deve ser investigado. A interpretação final deve ter em conta o estado clínico do doente e o microrganismo isolado.

Colheita

Procedimento de colheita é feito por equipa médica especializada, por aspiração com agulha e seringa. Colher para um tubo cónico ou contentor seco esterilizado.

Os líquidos límpidos devem ser concentrados por centrifugação, centrifugar durante 15 min a 1500 rpm. As amostras purulentas podem ser inoculadas diretamente nos meios de cultura

Líquido Pleural

Exame microscópico

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame cultural

Semear os meios de COS e HAEM e colocar numa atmosfera de CO₂ por 48h e os meios de CNA e BHI em atmosfera de aerobiose por 48h.

Interpretação

Devem ser valorizados todos os microrganismos procedendo-se à identificação e TSA dos agentes isolados.

Líquido Sinovial

Exame microscópico

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame cultural

Semear os meios de Mck e BHI em atmosfera aerobiose por 48h, os meios de COS e HAEM em atmosfera de CO₂ por 48h e o meio de VCA em atmosfera CO₂ por 72h.

Interpretação

Devem ser valorizados todos os microrganismos procedendo-se à identificação e TSA dos agentes isolados.

Líquido ascítico, Bólis

Exame microscópico

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame cultural

Semear os meios de Mck, CNA, COS e BHI em atmosfera de aerobiose por 48h.

Interpretação

Devem ser valorizados todos os microrganismos procedendo-se à identificação e TSA dos agentes isolados.

Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

A Meningite Bacteriana é uma Emergência Médica, já que a infecção das meninges é uma situação clínica grave e potencialmente mortal se não for tratada atempadamente.

O diagnóstico laboratorial é uma urgência que requer processamento imediato do produto para determinar o agente etiológico.

O Sistema nervoso é suscetível de ser infetado por diferentes microrganismos que incluem bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintas. A apresentação clínica destas infeções pode ser aguda subaguda ou crónica, dependendo da etiologia, da virulência do microrganismo e da localização do processo infeccioso. (9)

Meningite no Recém-Nascido

As bactérias são causas habituais de meningite infantil até ao 1º mês de vida. No entanto, após um mês de vida a causa mais habitual será viral. Na presença de um quadro clínico de febre e letargia ou irritabilidade num recém-nascido ou numa criança com mais de 1 mês de idade é importante considerar o diagnóstico de meningite, mesmo que a semiologia clássica da meningite esteja ausente (febre, rigidez da nuca, alterações mentais).

Nas *sepsis* e meningites neonatais o microrganismo isolado com maior frequência é o *S. agalactiae*. O segundo agente de *sepsis* e meningite neonatais é *E.coli*. Este agente está particularmente relacionado com a prematuridade, o baixo peso ao nascer, a antibioterapia prévia e as infeções urinárias maternas pela citada bactéria durante a gravidez. Como terceiro agente mais comum aparece a *L. monocytogenes* que, ao inverso das anteriores pode transmitir-se de modo transplacentário (raramente). As consequências da infeção por este agente são muito graves, sendo frequente a morte fetal. (23)

Meningite aguda

As causas mais comuns da meningite bacteriana aguda dependem da idade, do *status* imunológico, e da origem comunitária, hospitalar ou associada a cuidados de saúde.

A patogénese da meningite bacteriana aguda resulta de uma interação de fatores próprios do microrganismo e dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O processo inicia-se com a colonização da nasofaringe. Os três microrganismos habitualmente implicados *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, transmitem-se por via respiratória e aderem ao epitélio, gerando assim o estado de portador assintomático, ocorrência muito frequente (cerca de 10% a 50% da população). É frequente o quadro meníngeo ser precedido por uma infeção respiratória alta. Na forma mais aguda, que é a

mais habitual, o quadro meníngeo é de aparição brusca e os sintomas são rapidamente progressivos. No entanto só algumas estirpes possuem características virulentas que lhes permitem atravessar a parede faríngea e invadir a corrente sanguínea, sendo esta o meio de transmissão bacteriana mais comum. Outras infeções ou colonizações podem resultar em bacteriemia tais como aparelho auditivo, seios peri nasais, garganta, pulmões, coração e trato gastrointestinal. A partir da corrente sanguínea as bactérias podem colonizar os grandes seios venosos do crânio e assim penetrar a dura e a aracnóideia e atingir o SNC.

Na meningite a *Neisseria meningitidis*, os serogrupos B e C foram predominantes em Portugal, à semelhança do que se passa noutros países europeus. O número de casos de meningite que se estimou estarem associados ao serogrupo B não apresentou tendência crescente entre 2000 e 2006, mas o número de casos por serogrupo C teve uma queda abrupta a partir de 2002. A vacina contra o meningococo do serogrupo C, MenC, está disponível, em Portugal, desde 2002 no mercado livre e no Programa Nacional de Vacinação (PNV) desde 2006, o que levou à quase ausência de casos de doença por este serogrupo nos últimos anos. Desde 2014 existe também uma vacina contra infeções por meningococos do serogrupo B, Bexsero®, embora não pertença ao PNV.(24–26)

Na meningite a pneumococos a mortalidade é aproximadamente de 8% entre as crianças e 22 % nos adultos. São comuns sequelas neurológicas nos sobreviventes. O *S.pneumoniae* é a causa principal da meningite bacteriana nas crianças com menos de 5 anos. (6)

Na tabela 8 é possível observar quais os agentes mais comuns em meningites adquiridas na comunidade e meningites nosocomiais

Tabela 8– Agentes de Meningites Adquiridas na Comunidade e Meningites Nosocomiais

	Adquirida na Comunidade	Nosocomial
Recém-nascido (até 1 mês de idade)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Gram-negativos (principalmente <i>Escherichia coli</i>)
Pessoas desde 1 mês de idade até aos 50 anos.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> ,	
Pessoas com mais de 50 anos, alcoólicos, imunodeprimidos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	

Meningite Crónica

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma causa comum de meningite crónica. A causa mais comum de meningite crónica em doentes com HIV é *Cryptococcus neoformans*.

Colheita

A colheita de LCR é um ato exclusivamente médico. É recomendada a colheita em pelo menos 2 tubos, preferencialmente 3. Os primeiros são utilizados para o exame citológico e bioquímico e o último para o exame microbiológico. Caso haja suspeita de meningite, deve-se colher também hemoculturas para o diagnóstico de bacteriemia.

Deve ser enviado ao laboratório imediatamente após a colheita, e mantido à temperatura ambiente (ou na estufa a 35°C) e nunca refrigerado antes do processamento, a não ser que sejam pedidos estudos virais. Apenas o LCR utilizado para a realização de estudos virais deve ser refrigerado ou congelado.

Exame microscópico

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame Cultural

Semear os meios de COS e PVX e colocar em atmosfera de CO₂ e BHI atmosfera de aerobiose por 72 horas.

Interpretação

Existem métodos rápidos de deteção de Ag de certas bactérias que podem auxiliar na identificação do agente.

Devem ser valorizados todos os microrganismos procedendo-se à identificação e TSA dos agentes isolados.

Pele e Tecidos

Muitas são as situações clínicas e muitos são os respetivos microrganismos responsáveis por infeções localizadas que conduzem à formação de exsudados purulentos.

Quando estudados estes microrganismos, é importante ter em conta a flora normal de cada local proveniente. Deve ser também considerada a história clínica, tipo de infecção (abcedada ou não) e modo de colheita.

O pus em abscessos fechados contém, normalmente, apenas microrganismos causadores de infecção e devem por isso ser sempre valorizados.

No caso das escaras em que a amostra é colhida por zaragatoa trata-se, de uma amostra não muito representativa, podendo estar contaminada com flora colonizadora da pele.

Exsudado purulento superficial e aspirado subcutâneo

Colheita

As colheitas podem ser efetuadas, assepticamente, por aspiração utilizando um contentor estéril/Portagerm (preferencialmente) para o seu transporte ou por zaragatoa.

Em exsudados de lesões fechadas a colheita profunda deve ser realizada por punção e aspiração com agulha e seringa. Não devem ser usadas zaragatoas para a colheita de amostras provenientes deste tipo de lesões.

Não é aconselhado o exame microbiológico de exsudados de escaras e feridas de pressão.

Exame microscópico

Deve ser apenas realizado em exsudados colhidos em contentor estéril e não em exsudados colhidos com zaragatoa.

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame cultural

Semear os meios de Mck, CNA, COS e BHI, colocar em atmosfera de aerobiose durante 48h.

Se colhida em Portagerme semear também os meios de SCS, colocar em atmosfera de anaerobiose por 5 dias, e PVX e colocar em atmosfera de CO₂ por 48h.

Interpretação

Só realizar a identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos agentes isolados em amostras colhidas corretamente e em bactérias consideradas como agentes etiológicos de infecção.

Biópsias

Procedimento de colheita executado por equipa médica especializada. Colocar em contentor estéril de boca larga

Exame microscópico

Gram: Na observação microscópica é importante visualizar a ausência ou presença de polimorfonucleares assim como a presença ou ausência de bactérias.

Kinyoun: Presença de bacilos álcool-ácido resistentes

Exame cultural

Semear os meios de COS, PVX, colocar em atmosfera de CO₂, e BHI por 48h

Interpretação

Devem ser valorizados todos os microrganismos procedendo-se à identificação e TSA dos agentes isolados.

Exsudados oculares

Nas condições patológicas oculares as manifestações clínicas são frequentemente inespecíficas. É necessário que este diagnóstico seja obtido o mais rapidamente possível dado que os tecidos oculares são muito vulneráveis à resposta inflamatória e a sua lesão pode conduzir à perda irreversível da acuidade visual.

As principais patologias oculares são a blefarite (infecção da pálpebra), conjuntivite (inflamação da conjuntiva, habitualmente a vírus, podendo a *Neisseria gonorrhoeae* causa-la no recém-nascido), queratite (infecção da córnea, de causa bacteriana na maioria dos casos). No seguinte quadro é possível observar os principais agentes.

Tabela 9 – Principais Agentes presentes em Exsudados Oculares

	Principais Agentes
Blefarite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Conjuntivite	<u>Na comunidade</u> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <u>No recém-nascido</u> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Bacilos Gram negativos <u>No doente imunodeprimido</u> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Queratite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus spp</i>

Colheita

Deve ser feita em zaragatoa em meio transporte (no recém-nascido, zaragatoa com carvão) e antes da aplicação de antibióticos, colírios ou outros produtos.

É colhido o exsudado da mucosa ocular com zaragatoa na parte interna da pálpebra inferior. As colheitas devem ser distintas para cada olho, em zaragatoas separadas e devidamente identificadas.

Exame microscópico

No caso de infecções de evolução muito rápida como a conjuntivite hiperaguda, queratite e endoftalmite é fundamental o exame microscópico. A presença de leucócitos e bactérias intracelulares também apontam uma infecção por microrganismos citados na tabela 9. No entanto este exame apresenta uma baixa sensibilidade.

Exame cultural

Semear os meios de Mck, CNA, COS e BHI e colocar em atmosfera de aerobiose por 48h. No recém-nascido semear também o meio de VCA e incubar durante 72h em atmosfera de CO₂.

Interpretação

Os microrganismos isolados que cresçam numa cultura pura e que coincidam com a morfologia observada na coloração de Gram devem ser valorizados. É sempre importante a presença de agentes patogénicos como o *Staphylococcus aureus* ou *Neisseria gonorrhoeae* em recém-nascidos. Em amostras nas quais se isola apenas a flora microbiana da pálpebra deve ser dada essa indicação. Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.(9,27)

Exsudados auriculares

A infeção auricular ocorre ao nível do ouvido externo ou do ouvido médio. As infeções do ouvido médio são normalmente causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, e o diagnóstico é feito a partir de meringocentese, que consiste na aspiração de líquidos do ouvido médio. A otite média é uma infeção muito frequente em bebés e crianças. As infeções do ouvido externo são tipicamente causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*.

Colheita

Otite externa: Colher o exsudado ao nível do canal auditivo externo com a zaragatoa.

Otite média: Colheita realizada por um Otorrinolaringologista através de uma meringocentese, ou por aspiração se houver supuração.

Exame cultural

Semear os meios de Mck, CNA, COS e BHI e colocar em atmosfera de aerobiose por 48h

Interpretação

Os microrganismos após serem valorizados seguem para identificação e TSA.

Teste de Sensibilidade aos Antibióticos - TSA

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos está indicado no estudo de um microrganismo que participe em qualquer processo infeccioso que necessite de terapêutica antimicrobiana. O TSA também está indicado em todos os microrganismos isolados de amostras normalmente estéreis e é essencial quando o microrganismo pertence a uma espécie habitualmente resistente aos agentes microbianos mais frequentes.

Também é útil nos casos em que o doente é alérgico ao antimicrobiano mais indicado, necessitando assim a escolha de outros antimicrobianos.

O TSA é essencial em estudos epidemiológicos de resistência.

Deve ser utilizado como parte da estratégia para evitar o uso indiscriminado de determinados antibióticos de espectro muito largo ou favorecer o uso de outros com adequado perfil de atividade e impacto ecológico.(9,28)

Vitek 2

O TSA realizado utilizando as cartas do VITEK®2 consiste numa combinação de fármacos para determinados microrganismos em que o resultado é dado como sensível, resistente ou intermédio ao antibiótico. Após a incubação à temperatura adequada, observa-se se ocorreu crescimento bacteriano, e, deste modo, avalia-se a concentração mínima inibitória (CMI) do antibiótico. A CMI é a menor concentração à qual um antibiótico em solução é capaz de impedir o crescimento de um microrganismo. São seguidas as normas EUCAST para interpretação da sensibilidade ou resistência dos microrganismos aos antimicrobianos.

As cartas de TSA utilizadas estão indicadas na tabela 10.

Tabela 10 – Cartas de TSA

Cartas	Agente Isolado	Antibióticos Testados	
AST-N355	Bactérias Gram Negativas	Amoxicilina/Ácido Clavulânico Ertapenem Ampicilina ESBL (β -latamases de largo espectro) Cefalotina Gentamicina Meropenem Piperacilina/Tazobactam	Cefotaxima Nitrofurantoína Ceftazidima Tobramicina Cefuroxima Trimetoprim/Sulfametoxazol Ciprofloxacina Amicacina
AST-P586	<i>Enterococcus</i>	Ampicilina Moxifloxacina Ampicilina/Sulbactam Nitrofurantoína Benzilpenicilina Quinopristina/Dalfopristina Cefuroxima Estreptomina alta conc. Clidamicina Teicoplanina	Eritromicina Tetraciclina Gentamicina alta conc. Tigeciclina Imipenem Trimetoprim/Sulfametoxazol Levofloxacina Vacomicina Linezolide
AST-P648	<i>Staphylococcus</i>	Benzilpenicilina Clindamicina Daptomicina Eritromicina Fosfomicina Ácido fusídico Gentamicina Vancomicina Levofloxacina	Linezolide Moxifloxacina Mupirocina Nitrofurantoína Oxacilina Rifampicina Teicoplanina Tetraciclina Tigeciclina Trimetoprim/Sulfametoxazol
AST-ST03	<i>Streptococcus</i>	Ampicilina Benzilpenicilina Cefotaxima Ceftriaxone Clidamicina	Eritromicina Tetraciclina Trimetoprim/Sulfametoxazol Levofloxacina Vacomicina Linezolide
AST-N373	<i>Pseudomonas e Acinetobacter</i>	Cefepima Ceftazidima Ciprofloxacina Colistina Gentamicina Imipenem Meropenem Amicacina Aztroozam	Piperacilina Piperacilina/Tazobactam Rifampicina Ticarclina Ticarclina/Ácido Clavulânico Tobramicina Trimetoprim/Sulfametoxazol Minociclina Pefloxacina

Para cada microrganismo isolado é testado um painel alargado de antibióticos disponíveis nas cartas do equipamento automático, mas o relatório final entregue ao clínico inclui apenas alguns antibióticos, que são selecionados de acordo com as regras estabelecidas pelo laboratório, nomeadamente local infeção, idade, género, entre outros.

Devem ser usados preferencialmente os antibióticos que tenham uma melhor penetração dos tecidos do local de infeção ou que atinjam altas concentrações nesse local.

Na tabela 11 é possível observar o uso de antibióticos durante a gravidez.(9,28)

Tabela 11– Antibióticos na gravidez

Antibiótico	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre
Penicilinas	Sim	Sim	Sim
Cefalosporinas	Sim	Sim	Sim
Fosfomicina	Sim	Sim	Sim
Macrólidos	Sim	Sim	Sim
Aminoglicosidos	Não	Não	Não
Trimetoprim	Não	Não	Não
Quinolonas	Não	Não	Não
Nitrofuranos	Não	Sim	Não

Deve ser evitado o uso de determinados antibióticos na pediatria. Os aminoglicosidos devido a oto e nefrotoxicidade, devem ser evitados em recém-nascidos e prematuros. As tetraciclina podem provocar descoloração dos dentes em crianças, a nitrofurantoína pode originar alterações hematológicas não deve ser usado no primeiro mês de vida, as quinolonas podem causar lesões ao nível da cartilagem óssea e o cotrimxazol, por provocar icterícia neonatal deve ser evitado em recém-nascidos com menos de 6 semanas. (9,28)

Sistema ATB

As galerias de ATB são utilizadas para a realização do antibiograma de *Haemophilus* sp. e *Moraxella* sp. em meio semi-sólido. Após 18 a 24h de incubação, a leitura de crescimento é feita no sistema Mini API®.

