



Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

Hélio Marciano Ramos Moreira

Relatório de Estágio para obtenção de Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Dr.^a Andreia Sofia dos Reis Monteiro

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

setembro de 2020

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Andreia Monteiro, agradeço pela orientação e pelo tempo investido e por tornar possível a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Cândida Tomaz agradeço pela acessibilidade, atenção e disponibilidade.

À Dr.^a Patrícia Amantegui, um muito obrigado pela disponibilidade, simpatia e acessibilidade demonstrada.

Ao Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, em especial ao Serviço de Patologia Clínica, onde o estágio e o projeto foram desenvolvidos. À Dr.^a Conceição Faria por ter permitido a realização deste estágio e pela simpatia, disponibilidade e conhecimento fornecido. A todos os colaboradores pela paciência, simpatia, disponibilidade e por tudo que me ensinaram no decorrer do estágio.

À Universidade da Beira Interior, onde realizei o meu Mestrado.

À minha família que dedico tudo o que consegui neste meu percurso académico e por ser a minha fonte primordial de confiança e alegria.

Aos meus amigos, pela amizade e por muitos momentos memoráveis.

Resumo

Os líquidos serosos existem em pequenos volumes nos espaços entre as respectivas cavidades serosas e possuem uma composição semelhante ao plasma, mas com uma baixa concentração de proteínas e células em suspensão, sendo essencialmente leucócitos e células mesoteliais. O derrame dos líquidos serosos é a sua acumulação anormal, resultado de um desequilíbrio entre a produção e a absorção desse líquido. No caso de tumores, ocorre a infiltração de células tumorais no espaço seroso através da disseminação pelos vasos sanguíneos, direta ou linfática, e posteriormente, o crescimento do tumor no espaço seroso pode bloquear a drenagem linfática, resultando na acumulação de líquido seroso. A citopatologia, auxiliada pela imunocitoquímica, é considerada o “*gold standard*” na detecção de células tumorais em amostras de derrames de líquidos serosos. No entanto, apesar das vantagens, esta técnica é relativamente morosa e dependente da interpretação do observador. Por outro lado, apesar da citometria de fluxo ser tradicionalmente utilizada no diagnóstico de tumores hematológicos, esta pode ser aplicada na análise de qualquer líquido biológico para o estudo de tumores, especialmente os líquidos serosos, visto que as células são mantidas em suspensão. Adicionalmente, o CD326 emergiu como o melhor marcador para a pesquisa de células epiteliais, incluindo células tumorais originárias de células epiteliais. Assim, surge o interesse em estudar os líquidos serosos para a pesquisa de células tumorais CD326⁺ por citometria de fluxo, para complementar a avaliação citopatológica, devido à sua facilidade de utilização e ao tempo de resposta rápido. Neste projeto, foi realizado um estudo retrospectivo, em que foram selecionadas 35 amostras enviadas ao serviço de patologia clínica, entre maio de 2016 e agosto de 2019. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os resultados comparados com os exames da morfologia citológica e estudos imunohistoquímicos descritos no relatório anatomopatológico. Considerando os resultados da anatomia patológica como *gold standard*, a citometria de fluxo demonstrou uma elevada sensibilidade (85,71%) e especificidade (94,74%) para a pesquisa de células epiteliais em derrames de líquidos serosos. Das 35 amostras analisadas, 30 (85,71%) tiveram resultados concordantes entre os dois métodos de análise. Assim, é possível inferir que a citometria de fluxo, bem como o painel de anticorpos e a estratégia de análise para a detecção de células epiteliais em líquidos serosos utilizados neste estudo, fornecem resultados confiáveis, considerando os valores de sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave

CD326; Citometria de Fluxo; líquido seroso; tumor;

Abstract

Serous fluids exist in small volumes in the spaces between the respective serous cavities and have a composition similar to plasma, but with a low concentration of proteins and the cells in suspension are essentially leukocytes and mesothelial cells. The serous fluids effusion is the abnormal accumulation of fluids, the result of an imbalance between its production and absorption. In cases of malignancy, tumor cells infiltrate the serous space through direct or lymphatic dissemination through blood vessels, and thereafter, the growth of the tumor in the serous space can block lymphatic drainage, resulting in the accumulation of serous fluid. Cytopathology, aided by immunocytochemistry, is considered the “gold standard” in the detection of malignant cells in samples of serous fluid effusions. However, despite the advantages, this technique is relatively time consuming and dependent on the observer's interpretation. On the other hand, although flow cytometry is traditionally used in the diagnosis of hematological tumors, it can be applied in the analysis of any biological fluid for the study of malignancies, especially in serous fluids, since the cells are kept in suspension. Additionally, CD326 has emerged as the best marker for epithelial cell research, including malignant cells originating from epithelial cells. Thus, there is an interest in studying serous fluids through flow cytometry for the investigation of CD326 positive malignant cells to assist in cytopathological evaluation, due to their ease of use and rapid turnaround time. In this project, a retrospective study was carried out, in which 35 samples received at the Clinical Pathology Laboratory of *Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira* were selected between May 2016 and August 2019. The samples were analyzed by flow cytometry and the results were compared with cytological morphology exams and immunohistochemical studies described in the anatomic pathology reports. Considering the results of anatomic pathology as a gold standard, flow cytometry demonstrated high sensitivity (85.71%) and specificity (94.74%) for the investigation of malignant epithelial cells in effusions of serous liquids. Of the 35 samples analyzed, 30 (85.71%) had concordant results between the two methods of analysis. Thus, it is possible to infer that flow cytometry, as well as the panel of antibodies and the gating strategy for the investigation of malignant epithelial cells in serous liquids used in this study, provides reliable results, considering the values of sensitivity and specificity.

Keywords

CD326; Flow cytometry; serous fluid; tumour;

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e motivação.....	1
1.2 Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira.....	1
1.3 Objetivo Geral	1
Capítulo 1 – Projeto de Investigação	3
1. Contextualização teórica.....	3
1.1. Líquidos serosos	3
1.2. Derrame dos líquidos serosos	5
1.3. Diagnóstico de derrames carcinomatosos	6
1.4. Citometria de fluxo.....	7
1.4.1. Fluorescência na citometria de fluxo	9
1.5. Molécula de adesão epitelial	10
2. Objetivo do projeto de investigação.....	12
3. Materiais e métodos	13
3.1. Receção e manuseamento das amostras	13
3.2. Processamento da amostra para citometria de fluxo	13
3.3. Anatomia patológica	15
4. Resultados	15
5. Discussão	17
6. Conclusão e perspetivas futuras.....	21
Capítulo 2 – Relatório de Estágio	23
1. Laboratório de Patologia Clínica.....	23
1.1. Áreas Laboratoriais	23
1.2. Fase pré-analítica	23
1.3. Fase analítica	25
1.4. Fase pós-analítica	26
2. Secção de Imunoquímica	27
2.1. Imunoturbidimetria	27
2.2. Nefelometria.....	28
2.3. Electroquimioluminescência	28
2.4. Quimioluminescência	28
2.5. Potenciometria.....	29
2.6. Colorimetria.....	29
2.7. Parâmetros analisados	29
2.7.1. Perfil hepático.....	29

2.7.2.	Perfil pancreático	30
2.7.3.	Perfil lipídico.....	30
2.7.4.	Perfil Renal	30
2.7.5.	Metabolismo de ferro	31
2.7.6.	Proteínas séricas	31
2.7.7.	Marcadores cardíacos	31
2.7.8.	Marcadores tumorais.....	32
2.7.9.	Perfil endócrino	32
2.7.10.	Fármacos	33
2.7.11.	Drogas de abuso.....	33
2.7.12.	Serologia infecciosa viral	33
2.7.13.	Perfil imunológico	34
2.7.14.	Ionograma	35
2.7.15.	Serologia infecciosa bacteriana	35
2.8.	Imunoensaios fluoroenzimáticos	35
2.9.	Reação em cadeia da polimerase.....	36
2.10.	Electroforese, Imunofixação e focagem isoelectrica.....	37
2.11.	Imunofluorescência indireta.....	39
2.12.	Testes rápidos	40
2.13.	Urianálise	40
3.	Secção de Microbiologia	41
3.1.	Meios de cultura	41
3.2.	Observação ao microscópio e colorações.....	44
3.2.1.	Coloração de Gram	44
3.2.2.	Coloração de Ziehl-Neelsen	44
3.3.	Urina.....	45
3.4.	Fezes	45
3.5.	Hemoculturas.....	46
3.6.	Soro.....	47
3.7.	Aparelho respiratório	47
3.7.1.	Análise de micobactérias	48
3.8.	Produtos em zaragatoa	49
3.9.	Pús.....	50
3.10.	Esperma	50
3.11.	Outros líquidos biológicos	50
3.12.	Biópsias.....	50
3.13.	Unhas, cabelos, pelos e raspados de pele	51

3.14.	Deteção de genes de resistência a antibióticos	51
3.14.1.	Deteção de <i>M. tuberculosis</i> e Resistência à rifampicina	51
3.14.2.	Deteção de Gram-negativos não suscetíveis a carbapenemos	51
3.14.3.	Deteção de <i>S. aureus</i> resistente à metilina.....	51
3.15.	Deteção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	52
3.16.	Testes de identificação e de sensibilidade aos antibióticos.....	52
3.17.	Testes automáticos.....	53
3.18.	Principais microrganismos identificados	53
3.18.1.	Cocos Gram positivos.....	54
3.18.2.	Bacilos Gram positivos.....	54
3.18.3.	Cocos Gram negativos	55
3.18.4.	Bacilos Gram negativos	55
3.18.5.	Micobactérias.....	55
3.18.6.	Fungos	55
4.	Secção de Hematologia.....	56
4.1.	Hemograma	56
4.2.	Análise microscópica.....	57
4.2.1	Esfregaço sanguíneo.....	57
4.2.2.	Coloração de May-Grunwald/Giemsa.....	58
4.2.3.	Coloração de Wright Giemsa	58
4.2.4.	Coloração de Perls.....	58
4.2.5.	Coloração de Fosfatase Alcalina	58
4.2.6.	Coloração de Peroxidase.....	59
4.3.	Hemoglobinopatias.....	59
4.3.1.	Teste de anemia falciforme.....	59
4.3.2.	Hemoglobina A2, fetal e glicada.....	59
4.4.	Velocidade de sedimentação.....	60
4.5.	Coagulação.....	60
4.5.1.	Plaquetas	60
4.5.2.	Cascata de coagulação	61
4.6.	Trombofilia	62
4.7.	BCR-ABL.....	62
4.8.	Citometria de fluxo.....	63
5.	Conclusão e balanço final da aprendizagem.....	64
6.	Referências Bibliográficas	65

Lista de Figuras

Figura 1: Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (adaptado de 5).	1
Figura 2: Representação esquemática da pleura (adaptado de 9).	3
Figura 3: Representação esquemática do pericárdio e das células mesoteliais (adaptado de 12).	4
Figura 4: Representação gráfica do peritónio (adaptado de 16).	5
Figura 5: Representação gráfica do <i>forward scatter</i> e <i>side scatter</i> (adaptado de 35).	8
Figura 6: Resumo dos quatro componentes necessários na CF (adaptado de 35).	8
Figura 7: Processo de fluorescência (adaptado de 35).	9
Figura 8: Espectro de comprimento de onda de excitação e emissão do FITC (adaptado de 36).	10
Figura 9: Diagrama esquemático da totalidade da estrutura da proteína EpCAM e da estrutura cristalina do domínio extracelular (adaptado de 40).	11
Figura 10: Estratégia de análise de CF, demonstrada em dois exemplos de amostras de líquido ascítico.....	14
Figura 11: Distribuição das amostras estudadas por faixas etárias.	15
Figura 12: Esquema do processo pré-analítico do SPC do CHUCB (adaptado de 54).	24
Figura 13: Esquema da fase analítica do SPC do CHUCB (adaptado de 57).	25
Figura 14: Esquema da fase pós-analítica do SPC do CHUCB (adaptado de 63).	26
Figura 15: Ilustração dos componentes básicos de um imunoensaio (adaptado de 64).	27
Figura 16: Fase final do processo de imunoensaio em sanduíche (adaptado de 93).	36
Figura 17: Curvas de crescimento do alvo para uma série de diluições da amostra (adaptado de 99).	37
Figura 18: (A) Perfil eletroforético de proteinogramas de 29 amostras (adaptado de 102).	38
Figura 19: Algoritmos utilizados para escolher o procedimento e o gel de imunofixação.	38
Figura 20: Exemplos de resultados positivo e negativo do teste de imunofluorescência indireta para as <i>Coxiella burnetii</i> e <i>Rickettsia conorii</i> em amostras de soro (adaptado de 114, 115).	39
Figura 21: As possíveis interpretações para a deteção qualitativa de drogas na urina (adaptado de 116).	40
Figura 22: Exemplos de meios utilizados no SPC (adaptado de 122).	43
Figura 23: Exemplo de bacilos Gram-positivos (A) e Gram-negativos (B) (adaptado de 120)..	44
Figura 24: Esquema do método de Coulter (adaptado de 147).	57
Figura 25: Método de esfregaço sanguíneo (adaptado de 148).	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Expressão do CD326 em carcinomas.....	12
Tabela 2: Painel de anticorpos e fluorocromos utilizados para marcar as células.	13
Tabela 3: Resumo das amostras e dos resultados da anatomia patológica e da CF.	16
Tabela 4: Comparação entre os resultados da CF com a AP.....	17
Tabela 5: Processo pré-analítico das principais amostras biológicas analisadas no SPC.	24
Tabela 6: Perfil hepático.	29
Tabela 7: Perfil pancreático.....	30
Tabela 8: Perfil lipídico.....	30
Tabela 9: Perfil renal.	30
Tabela 10: Perfil do metabolismo do ferro.....	31
Tabela 11: Perfil das proteínas séricas.	31
Tabela 12: Perfil dos marcadores cardíacos.	31
Tabela 13: Perfil dos marcadores tumorais.	32
Tabela 14: Perfil endócrino.	32
Tabela 15: Perfil dos fármacos.....	33
Tabela 16: Perfil das drogas de abuso.	33
Tabela 17: Serologia infecciosa vírica.	34
Tabela 18: Perfil imunológico.....	34
Tabela 19: Ionograma.....	35
Tabela 20: Serologia infecciosa bacteriana.	35
Tabela 21: Meios de cultura utilizados no SPC do CHUCB.....	41
Tabela 22: Testes de função hemostática.	62