Os antimicrobianos testados são: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, tetraciclina, ofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, cloranfenicol, cefuroxima, cefotaxima e são reportados segundo as recomendações da EUCAST.

E-test

O E-test permite determinar quantitativamente a sensibilidade de determinado antimicrobiano para um microrganismo. Consiste na aplicação de uma tira impregnada com um gradiente de antibiótico, tornando possível determinar a CMI pela linha de intersecção do crescimento bacteriano com a respectiva tira.

Neste teste, a CMI é lida diretamente na escala da tira, no ponto onde a elipse de inibição do crescimento intercepta a tira.

No laboratório são normalmente realizados E-testes de benzilpenicilina para *S.viridans* em hemoculturas e de meropenem, vancomicina e tigeciclina para confirmação de resistências.



Figura 13 – E-test

Exame Parasitológico de Fezes

Colheita

Devem ser colhidas para um recipiente estéril. Quando são pedidas 3 amostras, colher em dias consecutivos.

Exame Microscópico

É usado um Kit para a concentração de parasitas. Esta técnica aumenta a probabilidade de observação do número de cistos, trofozoítos, ovos ou larvas na preparação, eliminando a maior parte do material orgânico fecal (resíduos) e apresentando o organismo inalterado, de forma a serem facilmente identificados.

Seguidamente é feito o exame microscópico direto de modo a serem observadas estruturas de parasitas.

Exame Micológico – Dermatófitos

Entre as principais amostras recebidas encontram-se raspados de unhas, pele, cabelo, entre outros produtos.

O exame direto a fresco é feito entre lâmina e lamela, para a deteção da presença de fungos, após uma preparação com KOH a 20%.

As amostras são semeadas também em meio de cultura de Sabouraud. A temperatura de incubação deve ser entre 25-30°C por 30 dias.

Nos meios em que ocorre crescimento é realizada a sua identificação e TSA.

Micobactérias - BK

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto por várias espécies, incluindo o *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. orygis* e *M. mungi*.

O *M. tuberculosis* é o principal responsável pela tuberculose e encontra-se espalhado por todo o mundo.

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo aeróbico estrito e não móvel que não forma esporos e não possui flagelos nem cápsulas e é álcool-ácido resistente. Uma das características do bacilo é a sua parede celular com uma grande concentração de lípidos. A parede celular é formada por cadeias longas de ácidos gordos, chamados ácidos micólicos ligados a arabinogalactanos, que estão associados ao peptidoglicano. Adicionalmente, a parede celular contém vários lipoglicanos incluindo o lipoarabidomano (LAM), o seu precursor lipomano (LM), e o manosido fosfatidil-mioinositol (PIM). As características estruturais da parede tornam o bacilo resistente a desinfetantes, detergentes, antibióticos antibacterianos habituais e resposta imunitária do hospedeiro.

A doença é transmitida por contacto direto através da inalação de aerossóis infecciosos. Os bacilos presentes nestes aerossóis são fagocitados por macrófagos alveolares, podendo ser eliminados ou, em caso de replicação rápida, multiplicar-se dentro destes dando origem a ciclos sucessivos de infeção/replicação. A infeção primária é pulmonar. A tuberculose atinge habitualmente o pulmão embora sejam

possíveis muitas outras localizações. Existe também uma forma disseminada, a tuberculose miliar, uma condição frequente em imunodeprimidos.

Na Europa Ocidental, Portugal é o único país considerado de incidência intermédia, com mais de 20,0 casos por 100 000 habitantes. No entanto, em 2012 registou-se uma redução de 6,1% em relação a 2011, na sequência da diminuição observada desde 2002. Apesar disto têm aparecido ocasionalmente casos de multirresistência que são um verdadeiro desafio para os programas de controlo da tuberculose. Isto deve-se ao uso indevido dos anti bacilares (fraca adesão à terapêutica, podendo induzir mecanismos de resistência). (29)

Numa infeção pulmonar, o diagnóstico microbiológico deve ser apoiado por sinais clínicos evidentes: evidência radiológica de infiltrados, doença nodular ou doença cavitária e por mais do que um isolamento da micobactéria no mesmo doente.

Detecção de Micobactérias

Colheita

Nas amostras respiratórias, a expetoração simples e espontânea é a amostra mais frequente. A melhor colheita é de manhã e em jejum pois existe uma maior concentração bacilar. Devem ser colhidas três amostras em dias consecutivos.

Devem ser enviados pelo menos 5 ml de amostras obtidas por técnicas broncoscópicas, como o lavado bronco-alveolar.

Quando não é possível obter expetoração (e como alternativa às técnicas broncoscópicas) o suco gástrico pode ser uma hipótese, principalmente em crianças. Outras amostras são possíveis para o exame de micobactérias, como sangue, líquidos orgânicos estéreis (LCR, articular, peritoneal, pleural), biópsias e urina.

Exame Microscópico

Apesar dos avanços tecnológicos, o diagnóstico precoce de micobactérias continua a ser o exame microscópico. Atualmente é o processo mais simples barato e rápido de obter uma orientação de diagnóstico. É também útil para monitorizar a resposta ao tratamento.

A microscopia tem uma sensibilidade inferior à cultura. Existem diversos fatores que condicionam a sensibilidade, como o tipo de amostra (preferencialmente as do

aparelho respiratório), a quantidade de amostra e a concentração de micobactérias na amostra.

A coloração de Kinyoun é utilizada para diferenciar os dois grupos de bactérias: álcool-ácido resistentes (gêneros *Mycobacterium* spp e *Nocardia* spp) e não álcool-ácido resistentes. As micobactérias apresentam-se como bacilos delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos, corados em vermelho (pela ação da fucsina básica) sobre um fundo azul.(30)

Na figura 14 é possível observar um exemplo de amostras com BAAR.

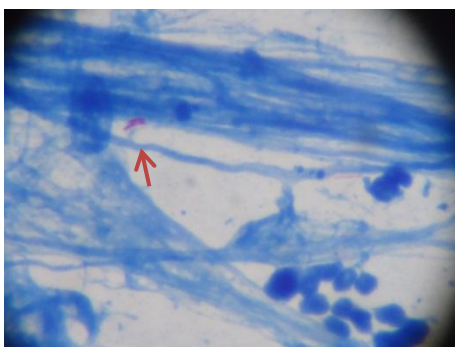


Figura 14 – Amostra respiratória com presença de BAAR

Exame Cultural

A cultura permanece como o “gold-standard” para a detecção e realização de testes de sensibilidade a fármacos.

O isolamento das micobactérias de amostras clínicas continua a ser fundamental para o diagnóstico de infecções por estes microrganismos. O exame cultural é mais sensível que o exame microscópico. Além disso permite a identificação da espécie, os estudos de sensibilidade ou resistência aos anti bacilares, assim como a monitorização da evolução da resposta à terapêutica.

Os meios de cultura utilizados contêm também diversos antibióticos que previnem o crescimento de outra flora bacteriana ou fúngica. Sendo muito resistente à ação dos agentes físicos e químicos as micobactérias são também muito exigentes nos aspetos nutricionais, necessitando assim de meios enriquecidos. Atualmente utilizam-se meios de cultura sólidos e líquidos.

No processamento da amostra antes da sementeira pode ser necessária uma descontaminação da amostra, por exemplo em expetorações ou uma concentração da amostra, como acontece em líquidos orgânicos estéreis.

A cultura tradicional em meio de Lowenstein-Jensen pode demorar até 6 semanas. Na sua generalidade as micobactérias têm um bom crescimento neste meio, que têm na sua constituição o verde de malaquite, com a finalidade de inibir o crescimento de outros microrganismos. As culturas de *M. tuberculosis* possuem uma morfologia típica, muito característica, sendo as colónias não pigmentadas, rugosas e em forma de couve-flor. (1)

A cultura em meio líquido utiliza um sistema automatizado, VersaTREK, com monitorização contínua para a deteção do crescimento. Este sistema consiste numa garrafa com um meio de cultura com um sensor onde é inoculada a amostra anteriormente descontaminada. A tecnologia do VersaTREK baseia-se na deteção das alterações de pressão dentro da garrafa estanque. Deste modo monitorizam-se as alterações quer da produção de gás, quer do consumo de oxigénio, devidos ao crescimento bacteriano. As garrafas são incubadas durante 42 dias.

TSA - *Mycobacterium tuberculosis*

Nas amostras positivas para o *Mycobacterium tuberculosis complex* procede-se à realização do seu antibiograma.

É utilizado o Sistema automático, VersaTREK, para a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos. São utilizados os antibióticos isoniazida, rifampicina, streptomina, etambutol e pirazinamida, sendo usada uma garrafa por antibiótico.

No teste de sensibilidade a amostra é considerada sensível se houver crescimento na garrafa de controlo e não houver crescimento na garrafa que tem o antibiótico até 3 dias após ter positivado a garrafa de controlo.

A amostra é considerada resistente caso haja crescimento na garrafa de antibiótico neste espaço de 3 dias.

Controlo de Qualidade

Controlo de Qualidade Interno – ATCC

Permite avaliar a qualidade dos resultados obtidos. Desta forma, o laboratório garante que os resultados obtidos possam ser utilizados com confiança no diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica

São utilizadas duas estirpes padrão, *Staphylococcus aureus* ATCC (*American Type Culture Collection*), e *Escherichia coli* ATCC, para testar as cartas de identificação e de antibiograma do VITEK® 2. E para o Vitek Ms é utilizada a *Enterococcus* ATCC.

Controlo de Qualidade Externo - NEQAS

Consiste na avaliação do desempenho do laboratório através da análise dos resultados obtidos nos exames de amostras de controlo realizados nas condições habituais de funcionamento. Assim, são enviados ao laboratório produtos que são tratados como as amostras diárias. Os resultados obtidos são depois enviados ao organismo exterior, NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service), que fornece os produtos, e envia avaliação dos resultados.

Conclusão

O Laboratório de microbiologia desempenha um papel fundamental na identificação do agente etiológico (bactéria, fungo ou parasita) de uma infecção e determinação da sensibilidade dos antimicrobianos testados contra os microrganismos identificados.

É crucial uma estreita colaboração entre o clínico e o laboratório com vista na obtenção de um resultado o mais correto possível. O diagnóstico microbiológico é complexo havendo necessidade de complementar informação, não só através do suporte multidisciplinar (envolvimento de várias especialidades) mas também com a intervenção de vários métodos de diagnóstico, através das várias valências laboratoriais, nomeadamente Imunologia e Biologia molecular.

Ao acabar a valência de microbiologia creio ter realizado os objetivos do Mestrado de Análises Clínicas para esta valência, como seja apreender os métodos usados na execução de análises, apurar os procedimentos de trabalho para cada equipamento utilizado e colaborar no seu controlo.

Para a correta interpretação dos resultados obtidos foi necessário aprender e aprofundar novas matérias a par da prática laboratorial, ficando assim ciente da ligação dos conhecimentos teóricos à vivência atual de um laboratório de microbiologia. E correlacionar com dados clínicos e epidemiologia hospitalar.

Bibliografia

1. Murray Patrick R, Rosenthal Ken S PMA. Medical Microbiology. 7th ed. Elsevier, editor. 2013.
2. Molinos Abós S, Giménez Pérez M. Características clínico-microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus schleiferi* y otros estafilococos coagulasa-negativos. Control Calid SEIMC. 1988;1–4.
3. Montes M, María García-Arenzana J. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007;25:14–20.
4. Levinson WE. Review of Medical microbiology and Immunology. 2012.
5. Snyder MAWLM. Wallach's Interpretation of Diagnostic Tests. 9th ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health; 2011.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease. *Epidemiol Prev Vaccine-Preventable Dis*. 2015;279–96.
7. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação. Introdução da vacina conjugada de 13 valências contra infeções por *Streptococcus pneumoniae* (Pn13). Norma da Direção-Geral da Saúde. 2015;2015(Quadro I):1–8.
8. Tunkel AR, Sepkowitz KA. Infections caused by viridans streptococci in patients with neutropenia. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2002;34(11):1524–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015700>
9. Fonseca AB, Sebastião C, Martins FJC, Ribeiro MDGVCR, Calheiros I, Lito LM, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. INSA [Internet]. 2004;193. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008546.pdf>
10. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2007;103(6):2046–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x>
11. Standards Unit Microbiology Services. UK Standards for Microbiology Investigations-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality- and-consistency-in-clinical-laboratories. Available from: <https://www.gov.uk/uk>
12. Andreu A. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. Vol. 23, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005. 15–21 p.
13. Health Protection Agency. UK Standards for Microbiology Investigations

- Identification of Neisseria species. 2013;ID23:1–22.
14. Aznar J, Blanco M, Lepe J, Otero L, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. [Internet]. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2007.
 15. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae 2014. MMWR Recomm Reports [Internet]. 2014;63(2):1-19 19p.
 16. Tamayo J. Evaluation of Granada Agar Plate for Detection of Streptococcus agalactiae in Urine Specimens from Pregnant Women Evaluation of Granada Agar Plate for Detection of Streptococcus agalactiae in Urine Specimens from Pregnant Women. 2004;42(8):1–4.
 17. Acosta Boga B, Codina Grau M, Matas Andreu L, Meseguer Peinado M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycolpasma spp. y Ureaplasma spp. 2011. 40 p.
 18. Thurman SE, Allen PJ. Primary Care Approaches. 2008;34(5).
 19. Cercenado E CR et all. Diagnostico microbiologico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. 2Da Ed. 2007;
 20. Rodriguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por Clostridium difficile. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2013;31(4):254–63.
 21. Cercenado Emilia CR. Procedimientos en Microbiología Clínica. SeimcOrg [Internet]. 2008;40. Available from:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
 22. Seimc. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con catéteres (IRC). 2004;
 23. Seimc. Infecciones Snc. 2010.
 24. Simões MJ, Fernandes T, Gonçalves P, Bettencourt C, Furtado C. Doença meningocócica do serogrupo B (MenB) em Portugal : uma reflexão sobre estratégias de imunização. 2014;10:28–32.
 25. Furtado C, Brum L, Queirós L, Gomes M, Simões MJ. Doença Meningocócica em Portugal 2000-2006. 2007;1–47. Available from:
<https://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i009225.pdf>

26. Portugal - Direcção-Geral da Saúde. Vacinas do PNV. :1–46.
27. Etxebarria J, López Cerero L, Mensa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. 2008;31.
28. Lago J. Atualidades do Antibiograma Hospital das Forças Armadas Serviço de Patologia Clínica Laboratório de Microbiologia.
29. Macedo R, Silva AS, Rodrigues IJ, Rodrigues I, Furtado C, Simões MJ. Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal: relatório 2012. 2013. 7–48 p.
30. Moreno J, Martín J, Gutiérrez J. Micobacterias. 2005.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



PARTE II

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Importância do diagnóstico laboratorial

Filipa Isabel Sousa Costa Guedes Vaz

Relatório orientado pela Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva

Mestrado Análises Clínicas 2020

Resumo

Leucemias são doenças hemato-oncológicas onde há clones monoclonais que resultam de mutações adquiridas em células hematopoiéticas progenitoras em diferentes estádios de diferenciação mieloide ou linfoide, levando à sua proliferação anormal. Não resultam de alterações do ciclo celular normal. Surgem como consequência de translocações cromossômicas que codificam fatores de transcrição.

As leucemias linfoblásticas agudas podem ser da linhagem linfoide B e T e ocorrem principalmente em crianças com menos de 10 anos. No desenvolvimento da LLA-T é importante a fase de passagem pelo timo, onde os linfócitos se tornam imunocompetentes.

Não se conhecem os mecanismos exatos da etiopatogênese da LLA (B e T), exceto a pequena minoria de transmissão familiar e as LLA associadas a doenças como a síndrome de Down ou a síndrome de Klinefelter, entre outras.

O perfil genômico transformou a compreensão da LLA, pondo em evidência constelações de rearranjos estruturais, alterações de cópias do DNA e mutações.

As alterações cromossômicas estão diretamente relacionadas com a expressão de oncogenes, sendo frequentes as translocações de genes que ficam sob a influência de um promotor.

O diagnóstico incide numa abordagem laboratorial em diversas áreas, desde o hemograma e visualização morfológica de blastos, ao mielograma, análise citogenética, imunofenotipagem do aspirado medular, assim como técnicas de biologia molecular e de hibridização fluorescente *in situ* (FISH; *fluorescence in situ hybridization*).

Dado o rápido avanço na tecnologia disponível para a identificação das leucemias, foi necessário rever as várias classificações do século XX. O objetivo é caracterizá-las em subtipos, permitindo a estratificação do risco. A classificação atual (WHO 2016) conduz à correta aplicação dos vários esquemas terapêuticos, consoante se está em presença de menor ou maior risco e, assim, melhor ou pior prognóstico. O aperfeiçoamento dos algoritmos conduz à quase personalização da terapêutica, adaptável conforme o subtipo, a evolução e o aparecimento de ações acessórias nocivas.

Palavras-chave: Leucemia Linfoblástica Aguda; Hemato-oncologia; Diagnóstico Laboratorial; Citogenética; Imunofenotipagem;

Abstract

Leukemias are hematological diseases resulting from acquired mutations in various stages of myeloid or lymphoid leading to monoclonal abnormal cell proliferation. In ALL there are no alterations of normal cell-cycle regulation. They arise as a consequence of chromosomal translocations encoding transcription factors.

ALL might belong to B or T lineage and occur mainly in children less than 10 years. In ALL-T the passage through the thymus, where the lymphocytes become immunocompetents, is crucial.

The exact mechanisms of ALL pathogenesis are not known, except the minority belonging to familiar transmission and the ALL associated with diseases as Down syndrome or Klinefelter syndrome, among others.