Lista de Acrónimos

ABL1	Gene Abelson
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AP	Anatomia Patológica
APC	Alofocianina
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
CF	Citometria de Fluxo
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
EpCAM	Molécula de Adesão Celular Epitelial
EQAS	<i>External Quality Assurance Services</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FvW	Fator <i>von Willebrand</i>
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
Hb	Hemoglobina
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgE	Imunoglobulina E
IGRA	Ensaio de Libertação de Interferão-gama
K3-EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
LBA	Lavados Broqueoalveolares
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
NEQAS	<i>National External Quality Assessment</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDs	Fotodíodos
PE	Fitoeritrina
PETINIA	Ensaio Imunoturbidimétrico de Inibição Otimizado pela Utilização de Micropartículas
PMTs	Fotomultiplicadores
pNA	Para-nitroalínina
PQ	Padrão de Quantificação
RLUs	Unidades de Luz Relativa
RPR	<i>Rapid Plasma Reagin</i>
SEMIC	<i>Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología</i>
SEQC	Sociedade Espanhola de Química Clínica
SPC	Serviço de Patologia Clínica
SSC	<i>Side Scatter</i>
TF	Fator Tecidual

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

TP	Tempo de Protrombina
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antibióticos
TT	Tempo de Trombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VS	Velocidade de Sedimentação

1. Introdução

1.1 Enquadramento e motivação

O presente relatório surge no âmbito do Estágio Curricular, correspondente ao programa do 2º ano de Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências na Universidade da Beira Interior. Este trabalho possui duas partes; o Projeto de Investigação, intitulado “Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos” e o Relatório de Estágio desenvolvido no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira. Com este estágio, surge uma oportunidade de trabalhar com várias técnicas analíticas utilizadas em diferentes áreas de um laboratório de patologia clínica, sendo assim, uma mais valia essencial para o meu percurso profissional e desenvolvimento pessoal.

1.2 Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira

O Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), entidade coletiva de direito público com autonomia administrativa, financeira e património próprio, foi criado nos termos do artº 1 do Decreto-lei nº 284/99, de 26 de julho. O CHUCB integra o Hospital Distrital da Covilhã (figura 1), o Hospital Distrital do Fundão e o Departamento de Psiquiatria e Saúde Mental (1).

Nos termos do Decreto-lei nº 426/99, de 21 de outubro, o CHUCB foi construído com serviços de dimensão e diferenciação técnica adequados, abrangendo uma população de cerca de 100 000 habitantes dos concelhos da Covilhã, Fundão, Belmonte e Penamacor (1).



Figura 1: Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (2).

1.3 Objetivo Geral

Durante o período de 2 de setembro de 2019 a 2 de setembro de 2020, foi desenvolvido o presente trabalho, englobando o Projeto de Investigação, com o objetivo de adquirir experiência na área de investigação clínica, mediante a elaboração de um estudo a nível hospitalar, e o estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica (SPC), transitando pelas secções de Imunoquímica,

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

Microbiologia e Hematologia, de forma a acompanhar e participar no trabalho diário de rotina de cada secção.

Capítulo 1 – Projeto de Investigação

1. Contextualização teórica

1.1. Líquidos serosos

Os líquidos serosos, que incluem os líquidos pleural, pericárdico e peritoneal, existem em pequenos volumes nos espaços entre os pulmões e a pleura, entre o coração e o pericárdio e entre o intestino e o peritoneu, respetivamente. Estes líquidos têm como principal função a proteção dos órgãos que estes envolvem e a redução de atrito entre os mesmos (3). A pleura, o pericárdio e o peritoneu são estruturalmente semelhantes. A pleura, representada na figura 2, é formada por duas membranas mesoteliais, as pleuras parietal e visceral, que cobrem a parede interna do tórax e a superfície do pulmão, respetivamente. Essas membranas são contínuas e reúnem-se para formar uma camada dupla no hilo de cada pulmão, sem comunicação entre as cavidades pleurais direita e esquerda (4). A pleura parietal é dividida nos segmentos costal, mediastinal e diafragmático. No nível da parede torácica, esta é anexada ao tórax ósseo através de uma camada fibrosa denominada fáscia endotorácica. A pleura visceral envolve a superfície externa do pulmão, bem como cada lobo do pulmão individualmente e adere firmemente a este órgão (5). Entre as membranas, existe um espaço virtual preenchido pelo líquido pleural, que funciona como um lubrificante para permitir que as duas camadas da pleura deslizem suavemente uma sobre a outra durante a respiração. A pressão do líquido pleural é inferior ao da atmosfera, mantendo a pressão negativa entre os pulmões e a cavidade torácica, necessária para a inalação e para impedir o colapso dos pulmões (4). Num indivíduo saudável, existe aproximadamente 10 a 20 mL de líquido pleural, que tem uma composição semelhante ao do plasma, mas com uma baixa concentração de proteínas (inferior a 1,5 g/dL) (4). As células em suspensão no líquido pleural são essencialmente os leucócitos, sendo em média 75% de macrófagos, 23% de linfócitos e 1% de neutrófilos e ainda entre 1 a 2% de células mesoteliais (3).