Genomic profiling altered the understanding of ALL, evidencing the collections of structural rearrangements, changes of the DNA copies and sequential mutations.

Chromosomal alterations are directly related to the expression of oncogenes and a promoter frequently influences gene translocations

Diagnosis focuses on a laboratory approach comprising several fields e.g. hemogram and morphologic visualizations of blast cells, myelogram, cytogenetic analyses, marrow aspirate immunophenotyping as well as biocell techniques and FISH.

Given the last advances in available technology able to identify the leukemias, it has been necessary to revise the various classifications belonging to XXth century. The goal is defining leukemias in subtypes, thus allowing risk stratification. The now accepted classification (WHO 2016) leads to a correct application of the available therapeutic schemes, whether facing a major or minor risk situation and, so, a better or worse prognosis. The improvement of algorithms leads to the almost perfect personalization of therapeutics, adaptable according to circumstance, subtype, evolution and the appearance of noxious accessory actions.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia; Hemato-oncology; Laboratory Diagnosis; Cytogenetic; immunophenotyping;

Índice – Parte II

Lista de Figuras	79
Lista de Tabelas.....	80
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	81
1. Introdução	82
2. Epidemiologia	82
3. Etiologia e Patogénese	83
4. Classificação	90
4.1 Classificação FAB.....	90
4.2 Classificação OMS.....	91
5. Manifestações Clínicas.....	92
6. Diagnóstico	94
6.1 Anamnese e exame objetivo.....	94
6.2 Diagnóstico laboratorial	94
6.2.1 Hematologia e Observação morfológica em lâmina: sangue periférico/sangue medular.....	94
Parâmetros Bioquímicos	97
6.2.3 Avaliação do SNC.....	98
6.2.4 Citoquímica	98
6.2.5 Imunofenotipagem por Citometria de fluxo	99
6.3. Citogenética.....	109
6.3.1 Citogenética Convencional.....	109
6.3.2 FISH – Citogenética Molecular.....	115
6.4 Imagiologia	120
6.5 Diagnóstico diferencial	120
7. Tratamento	122
7.1 Terapêutica de Suporte.....	122
7.1.1 Complicações Metabólicas.....	122
7.1.2 Hiperleucocitose.....	123
7.1.3 Controlo de Infecção.....	123
7.2 Quimioterapia.....	123
7.2.1 Indução.....	123
7.2.2 Tratamento e profilaxia do SNC	124
7.2.3 Consolidação	124

7.2.4 Manutenção	124
7.2.5 Transplante hematopoiético	125
8. Prognóstico.....	125
9. Conclusão e Perspetivas	127
10. Bibliografia	128

Lista de Figuras

Figura 1 - Alterações cromossómicas presentes na LLA	89
Figura 2 – Lâmina de Sangue periférico, LLA – L1	90
Figura 3 - Lâmina de Sangue periférico, LLA – L2	91
Figura 4 - Lâmina de Sangue periférico, LLA – L3.....	91
Figura 5 – LLA, esfregaço de sangue periférico.....	96
Figura 6 - Linfoblasto da linhagem T num esfregaço de sangue periférico	96
Figura 7 - Esquema do Sistema de Fluidos do Citómetro de Fluxo.....	100
Figura 8 - Esquema da Citometria de Fluxo.....	102
Figura 9 - Leucemia Linfoblástica Aguda-B.....	108
Figura 10 - Leucemia Linfoblástica Aguda -T.	108
Figura 11 - Cariograma normal do sexo feminino XX	110
Figura 12 - Cariograma normal do sexo masculino XY	110
Figura 13 - Cromossomas e numeração das respetivas banda	110
Figura 14 - Cariograma de doente <i>BCR-ABL</i> positivo	115
Figura 15 - FISH num doente <i>BCR-ABL</i> positivo.....	118

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais alterações genéticas associadas à LLA.....	86
Tabela 2 - Classificação WHO para a LLA	92
Tabela 3- Manifestações Clínicas da LLA em crianças e em adultos	94
Tabela 4 - Alterações Hematológicas na LLA	97
Tabela 5 - Painel de Fluorocromos definidos pelo consórcio EuroFlow para Leucemias Agudas	105
Tabela 6 - Painel de consenso para a LLA pediátrica do grupo AIEOP-BFM	106
Tabela 7- Imunofenotipo LLA-B	107
Tabela 8 - Imunofenotipo LLA-T	107
Tabela 9 - Principais Alterações Citogenéticas e seu prognóstico na LLA	119
Tabela 10 - Resumo do procedimento clínico para o diagnóstico de LLA.....	122
Tabela 11 - Grupos de risco na LLA.....	126

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

CMV – Citomegalovírus

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DRM – Doença residual mínima

FAB – Franceses-Americanos-Britânicos

FISH – Hibridização fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*)

HAV - Vírus da hepatite A

Hb - Hemoglobina

HBV – Vírus da hepatite B (*Hepatitis B Virus*)

HCV - Vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDH – Desidrogenase láctica (*Lactate dehydrogenase*)

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LMA – Leucemia mieloide aguda

Mb – Mega pares de bases

MO – Medula óssea

MTX – Metotrexato

OMS (WHO) – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

PTH – Hormona paratiroideia (*Parathyroid hormone*)

PTI – Púrpura trombocitopénica idiopática

SNC – Sistema nervoso central

SSC – Tampão salino de cloreto de sódio e citrato de sódio (*Saline-Sodium Citrate*)

1. Introdução

As leucemias linfoblásticas agudas (LLA) são um grupo heterogêneo de doenças hemato-oncológicas em que ocorre infiltração da medula óssea, do sangue e de outros órgãos por células neoplásicas hematopoiéticas, proliferações clonais de células imaturas da linhagem linfoide B ou T. Estes clones podem surgir devido a alterações genéticas e moleculares que ocorrem em diferentes fases da maturação dos linfócitos. Uma minoria tem causalidade transmissível, sendo a maioria devida a fatores ambientais.

São mais frequentes em crianças, onde existe marcadamente um melhor prognóstico do que em adultos.

As principais manifestações clínicas são astenia, febre, anemia, dores ósseas nas crianças, hepatoesplenomegalia e linfadenopatias. Além destas, as manifestações do SNC, quando presentes, significam um mau prognóstico.

O diagnóstico inclui hemograma, mielograma, imunofenotipagem e análise citogenética. O tratamento e prognóstico dependem do diagnóstico.

O prognóstico baseia-se essencialmente na caracterização genética dos blastos e na idade do doente, sendo que os avanços atrás referidos levam à otimização dos resultados terapêuticos e a um melhor prognóstico.

A LLA constitui uma emergência clínica e deverá ser diagnosticada e tratada o mais depressa possível.

A necessidade de um diagnóstico preciso é essencial para o sucesso da terapia.

2. Epidemiologia

A leucemia linfoblástica aguda é principalmente uma doença pediátrica, em que 75% dos casos ocorrem em crianças com menos de 10 anos de idade, sendo que o pico se estabelece entre os dois e os cinco anos. É mais frequente no sexo masculino, cerca de quatro vezes superior no caso da LLA-T, exceto no primeiro ano de vida, em que é mais frequente no sexo feminino. Existe, ainda, um segundo pico de incidência na sexta década de vida. (1–4)

Em termos de classificação, a maioria das LLA são da linhagem B, cerca de 85%, sendo as da linhagem T cerca de 15%.(5)

A incidência da LLA varia consoante a área geográfica. Enquanto que nos países menos desenvolvidos, como no norte de África e Médio Oriente, predominam as leucemias da linhagem T, nos países industrializados são mais frequentes as leucemias de linhagem B. Provavelmente isso resulta de uma maior exposição a substâncias carcinogêneas. É também possível observar uma maior incidência em doentes caucasianos. (2-4)

3. Etiologia e Patogénese

Os mecanismos exatos que levam ao desenvolvimento da LLA ainda são desconhecidos. Existe uma transformação maligna de uma célula mãe linfóide imatura que tem a capacidade de se multiplicar e formar um clone de células-mãe idênticas, as quais apresentam um bloqueio num determinado ponto da sua diferenciação. O processo parece iniciar-se ao nível da medula óssea onde ocorrem alterações genéticas e moleculares que modificam as funções celulares. Essas alterações têm implicações, nomeadamente, na capacidade de renovação, no controlo da proliferação, no bloqueio da diferenciação e no aumento da resistência a sinais para a apoptose.(3)

Em 5% dos casos a LLA relaciona-se com determinadas alterações genéticas hereditárias como a síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, anemia de Fanconi, neurofibromatose, síndrome de Shwachman, Ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Li-Fraumeni e síndromes genéticas que afetam a estabilidade de autorreparação do DNA, como a síndrome de quebras de Nijmegen. (4,6)

Mas a maioria dos casos de LLA é de causa adquirida, *in utero* ou pós-natal. Existem alguns fatores que têm sido implicados no aparecimento destas alterações. Fatores ambientais como exposição a radiações, fatores ocupacionais como uso de pesticidas, tintas de cabelo e solventes como o benzeno, trabalho agrícola, de soldadura, indústria da madeira. São ainda de considerar quimioterapia e radioterapia prévias e, também, alguns medicamentos como a fenitoína. O tabagismo antes e/ou durante a gravidez é também considerado um fator de risco, assim como uma dieta rica em nitratos. Sabe-se que os agentes infecciosos, sobretudo virais, são causa frequente de doenças neoplásicas; como a maioria das LLA aparece no período de vida no qual o

sistema imune se está a desenvolver, poderia ser mais suscetível ao efeito oncogénico de determinados vírus. No entanto, o vírus Epstein-Barr (EBV) e os vírus da imunodeficiência humana tipos I e II (HTLV I e II) são, até ao momento, os únicos possuindo clara associação com leucemias no adulto.(2,3,7,8)

A LLA é mais frequente nos países desenvolvidos e tem sido sugerido que tal se deva ao estilo de vida, como maior incidência na obesidade e tabagismo e diferença no desenvolvimento de imunidade que ocorre nesta população.

É atualmente aceite, que mais de $\frac{3}{4}$ de todos os casos de LLA apresentam as mesmas alterações citogenéticas e moleculares.(4)

A causa genética específica, particularmente implicada na génese de um dado tumor hematológico, será responsável por uma alteração no equilíbrio, proliferação celular ou apoptose. Esta alteração genética é sempre clonal e adquirida, sendo limitada às células malignas do organismo. As alterações que conduzem ao processo neoplásico podem ocorrer em quatro diferentes grupos de genes: genes de reparação do DNA, genes que interferem com a apoptose, genes que interferem com o Ciclo Celular e genes que controlam a proliferação celular (Proto-Oncogenes – genes que estimulam a proliferação celular – ou Genes Supressores Tumorais – genes que inibem a proliferação celular).

Algumas alterações genéticas estão identificadas e as suas consequências continuam a revelar complexos mecanismos de oncogénese. Estas alterações podem ser essencialmente estruturais ou numéricas.

Anomalias Numéricas

As anomalias numéricas referem-se a alterações cromossómicas que resultam da variação do número de cromossomas e há a considerar duas situações:

- Hiperdiploidia: mais de 50 cromossomas, ocorre em aproximadamente $\frac{1}{3}$ dos casos pediátricos e em 6% dos casos em adultos. Alteração associada a um melhor prognóstico.
- Hipodiploidia: menos de 45 cromossomas, associada a um pior prognóstico. (1)

Anomalias Estruturais

As anomalias estruturais são originadas por quebras cromossômicas com posterior perda, ganho ou rearranjo de segmentos cromossômicos. Estas podem incluir duplicações, isocromossomas, cromossomas marcadores, deleções, cromossomas em anel, translocações e inversões. Podem originar proteínas de fusão com potencial oncogénico ou que levam à anormal expressão de oncogenes ou sub-expressão de genes supressores tumorais.

Estas alterações levam a uma apresentação clínica específica com o seu próprio prognóstico.(1)

Na Tabela 1 encontram-se as principais alterações genéticas associadas à LLA.(6)

Tabela 12 - Principais alterações genéticas associadas à LLA [adaptado de (4)]

Citogenética	Gene	Linhagem	Frequência nos adultos	Frequência nas crianças
Hiperdiploidia (> 50 cromossomas)	-	B	7%	25%
Hipodiploidia (<44 cromossomas)	-	B	2%	1%
t(9;22)(q34;q11): cromossoma Filadelfia (Ph)	<i>BCR-ABL1</i>	B	25%	2-4%
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>	B	2%	22%
t(v;11q23) exemplo: t(4;11), t(9;11), t(11;19)	<i>KMT2A (MLL)</i>	B	10%	8%
t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)</i>	B	3%	6%
t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3-IGH</i>	B	<1%	<1%
t(8;14), t(2;8), t(8;22)	<i>MYC</i>	B	4%	2%
t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL</i>	T	12%	7%
t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11 (TLX1)</i>	T	8%	1%
t(5;14)(q35;q32)	<i>HOX11L2</i>	T	1%	3%
t(11;14)(q11) Exemplo: (p13;q11), (p15;q11)	<i>TCRα e TCRδ</i>	B	20-25%	10-20%
BCR-ABL1-like	Várias mutações Ex: genes: <i>IKZF1, RAS, JAK/STAT5, ABL1, EPOR, JAK2, PDGFRβ, EBF1, FLT2, IL7R, SH2B3</i>	B	10-30%	15%

Há um certo número de rearranjos recorrentes comuns na LLA-B, sendo alterações críticas na gênese das leucemias estes rearranjos perturbam, habitualmente, os genes que codificam reguladores da hematopoiese, supressores tumorais, oncogenes,

ou tirosina cinases. No entanto, quase invariavelmente, são necessárias alterações adicionais para que se estabeleça o fenótipo leucêmico completo.(9)

Os genes mais afetados são os que participam na diferenciação de linfócitos (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* e *LMO2*), supressores tumorais e reguladores do ciclo celular (*DKN2A/CDKN2B*, *PTEN* e *RBI*), reguladores da transcrição e co-ativadores (*TBL1XR1*, *ETV6* e *ERG*), entre outros. (10,11)

Além disso, há relatos sobre diferenças na frequência destas alterações entre casos portadores de translocações específicas, por exemplo na LLA *BCR-ABL* e *TEL-AML1* positivas existem mais alterações adicionais que nas LLA com rearranjos no gene *MLL*. Entretanto, na LLA hipodiplóide são frequentemente detetadas mutações no gene *IKAROS* (*IKZF1*), *IKZF2* e em genes incluídos na via de sinalização RAS. O subtipo de LLA sem anomalias citogenéticas é caracterizado por mutações nos fatores de transcrição ETS. (10,11).

A t(12;21)(p12;q21), a alteração mais comum na infância que leva ao gene de fusão *ETV6/RUNX1(TEL/AML1)* é, provavelmente, uma lesão de origem pré-natal. Devido a esta mutação é gerada uma proteína de fusão, a TEL-AML1 que origina uma alteração no desenvolvimento hematopoiético. (2,12)

O gene *MLL* está mais frequentemente associado a algumas leucemias mielodisplásicas, mas está também envolvido na mutação t(4;11)(q21;q23), alteração encontrada em 80% das LLA dos recém-nascidos. A possibilidade da proteína *MLL* regular a expressão de vários genes da família *HOX* sugere que tem um papel importante tanto na hematopoiese como na leucogénese. (2,12)

Mecanismos de hiperdiploidia na LLA podem dever-se a mutações que ativam o recetor da tirosina cinase FLT3, o que acontece em aproximadamente 20% dos casos. Esta descoberta é muito importante pois uma terapêutica com inibidores da tirosina cinase pode ser muito útil, visto que a maioria dos doentes com estas mutações têm, já de base, um muito bom prognóstico. (12)

Alterações de hipodiploidia estão associadas a um elevado risco de falha no tratamento. A genética destas alterações não é bem conhecida, mas tem sido detetada uma alta frequência de deleções na via de sinalização RAS e alterações no gene *IKAROS* ou *IKZF1*.(11)

A alteração t(1;19)(q23;p13) codifica para a proteína de fusão E2A-PBX. A porção E2A contém o domínio bHLH responsável pela ligação específica do DNA e a da sua dimerização que desempenha um papel crítico no desenvolvimento linfocitário.(12)

A mutação t(9;22)(q34;q11) leva à expressão do gene de fusão *BCR/ABL1*, estando associada a 3%-5% das LLA em crianças e a 25% dos casos em adultos. A t(9;22)(q34;q11) funde a sequência da região BCR com a sequência ABL1, sendo codificada uma tirosina cinase, a proteína de fusão BCRABL1 que ativa múltiplas vias de sinalização, aumentando a proliferação celular e desregulando a diferenciação e a adesão. A deleção do gene do fator de transcrição precoce *IKZF1* é comum apresentar-se na LLA com a alteração *BCR-ABL1*. Estas alterações podem promover resistência à terapêutica. Cerca de 15% das LLA-B da infância possuem um perfil de expressão genética parecido a uma LLA *BCR-ABL1* positiva. Estes casos podem ter uma deleção ou mutação do gene *IKZF1* e têm um muito mau prognóstico. (9)

Uma LLA BCR-ABL1-like inclui translocações que envolvem outras tirosinas cinases ou alternativamente translocações que envolvem o *CRLF2* (recetor citocina like fator 2) ou, mais raramente, rearranjos conduzindo à ativação do EPOR (recetor da eritropoietina). O *CRLF2* está presente em 50% das LLA BCR-ABL1-like. Casos que envolvem translocações do gene *CRLF2* estão normalmente associadas a mutações no gene *JAK* que são particularmente comuns em crianças com síndrome de Down. Os casos que envolvem translocações de genes da tirosina cinase, assim como de outras cinases, incluem genes como *ABL2*, *PDGFRB*, *NTRK3*, *TYK2*, *CSF1R* e *JAK2*. Doentes com LLA BCR-ABL1-like mostram uma elevada frequência de perda no gene *IKZF1* e *CDKN2A/B*, embora este tipo de deleções também ocorra noutros tipos de LLA. (13)

Alterações na função de fatores de transcrição da linhagem B como o Ikaros, PAX5, EBF1 e E2A também ocorrem na LLA. Uma das alterações com maior interesse é uma alteração do gene *IKZF1* que codifica para a proteína Ikaros, uma proteína *zinc finger* que se liga ao DNA. A proteína Ikaros funciona como regulador da expressão genética e na remodelação da cromatina, tendo assim um papel de regulador na diferenciação hematopoiética e também no desenvolvimento imunológico. A proteína Ikaros é um importante supressor tumoral e, assim mutações e deleções neste gene estão associadas a LLA de pior prognóstico.(14,15)

Na linhagem T têm sido descritas mutações na família de genes *Notch* que codificam para proteínas transmembranares que atuam como recetores de superfície e como reguladores de transcrição, estando implicadas na sinalização para a regulação das células-mãe hematopoiéticas e tendo um papel essencial no desenvolvimento dos linfócitos-T. Alterações no gene *Notch1* estão presentes em 50% das LLA-T.(16)

A alteração t(1;14) vai levar a um sobre-expressão da proteína TAL1 que leva a inativação do E2A que vai, por sua vez, influenciar o domínio bHLH, como já foi referido acima. É responsável por cerca de ¼ das LLA em idade pediátrica. (14,15)

Na figura 1, abaixo, é possível ver gráficos que sintetizam as alterações cromossómicas mais frequentes dependendo da linhagem e da faixa etária.

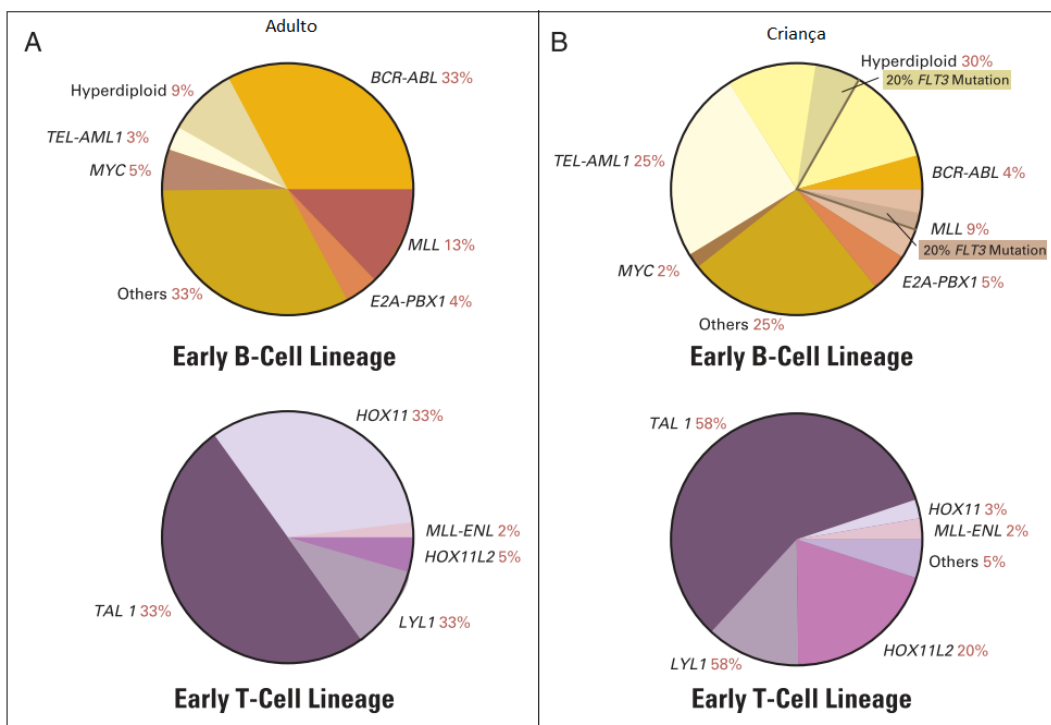


Figura 15 - Alterações cromossómicas presentes na LLA [retirado de(12)]
A: no Adulto; B: na Criança

4. Classificação

A classificação das leucemias em geral, das leucemias agudas e das LLA tem sido alterada, ao longo dos anos, de acordo com os conhecimentos laboratoriais.

4.1 Classificação FAB

A primeira classificação utilizada, realizada por um grupo de trabalho de investigadores Franceses-Americanos-Britânicos (FAB), baseava-se sobretudo na caracterização morfológica e tamanho dos blastosmas, também, em características citoquímicas e em algumas características citogenéticas (ex. presença de cromossoma Ph), não tendo relevância no prognóstico. (17)

A classificação FAB para as LLA faz a subdivisão em L1, L2 e L3 (3 subtipos), tal como se pode observar na Tabela 2.

L1: Mais frequente em crianças. Como se pode observar na Figura 2 existe uma população uniforme de blastos pequenos com escasso citoplasma azulado, núcleo regular, cromatina condensada e nucléolo pouco evidente.

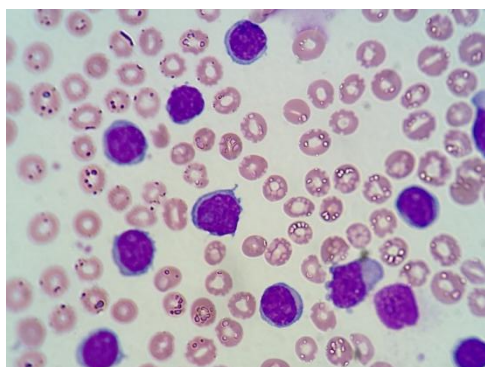


Figura 16 – Lâmina de Sangue periférico, LLA – L1

L2: Mais Frequente em adultos. Como se pode observar na Figura 3 existe uma população heterogénea com blastos maiores e de diferentes tamanhos, citoplasma basofílico abundante, núcleo irregular e nucléolo proeminente

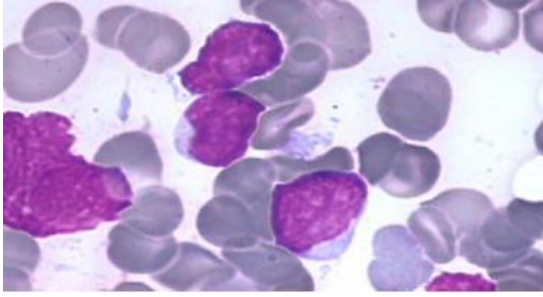


Figura 17 - Lâmina de Sangue periférico, LLA – L2 [retirado de (17)]

L3: Mais rara. Como se pode observar na Figura 4 existe uma população homogénea com células maiores de citoplasma basófilo com vacúolos e cromatina laxa.

Posteriormente foi reclassificado como Linfoma de Burkitt (células B maduras), está incluído nos linfomas Não-Hodgkin.

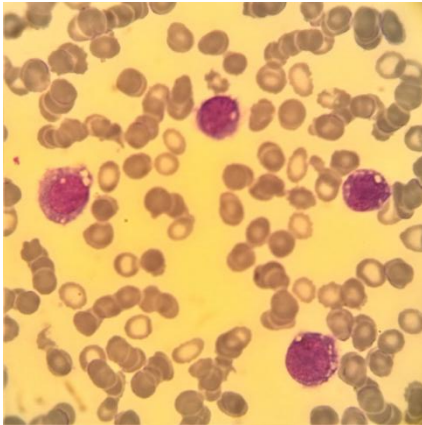


Figura 18 - Lâmina de Sangue periférico, LLA – L3

4.2 Classificação OMS

A Organização Mundial de Saúde (OMS ou WHO; *World Health Organization*), em colaboração com a Sociedade de Hematologia e com a Associação Europeia de Hematopatologia, propõe uma classificação que reflete uma opinião de consenso de hematopatologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas.

A classificação tem por base características moleculares, citogenéticas e imunofenotípicas dos linfoblastos. A recente descoberta de novas alterações moleculares permite trazer novas perspectivas sobre o diagnóstico e prognóstico destes marcadores e, possivelmente, uma melhor compreensão da patologia destas doenças. (13,18)

A Tabela 2 apresenta a Classificação WHO para a LLA.

Tabela 13 - Classificação WHO para a LLA

Classificação WHO para leucemia linfoblástica aguda (2016)

<ul style="list-style-type: none">• Leucemia/linfoma linfoblástico B Leucemia/linfoma linfoblástico B, não especificado Leucemia/linfoma linfoblástico B com alterações genéticas recorrentes Leucemia/linfoma linfoblástico B t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B hiperdiploidia Leucemia/linfoma linfoblástico B hipodiploidia Leucemia/linfoma linfoblástico B t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i> Provisório: Leucemia/linfoma linfoblástico B, <i>BCR-ABL1</i>-like Provisório: Leucemia/linfoma linfoblástico B iAMP21• Leucemia/linfoma linfoblástico T Provisório: Leucemia/linfoma linfoblástico precursor Early T-cell Provisório: Leucemia/linfoma linfoblástico Natural killer (NK)
--

5. Manifestações Clínicas

Os sinais e sintomas da LLA são comuns a muitas doenças próprias da infância, o que pode tornar, inicialmente, o diagnóstico difícil. Os sintomas iniciais são consequência da infiltração dos linfoblastos na medula óssea: anemia, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia e dores ósseas, principalmente nas crianças. A apresentação clínica reflete a extensão da infiltração de linfoblastos pelos diversos órgãos. (1,4)

A anemia manifesta-se por palidez, cansaço fácil e cefaleias e em doentes mais idosos, pode refletir-se em dispneia, tonturas e dor precordial. Como os leucócitos são células envolvidas no sistema imunitário do organismo, a leucopenia tem como consequência infecções recorrentes e, por esse motivo, a febre está muitas vezes presente. A trombocitopenia é responsável por perdas de sangue, pelo aparecimento de equimoses e petéquias, bem como outros problemas hematológicos. É raro verificar-se uma pancitopenia grave e deve ser feito um diagnóstico diferencial com aplasia medular. (1,4)

Mais de metade dos doentes tem febre, principalmente devido à libertação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF) pelas células leucémicas, esta febre desaparece com o início da fase de indução da quimioterapia. Mais raramente, a febre é por motivo de infeção. (1,4)

Devido à infiltração de órgãos linfáticos a LLA manifesta-se por adenopatias, hepatomegalia, esplenomegalia e adenopatias hilares. Estas manifestações são mais pronunciadas na idade pediátrica. Mas qualquer órgão pode estar infiltrado, podendo levar ao envolvimento escrotal, alterações oculares, nódulos subcutâneos, envolvimento das glândulas salivares e, muito raramente, compressão medular por massa epidural (emergência médica). (1,4)

Particularmente nas crianças, existem dores ósseas e artralguas por expansão do periosteio, pois nas crianças a medula hematopoiética ainda persiste nos ossos longos. Nestes casos é importante fazer o diagnóstico diferencial, para não ser confundido com doenças reumatológicas. (1,4)

A apresentação clínica das LLA da linhagem T (15% do total de LLA) tem características próprias. Os doentes são normalmente de mais idade e têm contagens leucocitárias mais elevadas no momento do diagnóstico. Apresentam uma massa mediastínica, maior incidência de alterações do SNC e infiltrados renais. Como foi referido, a presença de massa mediastínica é mais frequente na LLA-T, em 85% dos casos, pode causar síndrome de compressão do mediastino superior ou na veia cava e levar a derrame pleural.(1,4)

Na tabela 3 é possível ver o resumo das principais manifestações clínicas que surgem em idade pediátrica e em idade adulta.

Tabela 14- Manifestações Clínicas da LLA em crianças e em adultos [adaptado de(4)]

Manifestações clínicas	Crianças	Adultos
<u>Idade (anos)</u>		
<1	2%	
1-9	72-78%	
10-19	20-26%	
20-39		55%
40-59		36%
>60		9%
Sexo masculino	56-57%	62%
<u>Sintomas</u>		
Febre	57%	33-56%
Fatiga	50%	50%
Sangramento	43%	33%
Dores ósseas e articulares	25%	25%
<u>Linfoadenopatias</u>		
Sem	30%	51%
Marcada	15%	11%
<u>Hepatomegalia</u>		
Sem	34%	65%
Marcada	17%	
<u>Esplenomegalia</u>		
Sem	41%	56%
Marcada	17%	
Massa mediastínica	8-10%	15%
Leucemia SNC	3%	8%
Leucemia testicular	1%	0.3%

6. Diagnóstico

6.1 Anamnese e exame objetivo

A história clínica e exame objetivo do doente devem ser rigorosos.

6.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se na identificação morfológica dos linfoblastos, citometria de fluxo (imunofenotipagem: linhagem B ou T), citogenética e genética molecular.(4)

6.2.1 Hematologia e Observação morfológica em lâmina: sangue periférico/sangue medular

Perante uma suspeita de leucemia da série linfóide, o primeiro exame a pedir é o hemograma com observação do esfregaço sanguíneo. O grau de pancitopenia varia consoante o estado de gravidade da leucemia, sendo normalmente mais grave na linhagem B que na linhagem T.(4,19)

A contagem dos leucócitos pode-se encontrar aumentada, normal ou diminuída, a linhagem T tem normalmente uma contagem de leucócitos mais elevada. Ocorre trombocitopenia e neutropenia. A maioria dos adultos apresenta-se anémica, com uma anemia normocítica normocrômica, mas uma hemoglobina (Hb) abaixo de 8 g/dL é rara.(1)

A maioria dos doentes apresenta blastos circulantes, mas pode ser difícil observá-los, principalmente em casos onde há leucopenia. Pelo menos 16% dos doentes não tem blastos no sangue periférico na altura do diagnóstico.(4)

Em casos raros, pode haver uma hipereosinofilia reativa, com infiltração pulmonar e cardiomiopatia, características típicas de um subtipo de LLA-B com a translocação t(5;14)(q31;q32) que provoca a ativação da IL-3.(2)

Uma alteração nos parâmetros da coagulação não é comum, exceto em doentes com contagens muito elevadas de leucócitos que estão em risco de uma hemorragia do sistema nervoso central (SNC) devido a leucostase e lise tumoral.

A observação, numa lâmina de sangue periférico, de mais de 20% de blastos é um indicador da presença de uma leucemia aguda. A morfologia dos blastos da linhagem B e T varia, existem blastos pequenos com pouco citoplasma e cromatina condensada, blastos maiores com nucléolos bem visíveis, citoplasma azulado e, ocasionalmente, com vacúolos, blastos com cromatina dispersa e muitos vacúolos proeminentes. Na linhagem B os blastos são, por norma, caracterizados por um citoplasma intensamente basofílico, nucléolos proeminentes, vacúolos no citoplasma e uma população homogénea. Na linhagem T os blastos podem ser grandes ou pequenos, com nucléolos redondos, irregulares, ou convolutos. Assim sendo, a morfologia dos linfoblastos é claramente insuficiente para distinguir os diferentes tipos de LLA entre si e até das leucemias mieloides agudas. (1)

Embora o primeiro sistema de classificação - FAB - tenha classificado o tipo de leucemia tendo em conta sobretudo critérios morfológicos, hoje em dia, a classificação das leucemias, segundo a OMS, engloba imperativamente uma abordagem citogenética e imunofenotípica, visto a diversa e diferente apresentação dos blastos malignos não representar todas as mutações cromossómicas identificadas. (1,2)

As figuras 5 e 6 correspondem a imagens de lâminas de esfregaço de sangue periférico, observadas em contexto clínico, de doentes com diagnóstico de LLA.

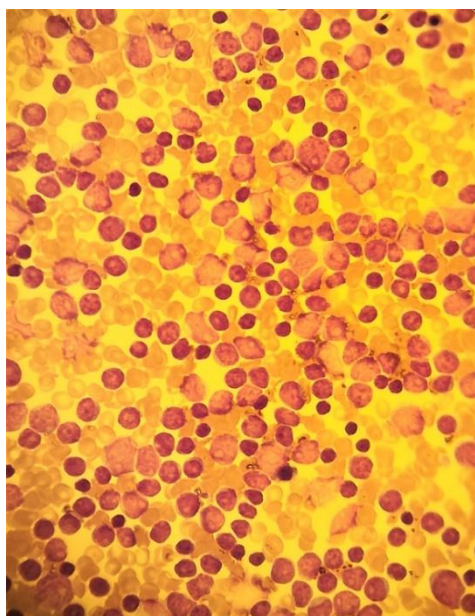


Figura 19 – LLA, esfregaço de sangue periférico

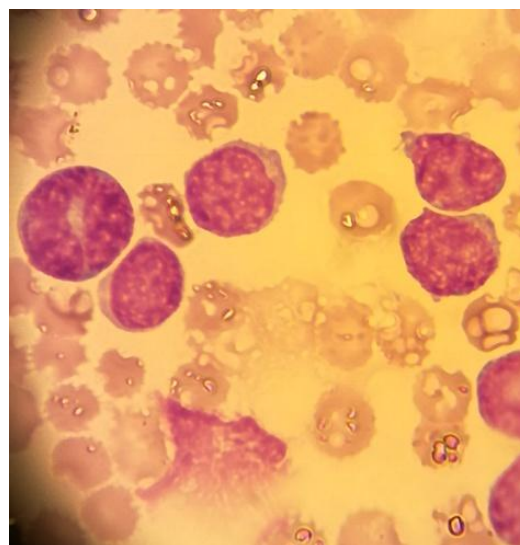


Figura 20 - Linfoblastos da linhagem T num esfregaço de sangue periférico

Depois de uma avaliação do sangue periférico, o passo seguinte será o exame da medula óssea. A realização do mielograma é obrigatória para o diagnóstico de LLA, sendo por vezes necessária a biópsia óssea nos casos de *dry tap*, devido a densa infiltração da medula óssea por blastos e aumento de reticulina e trefina, o que leva a fibrose. A medula irá estar hiper celular, com uma infiltração marcada de linfoblastos superior a 25%, mas em muitos casos é mesmo superior a 50%. (1,2)

Além do estudo morfológico é essencial proceder à imunofenotipagem e análise citogenética. O estudo morfológico não permite, normalmente, distinguir a linhagem dos blastos, mas essa caracterização é possível através da imunofenotipagem.