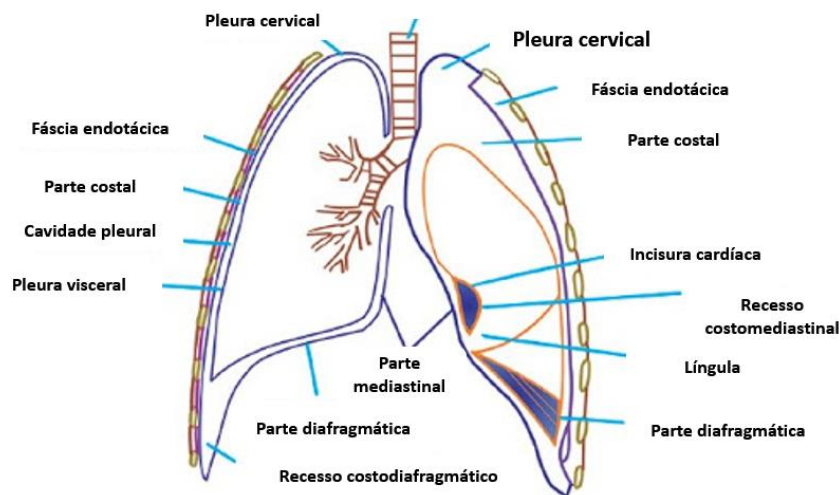


Figura 2: Representação esquemática da pleura (adaptado de 6).

O pericárdio, representado na figura 3, é um tecido fibroso que circunda o coração e conecta este órgão com o esterno, diafragma e com o mediastino anterior. Este tecido é formado por duas

camadas, o pericárdio visceral interno (epicárdio), composto por uma única camada de células mesoteliais conectadas à superfície epicárdica do músculo cardíaco e o pericárdio parietal externo, composto por uma camada fibrosa e uma camada serosa. O pericárdio possui a função de manter o coração na sua posição e evitar fricção entre o coração e as estruturas intratorácicas circundantes. Além disso, este limita a distensão durante o ciclo cardíaco e atua como uma barreira imunológica contra infecção. As duas camadas de pericárdio são separadas por um espaço virtual que contém de 15 a 50 mL de líquido pericárdico distribuído principalmente sobre os sulcos atrioventriculares e interventriculares. O líquido pericárdico possui a função de facilitar a função cardíaca e manter a função do pericárdio. Este líquido é um ultrafiltrado de plasma e possui uma composição eletrolítica semelhante ao mesmo, com uma menor concentração total de proteínas e com um quinto da quantidade de leucócitos (7). A nível celular, existem 1,1% de células mesoteliais, 53% de linfócitos, 31% de granulócitos, 12% de macrófagos, 1,7% de eosinófilos e 1,2% de basófilos (8).

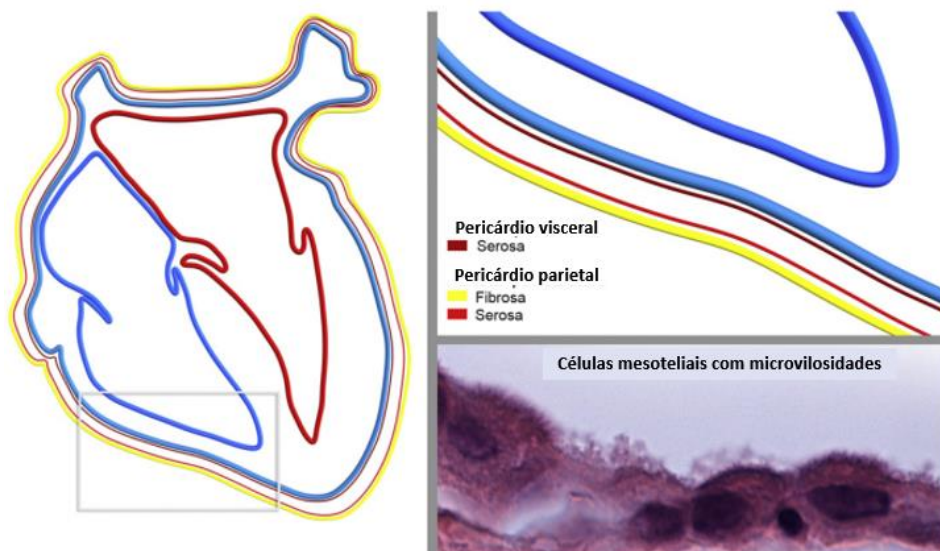


Figura 3: Representação esquemática do pericárdio e das células mesoteliais (adaptado de 9).

O peritoneu, representado na figura 4, é um tecido fibroso, constituído por fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e células mesoteliais, que reveste a parede e vísceras do abdômen e pélvis. Este tecido possui duas membranas, a parietal, que reveste a cavidade abdominal e se liga às paredes abdominal e pélvica, e a visceral, que reveste os órgãos localizados dentro do espaço intraperitoneal (10). Entre as membranas, existe um espaço virtual por onde circula o líquido ascítico. Um indivíduo saudável possui aproximadamente 50 mL de líquido ascítico, sendo este produzido pelas células da membrana como um ultrafiltrado do plasma. O líquido ascítico contém linfócitos, células mesoteliais e macrófagos (11). A principal função do líquido ascítico é a lubrificação da cavidade abdominal, reduzindo o atrito entre os órgãos, permitindo o seu movimento durante o processo da digestão (12). Este líquido também desempenha um papel no transporte de fluidos e células, no processo inflamatório, na reparação do tecido, na lise de depósitos de fibrina e disseminação tumoral (12).

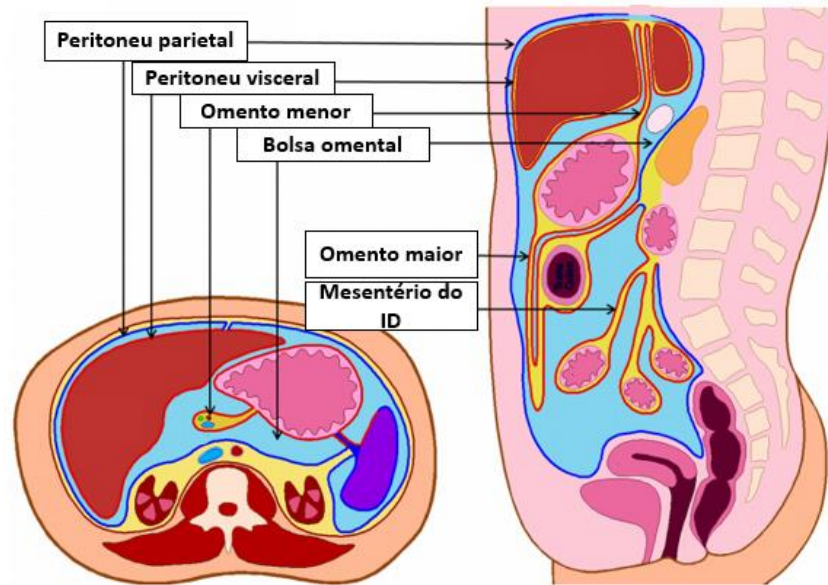


Figura 4: Representação gráfica do peritônio. ID: Intestino delgado (adaptado de 13).