A tabela 4 apresenta as principais alterações hematológicas que são possíveis observar num hemograma, numa lâmina de sangue periférico e na medula óssea, numa LLA.

Tabela 15 - Alterações Hematológicas na LLA [adaptado de (4)]

Manifestação clínica	Crianças	Adultos
Linhagem celular		
T	15%	25%
B	85%	
Contagem de leucócitos (x10⁹/L)		
<10	49%	41%
10-49	31%	31%
50-99	12%	12%
>100	13%	16%
Hb (g/dL)		
<8	48%	28%
8-10	24%	26%
>10	28%	46%
Plaquetas (10⁹/L)		
<50	46%	52%
50-100	23%	22%
>100	31%	26%
Leucemia do SNC		
	3%	8%
Linfoblastos na MO		
<90%	33%	29%
>90%	67%	71%
Linfoblastos no SP		
Presença	87%	92%
Ausência	13%	8%

Hb: hemoglobina; SNC: sistema nervoso central; MO: medula óssea

Parâmetros Bioquímicos

Devem ser pedidas análises aos parâmetros bioquímicos que devem incluir: ionograma, desidrogenase láctica (LDH), ácido úrico, cálcio, fósforo, transaminases, serologias (HBV, HCV, HAV, HIV, CMV, herpes) e imunoglobulinas.(4)

Os níveis de ácido úrico, LDH, potássio e fósforo podem estar aumentados devido à lise tumoral. Estes parâmetros são muito importantes no doente com leucemia, pois são marcadores determinantes do grau de infiltração leucémica. Concentrações séricas elevadas de ácido úrico refletem um aumento do catabolismo das purinas.(7)

Doentes que tenham um grande envolvimento renal vão ter níveis aumentados de creatinina, ureia, ácido úrico e fósforo. Ocasionalmente, doentes com LLA-T podem apresentar doença renal aguda devido a infiltração renal por linfoblastos.(4)

A hipercalcemia é rara e deve-se a uma proteína parecida com a hormona paratiroideia (PTH) que provém da infiltração leucémica no osso.(4)

Alterações hepáticas, devido a infiltração leucémica, ocorrem em cerca de 20% dos doentes e normalmente não têm grande impacto clínico, exceto uma ligeira alteração transitória nas transaminases.(4)

Os níveis das imunoglobulinas séricas, principalmente a IgA e a IgM, estão diminuídos em cerca de um terço das crianças e maioritariamente associados a LLA-B.(4)

A pesquisa das serologias é muito importante pois pode influenciar o tratamento.(1)

6.2.3 Avaliação do SNC

É importante fazer a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), uma vez que pode haver infiltração leucémica, mas esta análise deve ser adiada caso haja risco de hemorragia por trombocitopenia marcada ou contaminação por um número elevado de blastos no sangue periférico. (4)

Os linfoblastos são identificados no LCR de doentes que normalmente já apresentam sintomas neurológicos. A leucemia do SNC é definida pela presença de pelo menos 5 linfoblastos/ μ L no LCR.(4)

6.2.4 Citoquímica

As colorações citoquímicas usadas no diagnóstico e na classificação das leucemias podem ser aplicadas tanto em medula óssea, como em sangue periférico. Atualmente, a análise citoquímica é menos utilizada devido ao uso da imunofenotipagem, mas pode ser necessária caso esta não esteja disponível. (20)

Os blastos linfoides são PAS (reação do ácido periódico-Schiff) positivos, apresentando grânulos grosseiros em fundo claro, mas podem ser negativos em algumas LLA-T. A Fosfatase Ácida é positiva para os linfoblastos da LLA-T e a Mieloperoxidase e Negro do Sudão são negativas.(2,20)

6.2.5 Imunofenotipagem por Citometria de fluxo

A citometria de fluxo por multicanal é a técnica utilizada na imunofenotipagem linfocitária e pode ser aplicada em amostras de sangue periférico, medula óssea e líquidos orgânicos.

A imunofenotipagem tem como objetivos:

- O diagnóstico e a classificação e subclassificação da LLA
- A detecção de doença residual mínima (DRM).

A citometria de fluxo por multicanal é uma técnica que tem por princípio a utilização de um fluxo laminar de partículas em suspensão. A unidade de base de um citómetro de fluxo compreende:

Sistema de fluidos: Na câmara de fluxo de um citómetro de fluxo em funcionamento, existe um sistema de Focagem Hidrodinâmica que dispõe as células em suspensão num líquido isotónico numa única fila, em posição central na coluna de fluxo. As células entram na câmara de fluxo sob pressão por um pequeno orifício, rodeadas por uma solução salina, que mantém a pressão sobre as células, garantindo que estas atravessem, uma a uma, o feixe de luz emitido pelo laser, mantendo-se na posição central do fluxo. Sob condições otimizadas, obtém-se um fluxo laminar, sendo cada partícula analisada individualmente, como se pode observar na figura 7.(21,22)

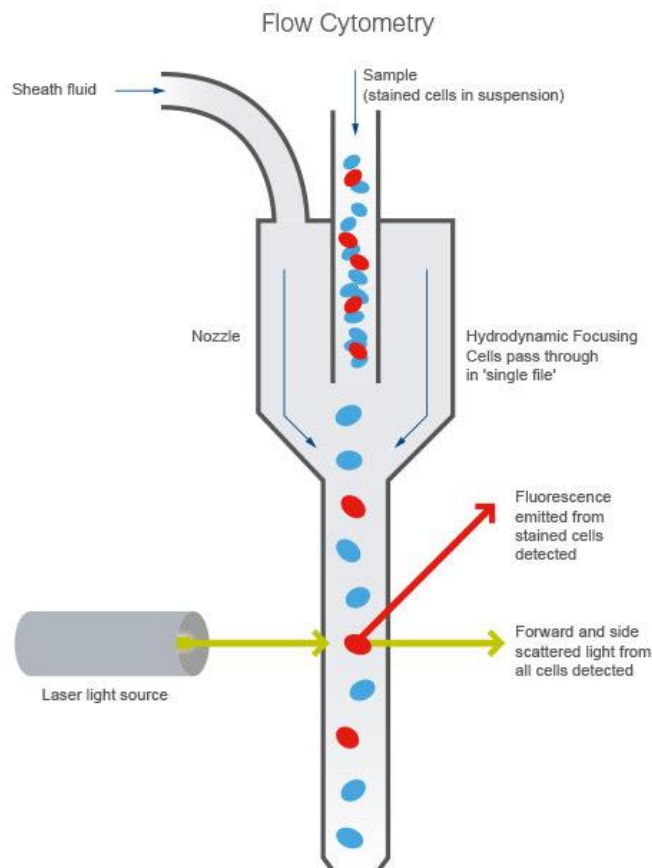


Figura 21 - Esquema do Sistema de Fluidos do Citômetro de Fluxo [retirado de (21)]

Sistema ótico: Quando uma célula atravessa o feixe de luz, provoca um processo de dispersão da luz ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade dependerá das características da célula. Há depois uma avaliação, por diferentes sensores, de fenômenos físicos como a dispersão, a refração da luz, bem como da fluorescência emitida pela partícula ao atravessar o laser.

A dispersão frontal (*Forward Scatter* ou FSC) é proporcional ao tamanho relativo da célula, enquanto a dispersão ortogonal ou lateral – a 90° (*Side Scatter* ou SSC) informa sobre a estrutura interna da célula (granularidade, relação núcleo-citoplasma). As duas informações, em simultâneo, permitem distinguir vários tipos de células numa amostra heterogênea

A medição da fluorescência emitida a diferentes comprimentos de onda, selecionados com recurso a diferentes filtros, fornece informação quantitativa e qualitativa acerca dos fluorocromos ligados tanto à superfície das partículas (receptores celulares), como ao seu interior (moléculas intracelulares, como DNA e citocinas). O uso de múltiplos fluorocromos, que são excitados pelo mesmo comprimento de onda

mas emitem em comprimentos de onda diferentes, permite testar várias propriedades das células em simultâneo.(21,22)

Quando a luz emitida atinge um fotodetector gera-se uma pequena corrente elétrica, cuja voltagem é proporcional ao número de fótons recebidos pelo detetor. Esta voltagem é convertida em sinal digital e, seguidamente, expressa graficamente.(21,22)

Sistema eletrónico: Os sinais luminosos, amplificados e convertidos em pulsos eletrónicos pelos fotomultiplicadores, são medidos e sofrem uma conversão analógica-digital. Os sinais digitais são processados em vários canais, de acordo com a sua intensidade, acumulando-se, em tempo real, para uma posterior análise computadorizada. Estes dados são apresentados geralmente sob a forma de diagramas biparamétricos – *dot-plot*, que combinam os parâmetros dois a dois. No *dot-plot*, cada ponto (*dot*) corresponde a cada célula analisada pelo citómetro. As medições citométricas, com vista à determinação de parâmetros celulares, implicam a utilização de fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais, que possibilitam a marcação específica de um constituinte celular (antigénio). (21,22)

Os eixos dos gráficos são nomeados de acordo com o fluorocromo e o antigénio ligado a ele, as células positivas para ambos os marcadores apresentam-se no quadrante superior direito, enquanto as negativas para ambos os marcadores estão no quadrante inferior esquerdo.(21,22)

A figura 8 apresenta um esquema de um equipamento de citometria de fluxo, com os seus diferentes componentes.

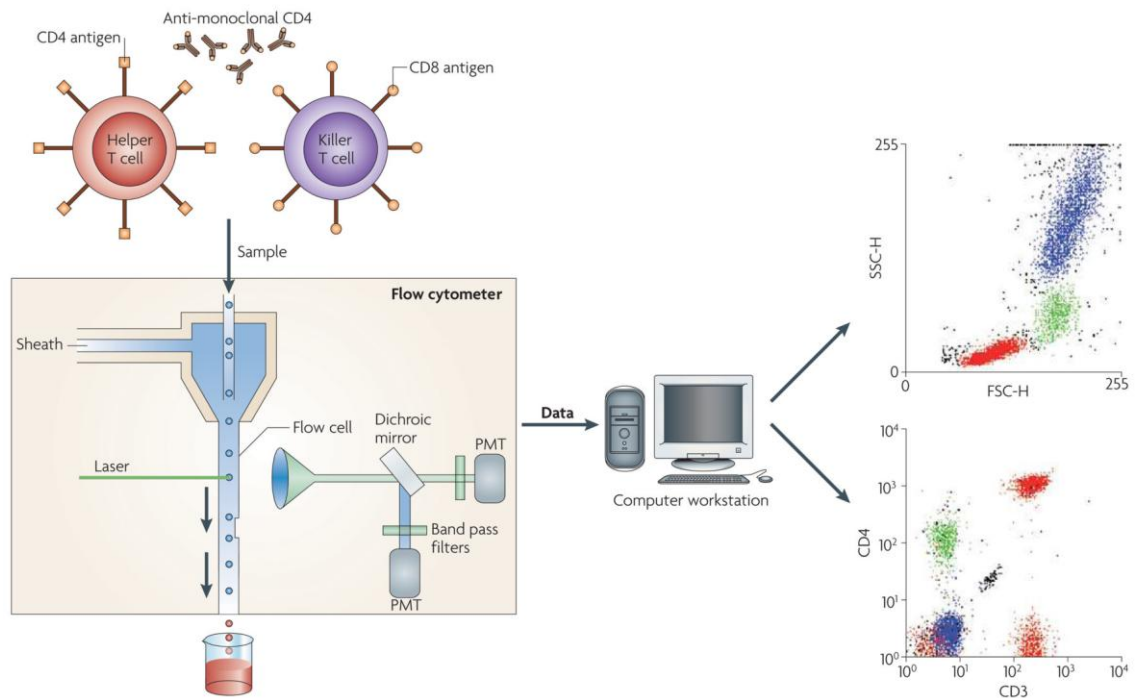


Figura 22 - Esquema da Citometria de Fluxo [retirado de (23)]

Análise por Imunofenotipagem

Imunofenotipagem é o processo de identificação e caracterização de células, com base nos diferentes tipos de marcadores ou antígenos expressos na superfície celular, citoplasma e no núcleo. Esta técnica utiliza anticorpos que reconhecem, especificamente, diferentes antígenos. Estes anticorpos são marcados com fluorocromos. Normalmente, para caracterizar os diferentes tipos de células têm de se utilizar diferentes marcadores celulares devido à sua inespecificidade. Assim, é normal o uso de uma combinação de vários marcadores para definir o fenótipo de um tipo específico de célula. São, portanto, usadas diferentes abordagens consoante o tipo de amostra e suspeita de diagnóstico.(24)

Uma análise por Imunofenotipagem requer:

Preparação das Amostras

Podem ser utilizadas amostras de sangue periférico, aspirado medular, biópsia aspirativa de gânglios, lavado bronco-alveolar, líquido cefalorraquidiano e líquidos orgânicos. As amostras devem ser colhidas em tubo de EDTA, o anticoagulante de eleição, e devem ser analisadas pouco tempo após a colheita, para que se evite a morte celular. (25)

Por norma, é preferida uma amostra de medula óssea a sangue periférico para a imunofenotipagem, mas se tal não for possível por pouca ou pobre qualidade pode ser usado sangue periférico.(25)

A densidade celular da amostra é medida previamente, a amostra é diluída numa solução isotónica e, depois, são adicionados os anticorpos-monoclonais (marcados com fluorocromos) cuja presença se pretende analisar. Sempre que se utilizam anticorpos-monoclonais que marcam as cadeias leves de superfície (κ e λ), adiciona-se uma solução de albumina à amostra antes de se adicionarem os anticorpos-monoclonais; esta solução irá eliminar as imunoglobulinas serológicas que, de outra forma, interfeririam com a determinação pretendida. Sempre que se utilizam anticorpos-monoclonais que marcam antígenos citoplasmáticos, adiciona-se uma solução fixadora e uma permeabilizadora antes de se adicionar o anticorpo monoclonal à amostra, a fim de que este consiga atingir o conteúdo intracelular sem, contudo, destruir a célula. É também usada uma solução de lise dos eritrócitos para que estes não interfiram na análise das populações leucocitárias. (25)

Marcadores Celulares

Todas as células normais expressam uma variedade de marcadores de superfície (receptores celulares) e marcadores intracitoplasmáticos (marcadores intracitoplasmáticos, DNA, citocinas), dependendo do seu tipo celular e do seu grau de maturação. (26)

Contudo, um crescimento celular anormal (neoplasia) pode interferir com a expressão normal dos marcadores. Assim, qualquer alteração obriga à sua confirmação e caracterização para obter um diagnóstico. (26)

Clusters of Differentiation (CD)

A imunofenotipagem depende de uma biblioteca de antígenos e dos seus padrões de expressão. A maioria das células tem, na sua superfície, marcadores celulares que são identificados por números em CD. A nomenclatura CD foi estabelecida pelos *International Workshops and Conferences on Human Leukocyte Differentiation Antigens* (HLDAs), conduzidos pela organização *Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM), e foi adotada internacionalmente e oficialmente aprovada pela WHO. O objetivo desta nomenclatura é obter uma uniformidade quando se está a referir uma molécula ou anticorpo que se ligam a um determinado antígeno.

A imunofenotipagem usa a nomenclatura CD para o fenótipo dos leucócitos, baseada nas características de ligação a anticorpos. As células são caracterizadas pela presença ou ausência da ligação de um antígeno a um anticorpo por: + ou -, sendo também caracterizadas pela intensidade, que representa o nível de expressão de determinado antígeno, por: alta, média e baixa.(24)

Existem diversos grupos de trabalho que, de acordo com a classificação da WHO, têm como objetivo criar um protocolo de standardização do uso da imunofenotipagem para a caracterização e monitorização de doenças hematológicas malignas.

EuroFlow: o grupo de consórcio EuroFlow desenvolveu estratégias para assegurar que metodologias exatas são usadas de modo a garantir reprodutibilidade no diagnóstico. Foram tidos em conta dois critérios principais: a otimização da expressão do antígeno que é dependente do fluorocromo usado e a escolha de marcadores compatíveis com a caracterização dos diferentes tipos de leucemias agudas sobe forma de painéis de modo a possibilitar uma análise multiparamétrica do todo o fenótipo da população blástica. Na tabela 5 é possível ver o painel de Fluorocromos definidos pelo consórcio EuroFlow para Leucemias Agudas (27)

Tabela 16 - Painel de Fluorocromos definidos pelo consórcio EuroFlow para Leucemias Agudas [retirado de (27)]

Version (no. of cases ^b)	Fluorochromes and markers							
	PacB	AmCyan	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	AF700
1 (n = 35)	SmCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	CyCD3
2 (n = 55)	SmCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CyCD3	CD7
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
3 (n = 102)	SmCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	CyCD3
4 (n = 35)	SmCD3	CD45	CyCD79a	CyMPO	CD34	CD19	CD7	CyCD3
5 (Final) ^c (n = 158)	CyCD3 ^T	CD45 ^{B,T,M}	CyMPO	CyCD79a	CD34 ^{B,M}	CD19 ^B	CD7	SmCD3 ^T

Abbreviations: AF 700, alexa fluor 700; ALL, acute lymphoblastic leukemia; ALOT, acute leukemia orientation tube; AmCyan, *Anemonia Majano* cyan fluorescent protein; AML, acute myeloblastic leukemia; APC, allophycocyanin; AUL, acute undifferentiated leukemia; BCP, B-cell precursor; Cy, cytoplasmic; Cy5.5, cyanin5.5; Cy7, cyanin7; FITC, fluorescein isothiocyanate; H7, hilite7; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; PacB, pacific blue; PacO, pacific orange; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein; Sm, surface membrane. ^aFurther information about markers and hybridomas is provided in the Appendix. ^bA total of 385 acute leukemia cases were evaluated: 190 BCP-ALL, 57 T-ALL, 132 AML, 6 AUL/MPAL. ^cT = backbone markers in common with T-ALL antibody panel; B = backbone markers in common with BCP-ALL antibody panel; M = markers in common with AML/MDS antibody panel. Highlighted boxes: changes as compared to previous version.

HIPC: a *Human Immune Phenotyping Consortium* (HIPC) foi formada pela *Federation of Clinical Immunology Societies* de modo a promover a standardização da análise imunofenotípica por citometria de fluxo. Assim, desenvolveu um painel de imunofenotipos da maioria dos tipos celulares encontrados em sangue periférico.(28)

AIEOP-BFM: o consórcio AIEOP-BFM trabalhou na standardização e validação, entre nove laboratórios internacionais de referência, de modo a elaborar *guidelines* para a imunofenotipagem na LLA pediátrica. Na tabela 6 é possível ver o painel de marcadores para a LLA pediátrica do grupo AIEOP-BFM (25)

Tabela 17 - Painel de consenso para a LLA pediátrica do grupo AIEOP-BFM [retirado de (25)]

The AIEOP-BFM consensus antibody panel for pediatric ALL

Mandatory and optional markers (each combined with CD45)

Intracellular ^{a,b}	iCD3, iCD22, iCD79a, iIgM (μ-chain), iLysozyme, iMPO
Surface ^a	CD2 ^c , CD3, CD5, CD7; CD10, CD19, CD20; CD11c, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65 ^d , CD117; CD34, (CD45), CD56, HLA-DR if T-ALL: CD1a, CD4, CD8, TCRαβ, TCRγδ if B-IV suspected: κ-chain, λ-chain (surface staining after pre-washing or intracellular)
Optional / Recommended	all cases: NG2 ^e , CD371 ^{c,f} if BCP-ALL: CD11a ^c , CD22, CD24, CD38, CD44, CD58, CD66c, CD123 ^c , CRLF2 ^{c,g} if T-ALL: CD99, iTdT if BAL according to general panel: CD24, iTdT

^aMandatory markers for WHO, EGIL, ETP classifications.
^bPrefix "i" stands for intracellular staining.
^cPhycoerythrin-conjugate (PE) recommended.
^dAvailable only labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC).
^eClone 7.1.
^fClone 50C1.
^gClone 1D3.

Monitorização

O *follow-up* da doença residual mínima (DRM) é definido pela população leucémica não detetada por métodos de diagnóstico, incluindo métodos imunofenotípicos, moleculares e citogenéticos. Ou seja, a população leucémica existente na medula óssea é insuficiente para ser detetada pelos métodos comuns de diagnósticos usados. A citometria de fluxo é capaz de detetar 1 célula leucémica em 10.000 células normais. (26,29)

Alterações detetadas no início do diagnóstico podem ser comparadas no *follow-up* de amostras de medula óssea para detetar a presença de DRM.

A avaliação da DRM é muito importante no seguimento da terapia pois é um dos fatores de estratificação do risco, sendo uma das aplicações da imunofenotipagem na leucemia aguda.

Como tal, a técnica de Citometria de Fluxo é de extrema utilidade não só no diagnóstico, como também na classificação, no prognóstico, na monitorização da terapêutica e na avaliação de recaída. (26,29)

Nas tabelas 7 e 8 estão discriminados os imunofenotipos típicos para os principais tipos de LLA.

Tabela 18- Imunofenotipo LLA-B. [adaptado de (6)]

LLA-B:	CD10+, CD19+, CD79a+, cCD22+, sCD22+, CD24+, PAX5+, TdT+, CD20 ±, CD34±
Pro-LLA-B	CD10-, CD19+, cCD79a+, cCD22+, TdT+
LLA-B	CD10+
Pre-LLA-B	<i>cytoplasmic</i> μ+, sIg-, CD10±
LLA-B com alterações genéticas recorrentes:	
Hiperdiploidia	CD10+, CD19+, CD34+, CD45-
Hipodiploidia (<46 cromossomas)	CD10+, CD19+, CD34+
<i>BCR-ABL1</i> t(9;22)(q34;q11.2)	CD10+, CD19+, TdT+, CD13+, CD33+, CD117-
t(v;11q23); rearranjo <i>MLL</i>	CD10-, CD19+, CD24-, CD15+
t(12;21)(p13;q22)<i>TEL-AML1</i>	CD10+, CD19+, TdT+, CD13+, CD34+
t(1;19)(q23;p13.3); <i>E2A-PBX1</i>	CD10+, CD19+, CD20±, CD34 -/+, <i>cytoplasmic</i> μ+
t(5;14)(q31;q32)	IL3-IGH: CD10+, CD19+

Tabela 19 - Imunofenotipo LLA-T. [adaptado de (6)]

LLA-T: TdT+	
Pro-LLA-T	cCD3+, CD7+, CD1a-, CD2-, CD4-, CD8-, CD34±
Pre-LLA-T	cCD3+, CD7+, CD1a-, CD2+, CD4-, CD8-, CD34±
Cortical LLA-T	cCD3+, CD7+, CD1a+, CD2+, CD4+, CD8+, CD34-
Medular LLA-T	cCD3+, sCD3+, CD7+, CD1a-, CD2+, CD4+ or CD8+, CD34-
ETP LLA-T	CD1a e CD8 sem expressão, CD5 com fraca expressão em 75% dos blastos. Expressão de marcadores da linhagem mielóide em 25% dos blastos. CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, CD65

Exemplos de resultados de imunofenotipagem obtidos por citometria de fluxo para LLA-B e LLA-T podem ser observados nas Figuras 9 e 10.

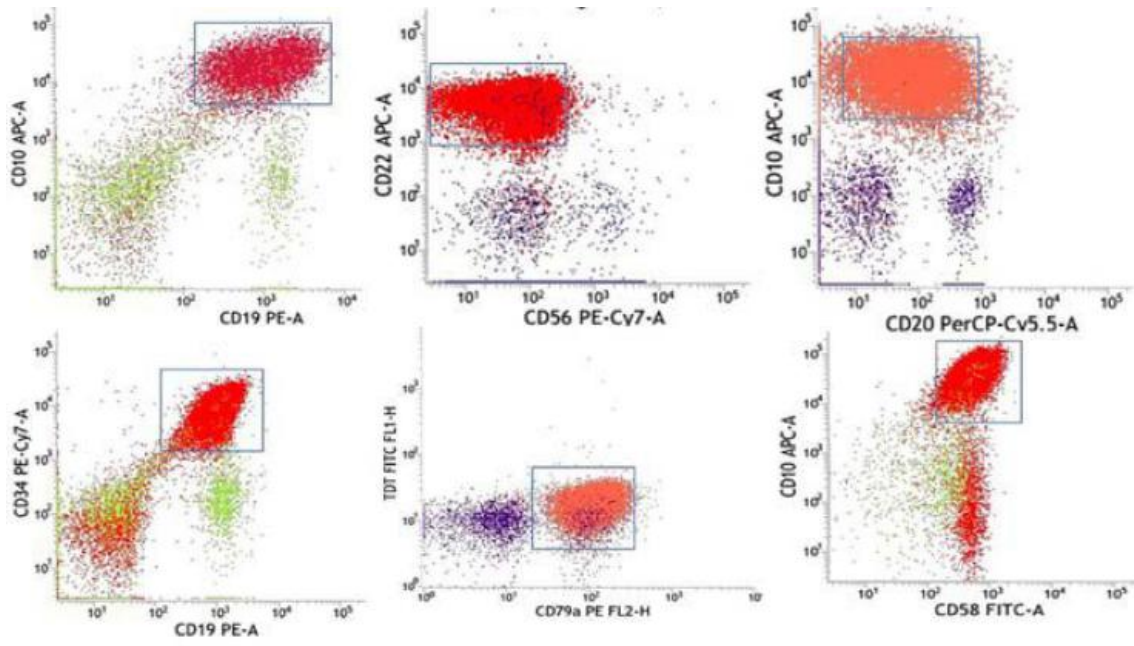


Figura 23 - Leucemia Linfoblástica Aguda-B. A população de células blásticas encontra-se representada a vermelho dentro dos quadrados [retirado de (28)]

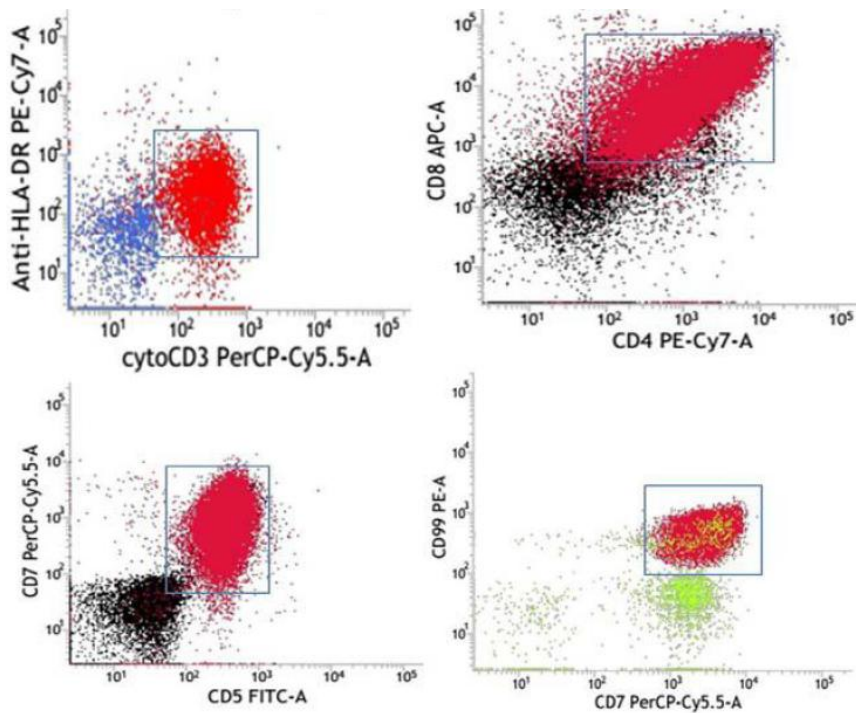


Figura 24 - Leucemia Linfoblástica Aguda -T. A população de células blásticas encontra-se a representada a vermelho dentro dos quadrados. [retirado de (28)]

6.3. Citogenética

Existe uma relação entre as alterações cromossômicas consistentes das neoplasias humanas e os oncogenes. Através da análise molecular dos pontos de quebra dessas anomalias cromossômicas, detetaram-se alterações na estrutura e no nível de expressão de oncogenes localizados nesses cromossomas.(30,31)

A citogenética é um ramo da genética que estuda a estrutura, número, função e comportamento biológico e patológico dos cromossomas. Pode ser dividida em citogenética clássica (ou convencional), que se baseia na análise dos cromossomas de células em divisão e citogenética molecular, que engloba técnicas essencialmente baseadas em hibridização fluorescente *in situ* - FISH, independentes da obtenção de células em divisão.(32)

A detecção das alterações genéticas associadas a cada tipo de LLA tem uma enorme importância no prognóstico. As alterações encontradas podem ser divididas e associadas a um bom prognóstico, a um prognóstico intermédio ou a um mau prognóstico. O tipo de alteração encontrada também influencia qual o tipo de tratamento que vai ser escolhido.(1)

6.3.1 Citogenética Convencional

A análise do número de cromossomas e da sua morfologia constitui o objetivo da citogenética convencional. O ser humano possui 46 cromossomas, agrupados em 23 pares, 22 são autossomas e existe um par de cromossomas sexuais (XX ou XY). Os cromossomas podem ser classificados segundo o tamanho, posição do centrómero (metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos) e padrão de bandas. O Cariograma é a imagem esquemática do número de cromossomas em metáfase, agrupados aos pares e dispostos de acordo com o seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas. O Cariótipo reporta o número total de cromossomas, a composição dos cromossomas sexuais e a descrição de qualquer anomalia: cromossômicas numéricas ou estruturais, constitucionais (congénitas) ou adquiridas (alteração neoplásica).(30,31)

O ISCN (*International System for human Cytogenomic Nomenclature*), de 2016, determina de forma detalhada a nomenclatura que deve ser seguida para reportar anomalias cromossômicas detetadas por citogenética clássica ou molecular. As figuras

11 e 12 apresentam cariógramas normais e a figura 13 é uma representação esquemática das bandas presentes nos cromossomas.(30)

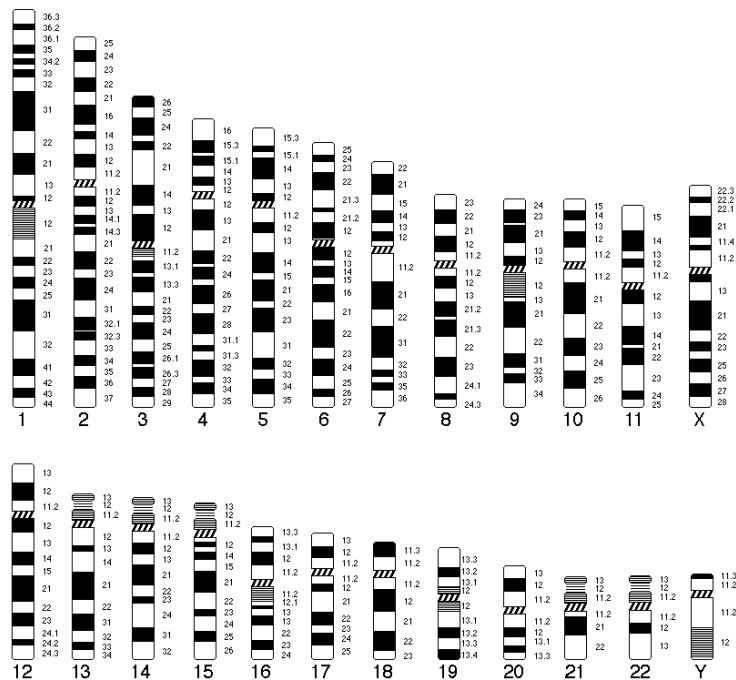
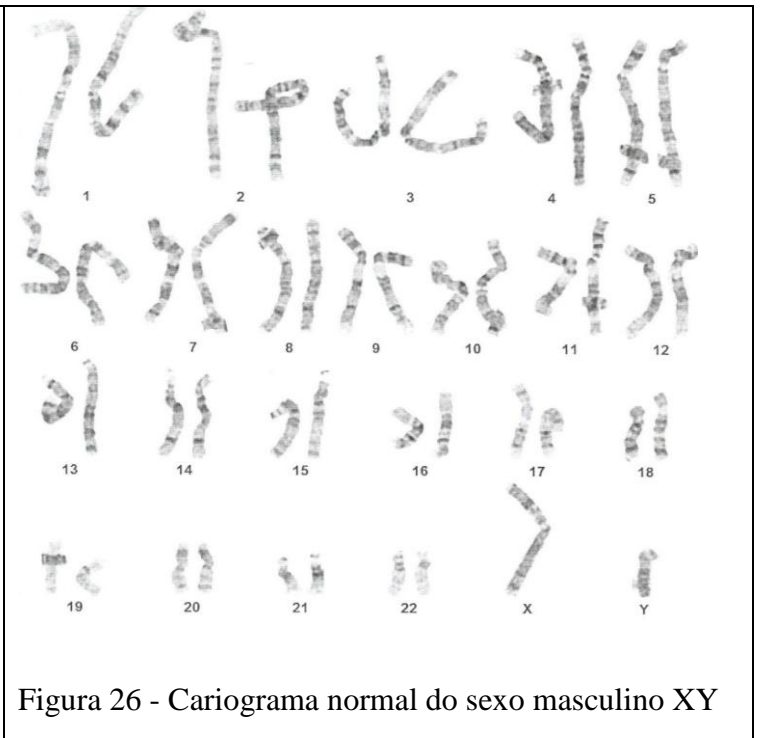
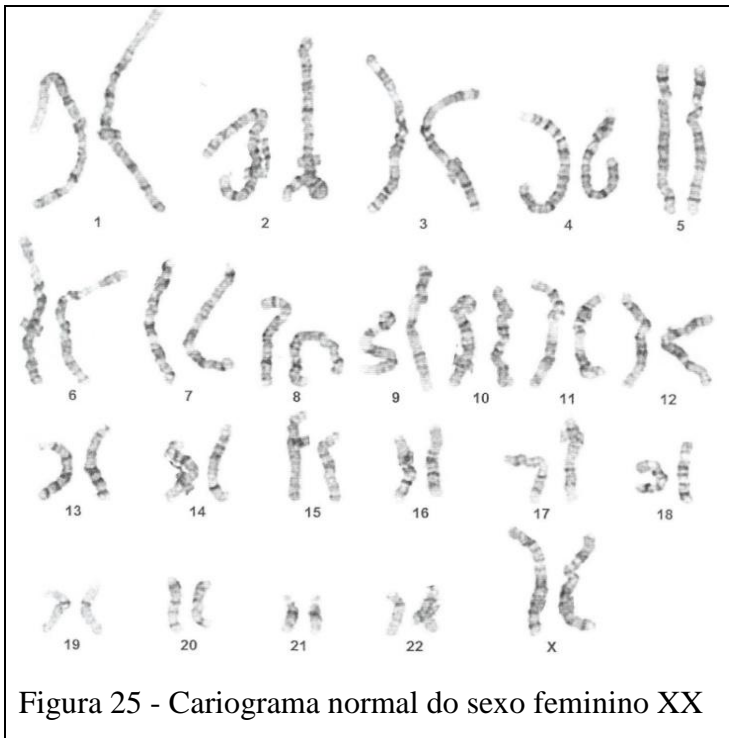