1.2. Derrame dos líquidos serosos

O derrame dos líquidos serosos é a acumulação anormal dos líquidos, resultado de um desequilíbrio entre a produção e a absorção desse líquido. O volume do líquido existente nas cavidades é controlado por diversos fatores, entre os quais a pressão hidrostática e oncótica na circulação, pressão negativa na cavidade serosa, permeabilidade dos capilares na membrana e a capacidade de absorção linfática. Alterações como distúrbios na microcirculação, congestão dos vasos, vasodilatação, permeabilidade vascular acrescida ou bloqueio da drenagem linfática podem causar o extravasamento do fluido nas cavidades serosas (14). Nos casos de derrames de origem tumoral, ocorre a infiltração de células tumorais no espaço seroso através da disseminação pelos vasos sanguíneos, direta ou linfática, e posteriormente, o crescimento do tumor no espaço seroso pode bloquear a drenagem linfática, resultando na acumulação de líquido seroso (15).

A maioria dos derrames pleurais são devido a pneumonia, insuficiência cardíaca ou à presença de tumores (16). O derrame pleural tumoral é o segundo tipo mais comum, surgindo como uma complicação de tumores num estado avançado, provocada por metástases de outros locais, em que 50 a 65% são originárias de adenocarcinomas do pulmão e da mama (17-19). Por outro lado, as neoplasias pleurais primárias são menos frequentes, sendo comumente originárias de mesoteliomas (20).

O derrame pericárdico pode surgir devido a tumores, infecção, insuficiência cardíaca congestiva, radiação, trauma, doenças do tecido conjuntivo, lesão pericárdica e por causas metabólicas, como uremia e hipotireoidismo. Apesar disso, um número substancial de derrames é de origem idiopático (21). O tumor é a causa mais frequente, sendo na sua maioria secundária de metástases de carcinomas de pulmão e mama, adenocarcinoma, melanoma e de tumores hematológicos (22, 23). Os tumores primários do pericárdio são menos frequentes e incluem mesoteliomas, fibrossarcomas, linfangiomas, hemangiomas, teratomas, neurofibromas e lipomas (23).

O derrame ascítico ou ascite tem como principal causa a cirrose, que representa 85% de todos os casos. Outras causas incluem tumores, insuficiência cardíaca, tuberculose, hepatite alcoólica, entre outros (24). A ascite de origem tumoral pode resultar de tumores de origem abdominal, como gástrica, colorretal, pancreática e ovariana, ou extra-abdominal, como mama, pulmão e linfoma (25). Por outro lado, os tumores originários do peritoneu são raros (26). Considerando o gênero, os derrames de origem tumoral mais frequentes em mulheres são derivados de adenocarcinomas da mama ou do ovário, enquanto o carcinoma do pulmão é um dos mais frequentes em ambos os sexos (27).

Os derrames tumorais podem resultar na formação de transudatos ou exsudatos. Transudatos de origem tumoral resultam da falha na reabsorção do líquido seroso por interferência mecânica do tumor e são caracterizados por possuírem um baixo teor de proteína, geralmente inferior a 3,0 g/dL e baixa densidade, geralmente inferior a 1,015. Exsudatos de origem tumoral resultam de danos nas paredes dos capilares, presentes no tecido conjuntivo seroso, permitindo o escape de proteínas e vários constituintes celulares do sangue para a cavidade serosa, o que resulta num derrame com elevado teor de proteína, geralmente superior a 3,0 g/dL e de elevada densidade, geralmente superior a 1,015. É de notar que os transudatos e exsudatos também podem resultar de outras patologias, como cirrose do fígado, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, entre outras (28). Quando um líquido seroso contém células tumorais, o seu número pode variar consideravelmente, desde casos de líquidos com quase 100% de células tumorais até líquidos com percentagens reduzidas. No primeiro caso, o tumor presumivelmente irrompeu através do mesotélio, possivelmente em muitas áreas, ao passo que, quando as células tumorais são poucas, o tumor pode estar confinado no tecido conjuntivo subseroso, penetrando no mesotélio subjacente apenas em pequenas áreas. No entanto, os derrames com células tumorais em geral contêm células benignas, como células mesoteliais e leucócitos, que frequentemente são mais abundantes. As células mesoteliais podem ser estimuladas a sofrer hipertrofia e hiperplasia, e seu número pode exceder o das células tumorais (28).

1.3. Diagnóstico de derrames carcinomatosos

O exame citológico do líquido seroso auxiliado pela imunocitoquímica é o *gold standard* na deteção de derrames carcinomatosos, por ser um dos métodos mais específicos e menos dispendiosos disponíveis (29). O diagnóstico de derrames carcinomatosos está associado a um mau prognóstico e tem implicações significativas no tratamento, visto que geralmente indica metástases e tumores em estádios avançados, sendo necessário detetar qualquer célula tumoral com maior especificidade e sensibilidade. A sensibilidade do exame citológico no diagnóstico de derrames carcinomatosos varia entre 40% e 80%, em que essa discrepância é causada principalmente por diferenças na experiência dos investigadores e na qualidade das preparações. No entanto, é difícil distinguir inequivocamente entre células tumorais e células mesoteliais reativas com características morfológicas semelhantes às células tumorais, especialmente em derrames com poucas células tumorais (30, 31). Deste modo, o exame citológico é auxiliado pela imunocitoquímica, que ajuda na distinção entre os derrames carcinomatosos e reativos e minimiza as dificuldades inerentes à citopatologia. Por outro lado, recentemente estão a ser estudados outros métodos com o intuito de serem aplicados como métodos auxiliares de diagnóstico, para aumentar a sensibilidade e a especificidade no diagnóstico de derrames carcinomatosos, como por exemplo, a citometria de fluxo (30).

1.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia multiparamétrica que analisa partículas suspensas numa solução salina, enquanto passam por um ou vários lasers, fornecendo várias informações sobre os aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das partículas. A CF consiste em quatro sistemas principais: o fluido, a ótica, a eletrônica e o computador (32).

O **sistema fluido** possui dois componentes, o fluido de revestimento e linhas pressurizadas. O fluido de revestimento é geralmente uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), que é injetada na câmara de fluxo, por linhas pressurizadas. Uma outra linha pressurizada também injeta as células suspensas no tubo de amostra para a câmara de fluxo. A pressão do fluido com a amostra é sempre maior que a pressão do fluido de revestimento, o que resulta no alinhamento das células no centro do tubo para passarem uniformemente pelo feixe de laser do sistema ótico, permitindo que cada célula seja iluminada da mesma forma (32).