Figura 27 - Cromossomas e numeração das respectivas bandas [retirado de(30)]

O estudo dos cromossomas, recorrendo à citogenética convencional, exige células em divisão celular ativa, pois os cromossomas são distinguíveis individualmente

ao microscópio apenas durante a mitose, visto que material genético se condensa e conseguem observar-se os cromossomas individualizados; são estudados em metáfase pois é a fase em que os cromossomas atingem o máximo de condensação e o centrómero e os dois cromatídeos de cada um são visíveis ao microscópio ótico.(31)

A citogenética convencional apresenta a vantagem de detetar alterações numéricas e rearranjos estruturais equilibrados e desequilibrados e faz uma análise a todo o cariótipo e não apenas à deteção de uma determinada mutação, como ocorre nas técnicas de biologia molecular e FISH. No entanto, a análise citogenética convencional também apresenta várias limitações; depende, em grande medida, da experiência do técnico, tem baixo poder de automatização e, além disso, a resolução da técnica a partir de 3-5 Mb pode não permitir detetar alterações de tamanho inferior. A técnica de FISH permite a deteção de alterações mais diminutas, com algumas kb; no entanto, os resultados demoram vários dias a ser obtidos, podendo haver o risco de insucesso da cultura por contaminação ou inexistência de crescimento celular. A citogenética convencional identifica translocações, deleções entre outras alterações cromossómicas, no entanto tem a grande limitação de necessitar de células em metáfase e, por vezes, as células leucémicas não conseguem entrar em metáfase. Na técnica de FISH não é necessário este passo. (32,33)

Análise por Citogenética convencional

Os protocolos e procedimentos que serão referidos, a seguir, são adotados no laboratório SYNLAB GENÉTICA para as diferentes etapas de uma análise por citogenética convencional

Colheita

Se as indicações para a colheita e manuseamento da amostra não forem respeitadas, o crescimento celular em cultura pode estar comprometido levando à alteração da qualidade das metáfases.(34)

- ❖ Sangue periférico/Sangue medular: em tubo de heparinato de lítio

Preparação das amostras

- ❖ Sangue periférico/Sangue medular: as amostras de sangue periférico e medular podem ser diretamente adicionadas ao meio de cultura.

Cultura celular e avaliação

A partir de todas as amostras usadas para a realização de um estudo de citogénica clássica é feita uma cultura celular. O meio de cultura e procedimento pode variar ligeiramente consoante o tipo de amostra em causa. O meio de cultura é uma solução salina equilibrada que fornece uma mistura de sais e glucose essenciais para controlar o pH, pressão osmótica e providenciar energia para o crescimento celular. Normalmente são adicionados a este meio aminoácidos, fatores de crescimento, vitamínicos e antibióticos ou fungicidas.

É imperativo que sejam mantidas condições ótimas de temperatura, humidade e pH até que haja número adequado de células em divisão. São utilizadas estufas de CO₂ de modo a manter um nível constante de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37 °C.(34)

- ❖ Sangue periférico/Sangue medular

A partir das amostras de sangue periférico e medula óssea, cujo objetivo do estudo recai principalmente sobre doenças hemato-oncológicas, são feitas duas culturas. É realizada uma cultura de 24 horas, sincronizada com metotrexato (MTX), que é utilizada para a análise do cariótipo e uma cultura direta de 48 horas, sem MTX, que é utilizada para a contagem de metáfases.

Nas culturas de 24 horas com MTX, a amostra é colocada em meio de cultura e é adicionado metotrexato, ficando em incubação cerca de 17 horas. O MTX funciona como bloqueio bioquímico e para a divisão celular. Após 17 horas é removido o MTX e adiciona-se novo meio e timidina para promover o recomeço simultâneo e sincronizado da divisão celular.

A sincronização celular é um procedimento realizado durante a cultura, de modo a que as células, em divisão aleatória, fiquem estabilizadas num certo ponto do ciclo

celular e reiniciem o ciclo de modo sincronizado. O método utilizado para que a sincronização aconteça é a adição de timidina. (34)

Manipulação da cultura

Quando as amostras em cultura já têm o número suficiente de células em divisão celular é adicionado às culturas COLCEMID[®], um inibidor mitótico usado para obter células em metáfase. O COLCEMID[®], liga-se à tubulina, impedindo a formação das fibras do fuso acromático ou destruindo as já formadas e impede a separação dos cromátídeos irmãos na anáfase, interrompendo o ciclo celular em metáfase.

- ❖ Sangue periférico/Sangue medular: incubado 30 minutos com COLCEMID[®]

O passo seguinte é o tratamento com um soluto hipotônico, cloreto de potássio e citrato de sódio provocando a lise da membrana plasmática dos linfócitos, obtendo-se uma suspensão nuclear. Como o soluto tem uma concentração salina inferior à citoplasmática vai levar ao movimento de água para dentro das células e estas ficam com maior volume o que permite uma melhor dispersão dos cromossomas.

Por último é adicionado fixador, uma solução de metanol e ácido acético. Esta solução para a ação do soluto hipotônico e é essencial para a boa qualidade dos cromossomas na fase de coloração, visto que fortifica a cromatina e extrai proteínas como as histonas. Seguem-se várias lavagens, com o mesmo fixador, para eliminar restos celulares e citoplasmáticos que se encontram na suspensão.(34)

Extensão das lâminas

A partir das amostras cultivadas de sangue periférico e medulas óssea é necessário proceder à extensão das lâminas, que se realiza numa sala específica, com condições muito precisas de temperatura, 22°C, e humidade, 42%, pois são críticas para a obtenção de boas lâminas. O processo consiste na deposição de gotas da suspensão celular obtida anteriormente numa lâmina de vidro. A queda das gotas, de uma determinada altura, na lâmina provoca tensão de modo a romper a membrana celular e permitir o espalhamento dos cromossomas.

Idealmente obtêm-se lâminas com cromossomas suficientes, bem espalhados e sem demasiadas sobreposições. Antes de proceder à sua coloração, avalia-se a qualidade num microscópio.

Após a dispersão, as lâminas são envelhecidas (uma secagem profunda da lâmina) na estufa, durante 1 hora a 90°C, de modo a desidratar os cromossomas e obter uma boa coloração.(34)

Coloração das lâminas – Bandas GTL

Nesta técnica as lâminas são tratadas com tripsina, que provoca hidrólise da parte proteica permitindo que o corante penetre no cromossoma. Depois são coradas com o corante Leishman, o que produz um padrão de bandas claras e escuras que permitem a identificação de cada cromossoma.

Análise citogenética

A análise do cariótipo é feita em microscópio ótico, na objetiva de imersão (100x) e deve incluir a observação de 15 metáfases: 5 metáfases para análise estrutural e 10 metáfases para o registo do total de cromossomas.

Pode ser utilizado o *software* CytoVision para captação dos cromossomas e montagem dos cariogramas.

Para identificar uma anomalia, deve ter-se em consideração o número do cromossoma, o símbolo do braço, o número da região e o número da banda dentro dessa região.

Na figura 14 é possível observar um Cariograma de um doente *BCR-ABL* positivo caracterizado pela presença do cromossoma Philadelphia (Ph), que resulta da fusão de parte do oncogene *ABL* com o gene *BCR*, proveniente da translocação entre os cromossomas 9 e 22 ou t(9;22).

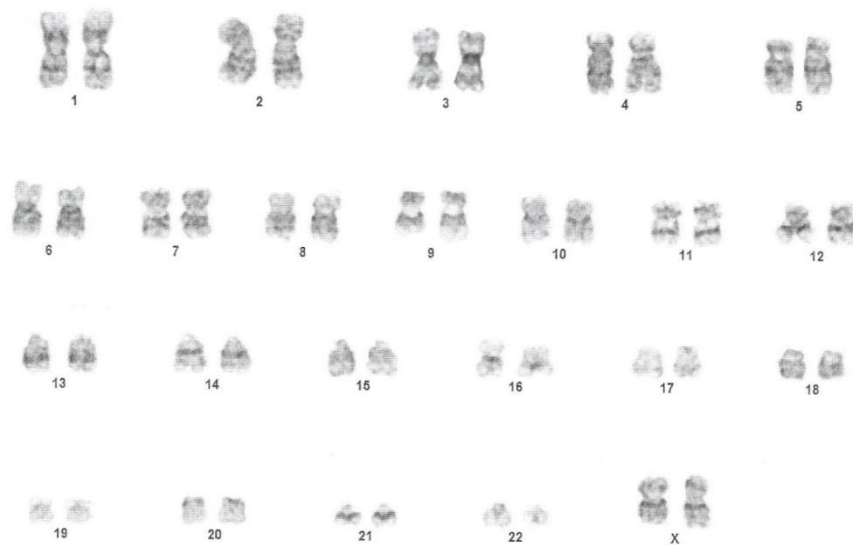


Figura 28 - Cariograma de doente *BCR-ABL* positivo

6.3.2 FISH – Citogenética Molecular

As técnicas de citogenética molecular baseiam-se na marcação de cromossomas ou segmentos cromossômicos por hibridização *in situ*. Uma das mais frequentemente usadas é a técnica de marcação por FISH.(32)

A técnica de FISH pode ser utilizada para analisar uma grande variedade de material biológico, como sangue, medula óssea, gânglios linfáticos, biopsias e lâminas de esfregaço de sangue periférico ou medula óssea. (32)

É uma técnica que tem sido muito utilizada nos últimos anos, uma vez que permite aumentar a exatidão do diagnóstico, ao ultrapassar determinadas limitações da citogenética convencional, nomeadamente a dificuldade de deteção de rearranjos que envolvam fragmentos de DNA com menos de 2 Mb.(32)

A técnica de FISH pode ser realizada em cromossomas em metáfase ou células em interfase. Consiste na hibridação de uma ou mais sondas com as sequências complementares no DNA alvo, presente em preparações cromossômicas metafásicas/interfásicas fixadas em lâminas. Após a hibridação, por complementaridade entre o DNA alvo e a sonda, a região cromossômica de interesse vai permanecer marcada com o fluorocromo, tornando-se possível a análise do sinal de fluorescência no

microscópio de fluorescência. Permite, assim, a localização morfológica de sequências genéticas, com recurso a técnicas de fluorescência. (32)

❖ Sangue periférico/medula óssea

Preparação das lâminas

A partir destas amostras não é necessário realizar uma cultura celular, pois é realizada uma hipotonização direta, seguida de fixação, extensão e envelhecimento das lâminas. São necessárias lâminas de qualidade para que a técnica de FISH seja bem-sucedida. (34)

Desnaturação da sonda e cromossomas

É feito o tratamento da lâmina com solução de SSC (tampão salino de cloreto de sódio e citrato de sódio) e, depois de seca, é aplicada com micropipeta a sonda na zona de hibridação, sendo coberta com uma lamela. A lâmina é colocada num equipamento, o Hybrite, a 80°C. A desnaturação ocorre devido à solução de SSC e à temperatura elevada. (34)

Hibridação da sonda

Procede-se a uma incubação *overnight*, a 37°C, em câmara húmida.

Uma vez que a sonda, assim como os cromossomas, são constituídos por DNA de cadeia dupla é necessário proceder à desnaturação do DNA, por forma a que uma cadeia simples do DNA alvo e a cadeia simples da sonda complementar à sequência de genes de DNA que se pretende pesquisar hibridizem (“*annealing*” da sonda).

Lavagem da lâmina

Depois de retirar, com cuidado, a lamela, segue-se a lavagem do excesso de sonda não ligada ao material genético. É utilizada uma solução de lavagem de SSC, a 73°C, de modo a não remover a sonda ligada aos cromossomas. (34)

Contraste dos cromossomas

Depois da lâmina seca é aplicado 20µl de meio de montagem com DAPI, ou 4',6'-diamino-2-fenil-indol, que é um fluorocromo que se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-timina e que confere fluorescência caso haja hibridação da sonda, que tem o DAPI ligado, à sequência complementar de DNA. O DAPI proporciona um contraste azul que permite uma boa visualização da cor da hibridação da sonda. (34)

Análise microscópica

As lâminas são observadas num microscópio de fluorescência, no qual é possível detetar o sinal da fluorescência emitida pelo fluorocromo ligado à sonda. São observados 100 núcleos e captadas imagens das amostras.

Comparativamente à análise do cariótipo, o FISH apresenta algumas vantagens, como o maior poder de resolução, pois permite a deteção de anomalias cromossómicas, como duplicações e deleções, não detetáveis por citogenética convencional. É uma técnica mais simples e rápida, visto que pode ser realizada diretamente em núcleos interfásicos sem necessidade de estabelecer culturas, permitindo assim obter resultados muito mais rapidamente, em cerca de 1-2 dias, quando a análise do cariótipo pode demorar até duas semanas.(32,33)

Tem como desvantagens ser uma técnica bastante dispendiosa e podem, por vezes, ocorrer ligações inespecíficas ou a hibridação pode ser inexistente. É uma técnica direcionada, ou seja, não fornece uma análise alargada do genoma.(33)

A figura 15 apresenta uma imagem da técnica de FISH no caso de um doente *BCR-ABL* positivo, onde é possível observar as diferentes sondas que marcam os diferentes cromossomas. A análise de FISH foi realizada em metáfase usando um fluorocromo verde para o gene *BCR* no cromossoma 9 e um fluorocromo vermelho para o gene *ABL* no cromossoma 22. Os sinais verde e vermelho separados indicam a localização do gene *BCR* no cromossoma 9 normal e o gene *ABL* no cromossoma 22 normal, respetivamente. A cor amarela corresponde à fusão dos dois sinais e à presença da t(9;22) que leva à expressão do gene de fusão *BCR/ABL1*.

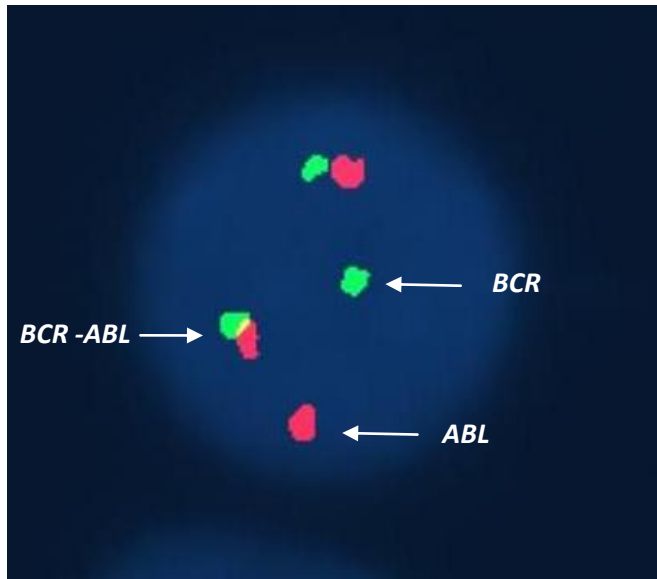


Figura 29 - FISH num doente *BCR-ABL* positivo

Verde: gene *BCR* no cromossoma 9; Vermelho: gene *ABL* no cromossoma 22; Amarelo: gene de fusão *BCR/ABL1*

A tabela 9 faz um resumo das principais alterações genéticas presentes na LLA, a nível cromossómico e, também, das características imunofenóticas dos blastos, relacionando-as com o prognóstico esperado

Tabela 20 - Principais Alterações Citogenéticas e seu prognóstico na LLA [adaptado de (4)]

Citogenética	Características	Prognóstico	% de sobrevivência crianças	% de sobrevivência adultos
Hiperdiploidia (> 50 cromossomas)	Fenótipo de precursores B Leucocitose baixa CD19+ CD10+ CD45-	Favorável em crianças de 1-9 anos	80-90 a 5 anos	30-50 a 5 anos
Hipodiploidia (<44 cromossomas)	Fenótipo de precursores B Leucocitose elevada CD19+ CD10+	Mau prognóstico	30-50 a 3 anos	10-20 a 3 anos
t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6-RUNX1</i>	Fenótipo de precursores B CD13± CD33± CD34+ CD19+ CD10+ Pseudodiploidia	Favorável em crianças de 1-9 anos	90-95 a 5 anos	Desconhecido
t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3-PBX1</i>	Fenótipo pré-B CD10± CD20- CD34- Pseudodiploidia Leucocitose elevada Leucocitose do SNC Mais frequente em africanos	Depende do tratamento	82-90 a 5 anos	20-40 a 3 anos
t(9;22)(q34;q11): <i>BCR-ABL1</i>	Fenótipo de precursores B Leucocitose elevada Mais comum em adultos Frequentemente marcadores mieloides: CD13 E CD33	Melhor prognóstico se o tratamento com inibidores de tirosina cinase for iniciado cedo	80-90 a 3 anos	60 a 1 ano
t(4;11)(q21;q23) fusão do <i>MLL-AF4</i>	Fenótipo de precursores B CD10± CD15± CD33± CD65± Hiperleucocitose Leucemia do SNC Crianças e adultos	Mau prognóstico	32-40 a 5 anos	10-20 a 3 anos
t(8;14)(q24;q23.3)	Fenótipo B Morfologia L3 Sexo masculino Doença extramedular	Bom prognóstico com quimioterapia intensiva com metotrexato, citarabina e ciclofosfamida	75-85 a 5 anos	50-55 a 4 anos
Mutação <i>NOTCH1</i>	Fenótipo T	Bom prognóstico	90 a 5 anos	50 a 4 anos
Sobreexpressão <i>HOX11</i>	Fenótipo T CD10±	Bom prognóstico	90 a 5 anos	80 a 3 anos
Amplificação intracromossomal do cromossoma 21	Fenótipo de precursores B Leucopenia	Necessário tratamento intensivo para evitar mau prognóstico	30 a 5 anos	

O apoio prestado pela citogenética à área clínica, nomeadamente à oncologia, é relevante, uma vez que permite detetar as anomalias cromossómicas presentes nas células malignas, auxiliando no diagnóstico, no aconselhamento genético, na escolha da terapia a aplicar e no prognóstico.(4)

6.4 Imagiologia

Numa situação de suspeita de LLA, é necessário pedir uma radiografia e uma TAC (tomografia axial computadorizada) ao tórax para avaliar o crescimento do timo, gânglios, massa mediastínica e possível derrame pleural e principalmente para localizar gânglios linfáticos retroperitoneais. (1,4)

O alargamento do mediastino é característico das leucemias de linhagem T.