O **sistema ótico** também possui dois componentes, a bancada ótica, que inclui as lentes e o laser e a ótica de coleta, em posições fixas. As lentes servem para moldar e focar o feixe de laser. É utilizada corrente de alta voltagem para energizar os elétrons em orbitais de alta energia para, de seguida, voltarem para as orbitais de baixa energia, produzindo fótons de luz, que consistem no laser. Existem dois tipos de dispersão de luz que ocorrem quando os lasers incidem sobre as células, o *forward scatter* (FSC) e o *side scatter* (SSC). Os fatores que afetam a dispersão total da luz incluem a membrana, o núcleo, a granularidade da célula, o formato da célula e a topografia da superfície. O FSC é o resultado da difração de luz captada no mesmo eixo do feixe do laser incidente, sendo proporcional à área da superfície celular. O SSC é a medida da luz refratada, que é captada num ângulo de aproximadamente 90° do feixe de laser, sendo proporcional à granularidade da célula ou complexidade interna, como representado na figura 5. A ótica de coleta consiste numa coleção de lentes posicionadas para captar a luz emitida resultante da interação entre o laser e a célula, num sistema de espelhos óticos e filtros que separam e direcionam comprimentos de onda específicos para os detetores óticos apropriados. Os filtros podem ser de passagem de banda, passagem curta ou passagem longa. Os filtros de passagem de banda permitem que apenas uma faixa estreita de comprimentos de onda, próxima ao pico de emissão do corante fluorescente, chegue ao detetor. Os filtros de passagem curta permitem a passagem de comprimentos de onda de luz iguais ou menores que um comprimento de onda específico, enquanto os filtros de passagem longa permitem a passagem de comprimentos de onda de luz iguais ou maiores que um comprimento de onda específico (32).

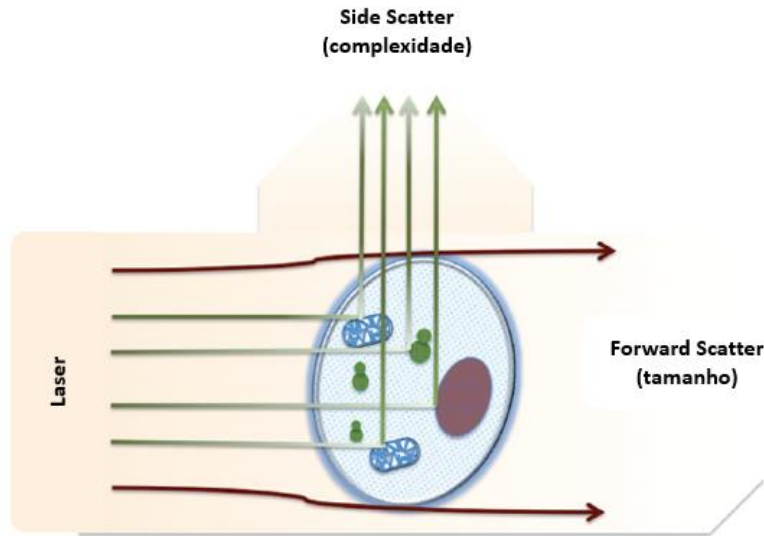


Figura 5: Representação gráfica do *forward scatter* e *side scatter* (adaptado de 32).

A luz captada pela ótica de coleta é direcionada aos fotodetetores, que fazem parte do **sistema eletrônico**. Existem dois tipos de fotodetetores, os fotodíodos (PDs) e os fotomultiplicadores (PMTs). Os sinais de luz capturados pelos fotodíodos são convertidos num número proporcional de elétrons, para criar uma corrente elétrica, que gera um sinal analógico. Esse sinal analógico é amplificado e convertido em sinal digital, para processamento no **computador**, mediante *softwares* adequados, que exibem os dados representados em gráficos ou histogramas. Os quatro sistemas estão representados na figura 6 (32).

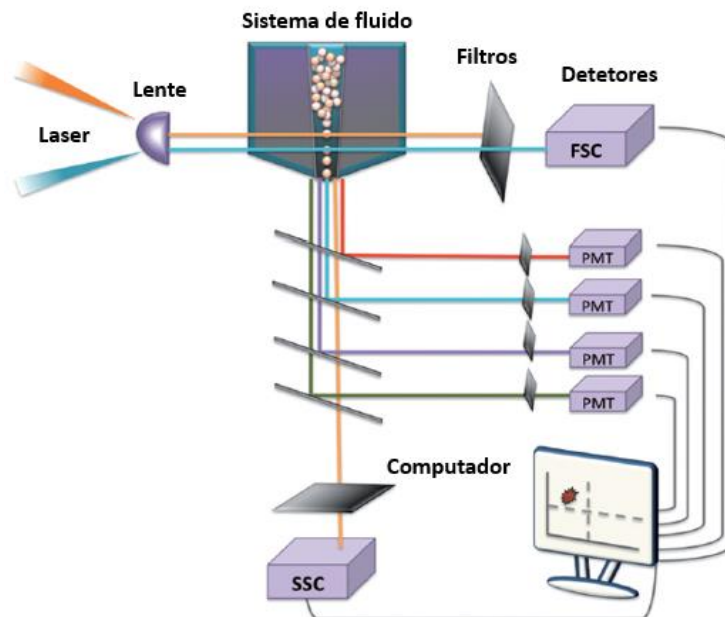


Figura 6: Resumo dos quatro componentes necessários na CF (adaptado de 32).

1.4.1. Fluorescência na citometria de fluxo

Um composto fluorescente tem uma faixa de comprimentos de onda de luz específica no qual absorve a energia de luz. Essa absorção faz com que um elétron passe de um estado fundamental para um nível de energia mais alto, ou seja, estado excitado. O elétron excitado volta rapidamente ao seu estado fundamental, enquanto liberta o excesso de energia como um fóton de luz, denominada fluorescência, como representada na figura 7 (32).

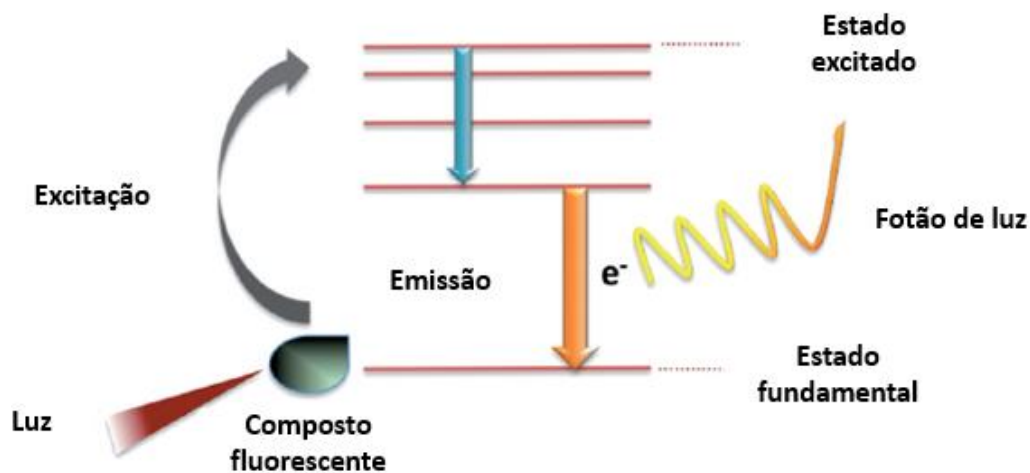


Figura 7: Processo de fluorescência (adaptado de 32).

Na CF, as células são marcadas com fluorocromos, que são sondas fluorescentes capazes de mostrar a presença de componentes que de outra forma não seriam visíveis. Os fluorocromos são utilizados numa ampla gama de aplicações, como imunofenotipagem, identificação de recetores de superfície celular ou organelos intracelulares, classificação de células, determinação do conteúdo de ácido nucleico, entre outros. As características importantes de um fluorocromo incluem um espectro de absorção no qual um composto fluorescente pode ser excitado e uma faixa de comprimentos de onda emitida designada por espectro de emissão. O comprimento de onda de emissão de qualquer fluorocromo será sempre maior do que seu comprimento de onda de excitação. Os fluorocromos usados na CF são classificados em vários grupos, incluindo os usados para marcar proteínas covalentemente e para ácidos nucleicos. Para rotular proteínas covalentemente, normalmente são utilizados anticorpos como sondas. Os fluorocromos mais amplamente usados para marcação de anticorpos incluem o isotiocianato de fluoresceína (FITC), fitoeritrina (PE) e alofocianina (APC). O FITC (representado na figura 8), PE e APC possuem um ponto máximo de excitação de aproximadamente 495nm, 495nm e 650nm e um ponto máximo de emissão de 520nm, 578nm e 660nm, respetivamente (32).

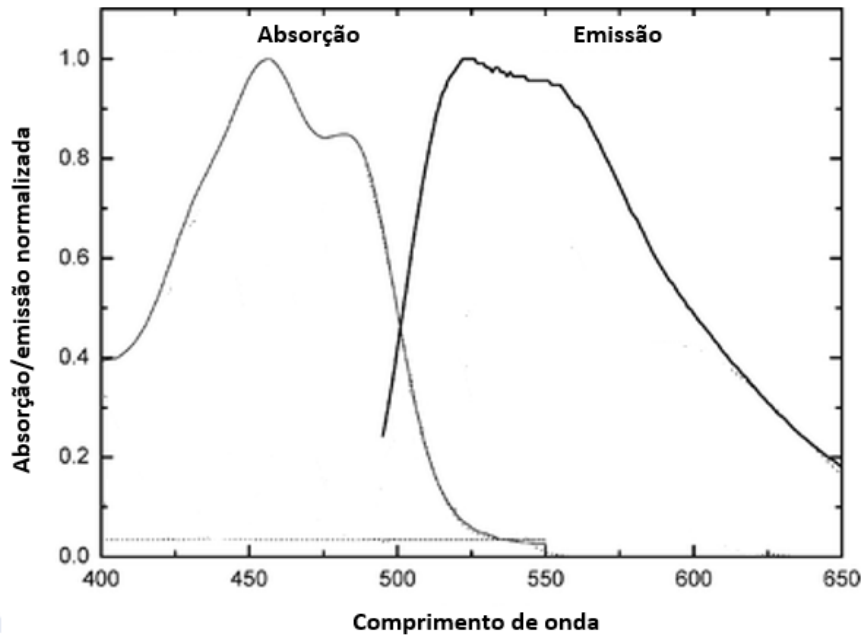


Figura 8: Espectro de comprimento de onda de excitação e de emissão do FITC (adaptado de 33).

A CF tem uma grande variedade de aplicações que são adequadas para vários campos de estudo, sendo a imunofenotipagem a mais frequente. A imunofenotipagem utiliza a CF para analisar simultaneamente populações mistas de células para vários parâmetros. Um ensaio de imunofenotipagem consiste em células marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos que são direcionados contra antígenos na superfície celular (34). Existe uma grande panóplia de anticorpos que podem ser usados na CF, sendo um deles o Ber-EP4, direcionado contra a molécula de adesão celular epitelial (35).

1.5. Molécula de adesão epitelial

A molécula de adesão celular epitelial (EpCAM ou CD326) é uma glicoproteína transmembranar de 40 kD composta por 314 aminoácidos, sendo uma molécula de adesão intercelular homofílica independente de Ca^{2+} . O CD326 foi identificado pela primeira vez em 1979 como um antígeno dominante no carcinoma do cólon, (35, 36). Visto que este antígeno foi posteriormente descoberto independentemente por diferentes grupos de investigadores, também é conhecido por um grande número de sinónimos, muitos dos quais correspondem ao nome do respetivo anticorpo monoclonal usado para reconhecer a proteína, incluindo os Ber-EP4, 17-1A, 323/A3, CO17A, EGP-2, EGP34, entre outros (36).

Esta molécula é composta por um grande domínio extracelular, uma única região transmembranar e um domínio citoplasmático curto de 26 aminoácidos, nos quais estão presentes dois locais de ligação para α -actinina para ligação ao citoesqueleto de actina. O domínio extracelular é constituído por três domínios, o domínio-N, o domínio tiroglobulina tipo 1A e o domínio-C, como representado na figura 9 (37).

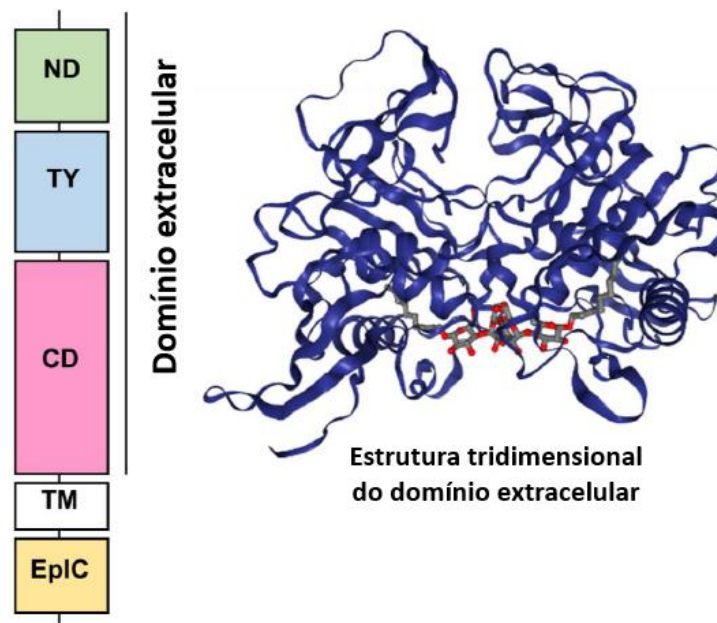


Figura 9: Diagrama esquemático da estrutura completa da proteína EpCAM e da estrutura cristalina do domínio extracelular. ND: Domínio-N; TY: domínio tiroglobulina tipo 1A; CD: Domínio-C; TM: Domínio transmembranar; EpIC: Domínio intracelular C-terminal (adaptado de 37).

O CD326 não é estruturalmente relacionado com nenhuma das quatro principais famílias de proteínas de adesão, nomeadamente as caderinas, selectinas, integrinas e imunoglobulinas, mas promove o contacto intercelular através da formação de trans-oligómeros intercelulares. A nível molecular, o CD326 interage com diferentes proteínas de adesão como E-Caderina, Claudinas, CD44, entre outras, regulando as estruturas de adesão existentes entre as células e a matriz celular, incluindo as junções apertadas (TJs), junções aderentes (AJs), desmossomos e hemidesmossomos (37). O CD326 é expresso na membrana basolateral das células em muitos tipos de tecidos epiteliais, incluindo estômago, pulmões, pâncreas, rins, entre outros e também é um marcador de superfície celular em várias células estaminais e células progenitoras. Os seus níveis de expressão variam entre diferentes órgãos e tipos de células, sendo mais expressos nos epitélios do cólon, intestino delgado, pâncreas, fígado, vesícula biliar e endométrio, em adultos. Em geral, a expressão do CD326 é positivamente correlacionada com proliferação, negativamente correlacionada com áreas mais diferenciadas e desempenha papéis importantes na adesão intercelular, sinalização celular, diferenciação, formação e manutenção da morfologia de órgãos (35, 37). Por outro lado, este não é expresso no epitélio escamoso adulto, hepatócitos, células mioepiteliais e mesoteliais ou fibroblastos (35, 36).

O CD326 é frequentemente sobre-expresso na maioria dos carcinomas, como demonstrado na tabela 1. Em contraste, existe uma menor expressão de CD326 na maioria dos carcinomas de células escamosas do que adenocarcinomas e não tem expressão em sarcomas, linfomas, melanomas e tumores neurogénicos. Níveis especialmente elevados de expressão podem ser observados em carcinomas derivados do cólon, intestino, mama, pulmão e próstata.

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

Tabela 1: Expressão do CD326 em carcinomas. CRC: Cancro Colorretal; HCC: Carcinoma Hepatocelular; SCC: Carcinoma de Células Escamosas; BCC: Carcinoma Basocelular (38).

Órgão	Carcinoma
Oral (mucosa, glótica, escamosa, epitélio)	Positivo
Gástrico	Positivo
Colon	Sobre-expresso (CRC)
Fígado	Negativo (HCC)
Pâncreas	Sobre-expresso
Mama	Sobre-expresso
Próstata	Sobre-expresso
Ovário	Sobre-expresso
Bexiga	Sobre-expresso
Colo uterino	Positivo
Pulmão	Positivo (SCC) e negativo no mesotelioma
Pele	Positivo (BCC)

Ao contrário dos epitélios saudáveis, a distribuição do CD326 na célula varia com o tipo de carcinoma, de uma distribuição basolateral a uma membrana homogênea de células inteiras (37).

O valor prognóstico da expressão do CD326 depende do tipo de tumor. Em certos tipos de tumor, a sobre-expressão do CD326 foi associado a um estadio avançado da doença e a um pior prognóstico. Como exemplos, estudos demonstram que a sobre-expressão do CD326 no cancro de mama, carcinoma urotelial da bexiga, carcinoma da próstata, carcinoma do ovário e carcinoma da vesícula biliar estão associados a um pior prognóstico, comparativamente aos casos em que não houve expressão do CD326 (38). Por outro lado, em alguns tipos de carcinoma como carcinoma de tireoide, a expressão do CD326 foi associada a um melhor prognóstico. Assim, o CD326 pode servir como um marcador prognóstico adicional em certos tipos de tumor (37).

2. Objetivo do projeto de investigação

A citopatologia, auxiliada pela imunocitoquímica, é considerada o *gold standard* na deteção de células tumorais em amostras de derrames de líquidos serosos (29, 38, 39). Apesar das vantagens da imunocitoquímica, esta técnica é relativamente morosa e dependente da interpretação do observador (40-42). Por outro lado, a CF pode ser aplicada na análise de líquidos biológicos não hematopoiéticos para o estudo de tumores, especialmente nos líquidos serosos, visto que as células são mantidas em suspensão. Adicionalmente, o CD326 emergiu como o melhor marcador para a pesquisa de células epiteliais, incluindo células tumorais originárias de células epiteliais (42). Assim surge o interesse em estudar os líquidos serosos para a pesquisa de células CD326 positivas por CF para auxiliar na avaliação citopatológica, devido à sua facilidade de utilização e o tempo de resposta rápido.

Deste modo, o presente estudo tem como os objetivos principais:

- Revisão bibliográfica das características celulares dos líquidos serosos na presença de tumores;
- Análise dos líquidos serosos por CF para a pesquisa de células CD326 positivas, CD45 e CD33 negativas;

- Comparação dos resultados obtidos por CF com os resultados da Anatomia Patológica (AP), para determinação dos valores de sensibilidade e especificidade da CF, neste contexto.

Com este estudo, espera-se que os resultados de CF apresentem uma boa correlação com os obtidos pela AP na detecção de tumores nos líquidos serosos (40, 41).

3. Materiais e métodos

3.1. Receção e manuseamento das amostras

Foi realizado um estudo retrospectivo, em que foram selecionadas 35 amostras recebidas no SPC, entre maio de 2016 a agosto de 2019. Nos doentes em que houve colheita de líquido seroso para pesquisa de células tumorais por imunocitoquímica, também foi obtida amostra para tubos com anticoagulante ácido etileno-diamino-tetraacético (K3-EDTA) para serem avaliados por CF. As amostras estudadas são de líquido ascítico (28), líquido pleural (6) e líquido pericárdico (1). O SPC recebe amostras de líquidos serosos provenientes do CHUCB. As amostras chegam ao SPC em tubos de K3-EDTA devidamente acondicionadas e identificadas, destinadas à secção de Hematologia, para análise por CF. As amostras são processadas no momento da sua chegada ao SPC, caso contrário, são armazenadas a 4°C até serem processadas, sem ultrapassar as 4 horas de espera até à análise.

3.2. Processamento da amostra para citometria de fluxo

A 500 µl de cada amostra, foram adicionados 5 µl de anticorpo monoclonal contra o antígeno epitelial humano (CD326; Clone: Ber-EP4, Dako) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5 µl de anticorpo contra leucócitos (CD45; Clone: 2D1, Becton Dickinson) conjugado com alofocianina (APC) e 10 µl de anticorpo contra a linha mieloide (CD33; Clone: P67.6, Becton Dickinson) conjugado com fitoeritrina (PE). As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. De seguida, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 5 minutos, para realizar a lavagem. O botão celular é suspenso com 500 µl de PBS, que fica pronto para a aquisição no citómetro FACSCalibur, mediante o *software* CellQuest™