Cerca de metade dos casos, em crianças, apresentam reação periosteal, osteólise, osteoesclerose e osteopenia principalmente nos doentes com contagens elevadas de leucócitos. (1,4)

Uma radiografia à coluna pode revelar colapso das vértebras.

Uma ultrassonografia é útil para valorizar uma hepatoesplenomegalia, que não se deteta na clínica. Nos rapazes, a realização de uma ecografia testicular pode mostrar envolvimento gonadal da leucemia. (1,4)

Um ecocardiograma efetuado no início da terapêutica é fundamental para avaliar a função cardíaca, na medida em que as antraciclina, grupo de quimioterápicos usados no tratamento das leucemias, têm toxicidade cardíaca. (1,4)

6.5 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve realizar-se relativamente a doenças como a púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) e a anemia aplásica.

O diagnóstico diferencial é particularmente importante para distinguir a LLA de leucemias mieloides agudas (LMA) e linfocitoses reacionais. Os blastos de alguns casos de LLA apresentam grânulos azurófilos, enquanto os blastos de alguns casos de LMA não apresentam grânulos, nem outros sinais de diferenciação mielóide ao microscópio

ótico, por isso são necessários outros testes para confirmar qual o tipo de leucemia aguda.(20)

A PTI é a doença benigna mais comumente associada a leucemias, mas uma hemorragia severa na pele numa criança, sem outros sintomas exceto trombocitopenia grave, e uma lâmina de sangue periférico sem presença de blastos circulantes, permitem, por norma, fazer a distinção de uma PTI relativamente a uma leucemia. (1)

Pancitopenia devido a anemia aplásica é muito difícil de distinguir de uma forma de leucemia - a leucemia aleucémica sem recorrer a um mielograma.

Também é importante considerar uma manifestação de eosinofilia que pode anteceder a LLA em alguns meses. (3,7)

A presença de uma anemia ligeira, linfocitose e presença de linfócitos ativados devido a infeção viral aguda, por exemplo a CMV, pode criar alguma incerteza, mas a observação da morfologia dos leucócitos deve ser o suficiente, sem ser necessário recorrer a um mielograma. (1)

A infeção por *Bordetella pertussis* apresenta uma linfocitose significativa, em alguns casos pode ser de $50 \times 10^9/L$, e são visualizados linfócitos atípicos no sangue periférico. (3,7)

Alguns dos sintomas descritos são dores ósseas e artralguas e, ocasionalmente, artrites que podem ser semelhantes a artrite juvenil em alguns doentes. É, portanto, imperativo a realização de um mielograma antes de iniciar uma terapêutica com corticosteroides e metotrexato. (3,7)

Principalmente nas crianças, é importante fazer a diferenciação da LLA dos tumores próprios da idade que afetam a medula óssea, como o neuroblastoma, o rabdomiosarcoma e o retinoblastoma.(3,7)

A tabela 10 faz um resumo do procedimento clínico a realizar para o diagnóstico da LLA.

Tabela 21 - Resumo do procedimento clínico para o diagnóstico de LLA [adaptado de (1)]

Procedimento Clínico

Avaliação clínica

História clínica

Exame objetivo com avaliação do SNC

Pedidos laboratoriais

Hemograma e morfologia sanguínea

Aspirado medular: mielograma e citometria de fluxo

Screen de coagulação

Perfil bioquímico: LDH, ácido úrico

Hemoculturas

Teste de gravidez

Serologia de HIV, HBV, HCV

Citogenética: cariótipo, FISH

Biologia Molecular

Estudo do LCR se há evidência de envolvimento do SNC

Imagiologia

Raio-X

TAC do pescoço, tórax, pélvis

TAC da cabeça se evidencia de envolvimento do SNC

7. Tratamento

Doentes diagnosticados com LLA devem ser tratados em centros especializados.

Embora os fatores clínicos tenham um papel importante na escolha da terapêutica, as alterações citogenéticas têm um significado preponderante na determinação do risco, como se pode ver na tabela 9 .

7.1 Terapêutica de Suporte

7.1.1 Complicações Metabólicas

A hiperuricemia pode ser tratada com alopurinol, pois este diminui o anabolismo e o catabolismo da mercaptopurinas. (1)

A hiperfosfatemia pode ser tratada recorrendo a agentes quelantes. (1)

7.1.2 Hiperleucocitose

Quando a contagem de glóbulos brancos é superior a $100 \times 10^9/L$ pode ser necessário recorrer a uma leucoferese, principalmente em crianças muito pequenas.

Em casos de LLA-B, uma terapia de dose baixa com glucocorticoides, vincristina e ciclofosfamida tem demonstrado uma melhoria na hiperleucocitose. (1)

7.1.3 Controlo de Infecção

Fazer uma terapêutica profilática contra uma pneumonia por *Pneumocystis* com trimetoprim-sulfametoxazol durante 2 a 3 dias por semana. Esta profilaxia começa 2 semanas antes da fase de indução e continua até 6 semanas após o fim do tratamento total por quimioterapia.

Nos doentes que apresentem febre ou neutropenia são administrados antibióticos de largo espectro. (1)

7.2 Quimioterapia

O objetivo deste tratamento é alcançar uma remissão completa, em que não há evidência de células leucémicas no sangue e na medula óssea.

O tratamento varia conforme os protocolos, mas, em todos eles, existe uma fase de indução, consolidação, fase dirigida ao sistema nervoso central e manutenção. (1,4,6,35)

7.2.1 Indução

O objetivo da fase de indução é erradicar mais de 99% das células leucémicas da medula óssea, de modo a prevenir a sua disseminação.

A hospitalização pode ser necessária para prevenção e tratamento de infecção e administração de componentes sanguíneos. (1,4,6)

A maioria dos esquemas de indução inclui uma combinação de vincristina, antraciclina, corticoides, asparaginase e ciclofosfamida. Podem também incluir outros fármacos como os antimetabolitos, metotrexato e citarabina. (1,4,6)

Uma terapêutica inicial com corticosteroides, antes do início da quimioterapia, pode ser importante para a maioria dos doentes porque melhora a resposta, aumentando assim o *status* do doente pre-indução. (1,4,6)

A asparaginase é um fármaco que diminui os níveis de asparagina, aminoácido essencial para o crescimento dos linfoblastos e, assim, impede as células leucémicas de crescer. Atualmente, existe uma asparaginase pegilada, que tem o potencial de originar menos reações de hipersensibilidade e, portanto, menos doentes necessitam de tratamento de 2ª linha. Outra característica importante desta formulação é a sobrevida mais longa que permite espaçar as administrações, permanece no corpo mais tempo e, desta forma, os doentes recebem um número menor de doses.(4)

7.2.2 Tratamento e profilaxia do SNC

O objetivo do tratamento e profilaxia do SNC é prevenir a recaída de leucemia no SNC, pois é difícil, mesmo com quimioterapia sistémica, alcançar células leucémicas devido à barreira hemato-encefálica. Será necessário uma terapêutica dirigida.(6)

7.2.3 Consolidação

O objetivo desta fase é erradicar células leucémicas residuais, resistentes ao tratamento de indução, de forma a diminuir o risco de recaída.

Normalmente são usadas doses elevadas de agentes não administrados na fase de indução ou pode ser feita uma readministração do esquema de indução.

Esta fase pode demorar 3 a 4 meses até ser atingida uma remissão completa. (1,4,6,35)

7.2.4 Manutenção

Os doentes com LLA necessitam de tratamentos de manutenção muito prolongados, 2 anos em adultos e 2 a 3 anos em crianças.

O objetivo desta fase é prevenir uma recaída após as duas primeiras fases. Normalmente, os esquemas usados utilizam uma dose diária de 6-mercaptopurina e uma dose semanal de metotrexato, ao qual é adicionado, se necessário, vincristina e corticosteroides. (1,4,6,35)

7.2.5 Transplante hematopoiético

Têm-se verificado, nos últimos anos, avanços significativos no tratamento das leucemias na criança, o que faz com que, na maioria das vezes, não haja indicação para transplante de medula óssea. É sabido que os transplantes não evitam a recidiva da doença e não são isentos de complicações. O transplante fica reservado para certos tipos de leucemias de risco muito alto e para uma grande parte das recaídas. (1,4,6,35)

8. Prognóstico

Vários fatores relacionados especificamente com a doença e com o doente podem ter um significado no prognóstico, nomeadamente a idade, a contagem de glóbulos brancos, as alterações detetadas por citogenética e por imunofenotipagem e a resposta à terapia de indução.(6)

Atualmente, um dos fatores de prognóstico mais importante é a resposta precoce ao tratamento, quantificado pela doença residual mínima. Doença residual mínima define-se como o menor número de células patológicas detetável por citometria de fluxo e/ou por métodos de PCR. Esta resposta vai refletir o efeito da quimioterapia sobre as características genéticas dos linfoblastos. (6)

Doentes com idade inferior a um ano têm, claramente, um pior prognóstico que o resto dos indivíduos. Como é possível ver na tabela 9 existem alterações cromossômicas que apresentam um prognóstico pior, como a t(9;22) e a t(4;11). A introdução de inibidores da tirosina cinase, como o imatinib, melhoraram significativamente o prognóstico dos doentes com LLA Ph+, t(9;22). Doentes que nas primeiras 4 a 6 semanas, no início da terapêutica de indução, não apresentam uma remissão completa, têm uma alta taxa de recaída e uma percentagem de sobrevivência reduzida.(3)

A LLA é uma doença tratável. Atualmente, graças aos tratamentos disponíveis, é possível alcançar uma taxa de cura em 90% das crianças. O tratamento é de aproximadamente de dois anos. O tratamento é efetuado de acordo com o grupo de risco.(35)

Tendo em conta as características de cada doente e os seus fatores de prognóstico é possível fazer uma divisão por grupos de risco, como é possível ver na tabela 11.

Tabela 22 - Grupos de risco na LLA [adaptado de (1,6,35)]

Risco Baixo	LLA-B, idade entre 1 a 9 anos, contagem leucocitária inferior a $50 \times 10^9/L$
Risco Médio	Citogenética: <i>TEL-AML1</i> ou hiperdiploidia (trissomias 4, 10, 17) As mesmas características do grupo de baixo risco, mas com outras alterações citogenéticas
Risco alto	O resto dos doentes com LLA-B e também com LLA-T
Risco muito alto	Constituem este grupo um número reduzido de doentes, principalmente aqueles que não têm uma boa resposta à quimioterapia e não alcançam uma remissão completa na fase de indução, mantendo taxas elevadas de doença residual mínima durante o tratamento
Lactentes	Crianças com menos de um ano têm sempre um pior prognóstico.

O transplante hematopoiético tem demonstrado ser uma boa alternativa à terapêutica convencional nos lactentes, sobretudo naqueles que apresentam um risco muito elevado, com rearranjos *MLL* e com hiperleucocitose.

9. Conclusão e Perspetivas

A LLA, apesar de ser a neoplasia mais frequente da infância, é uma doença rara e a taxa de cura ainda não atinge os 100%. Assim, é crucial o registo dos doentes em grupos cooperativos internacionais e multicêntricos. É ainda importante a sua participação em ensaios clínicos, no sentido de melhorar a classificação dos doentes por grupos de risco e permitir propostas de novas abordagens terapêuticas que procurem otimizar o prognóstico dos doentes.

A complementação das várias aproximações ao diagnóstico conduz a uma compreensão aprofundada das LLAs e à sua divisão em subtipos, essencial à definição da terapêutica.

Os avanços na compreensão da LLA asseguram o rigor do diagnóstico, do qual depende a eficácia terapêutica, ou seja, a moderna estratificação de risco permite a terapêutica orientada para os subgrupos, o que é importante porque estão a surgir medicamentos direcionados para um mecanismo ou via de sinalização específicos.

As investigações em curso, em vários centros especializados, permitirão definir novos subgrupos de LLA e obter significativos avanços na sua terapêutica e no seu prognóstico.

10. Bibliografía

1. Hoffbrand, A Victor; Higgs, Douglas; Keeling, David; Mehta A. Postgraduate Haematology. Seventh. Blackwell W, editor. 2016.
2. Silva Ribeiro I. Hematología da Prática Clínica à Teoria. LIDEL; 2015.
3. Atienza AL, Pediátrica SDH, Universitario H, Jesús N. Leucemia linfoblástica aguda. (2):453–62.
4. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi M, Press OW, Burns LJ, et al. Williams Manual of Hematology. Eighth. McGraw-Hill; 2017. 656 p.
5. Hoffbrand, A.V; Moss PA. Essencial Haematology. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011.
6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2014.
7. Sánchez MAO, Ortega MLO. Leucemia linfoblástica aguda. Med Interna México. 2007;23(1):26–33.
8. Kearney L, Castro DG De, Yeung J, Procter J, Horsley SW, Minenori EI, et al. Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in down syndrome acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2009;113(3):646–8.
9. Mullighan CG, Morita K, Suzuki K, Maeda S, Matsuo A, Mitsuda Y, et al. Molecular genetics of BCP-ALL. J Clin Invest. 2012;122(7):3407–15.
10. Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J. Acute lymphoblastic leukemia: a genomic perspective. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 2017;74(1):13–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhix.2016.07.007>
11. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:389–96.
12. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2005;23(26):6306–15.
13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391–406.
14. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(23):9414–8.
15. Nakase K, Ishimaru F, Avitahl N, Dansako H, Matsuo K, Fujii K, et al. Dominant

- negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2000;60(15):4062–5.
16. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: From thymocyte to lymphoblast. *Leukemia.* 2006;20(9):1496–510.
 17. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6(1).
 18. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
 19. Mary A. Williamson LMS. Wallach's Interpretation of Diagnostic Testes. ninth. Wolter Kluwer Health; 2011.
 20. Bain B. Células Sanguíneas, Um Guia Prático. 5^a. artmed; 2016.
 21. ABCAM. Introduction to flow cytometry Available from: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
 22. Analysis D. Principles of Flow cytometry Data Analysis (With Diagram). [cited 2020 May 2]. p. 1–18. Available from: <http://www.biologydiscussion.com/biochemistry/flowcytometry/principles-of-flowcytometry-with-diagram-2/12973>
 23. Barnett D, Walker B, Landay A, Denny TN. CD4 immunophenotyping in HIV infection. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(SUPPL. 11).
 24. Wang X, Lebrech H. Immunophenotyping: Application to Safety Assessment. *Toxicol Pathol.* 2017;45(7):1004–11.
 25. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2018;94(1):82–93.
 26. Wood BL. Flow cytometry in the diagnosis and monitoring of acute leukemia in children. *J Hematop.* 2015;8(3):191–9.
 27. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908–75.
 28. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human

- ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(January):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20686>
29. Smeeta Gajendra. *Flow Cytometry Leukemia Clinics in Oncology-Leukemia*. 2016;1:1–5. Available from: <http://clinicsinoncology.com/>
 30. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN : an international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*. 2016;139. Available from: <https://www.karger.com/Book/Home/271658>
 31. Liehr T. “Classical cytogenetics” is not equal to “banding cytogenetics.” *Mol Cytogenet*. 2017;10(1):9–11.
 32. Waters JJ, Barlow AL GC. *Demystified FISH*. *J Clin Pathol*. 1998;51:1–3.
 33. Ross F SJ. *FISH Scoring In Oncology*. *Prof Stand Comm Cytogenet Clin* [Internet]. 2003;(December):1–13. Available from: <http://cytogenetics.org.uk>
 34. SYNLABHEALTH. *Protocolos SYNLAB Genética*. 2016.
 35. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children’s Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007;109(3):926–35.

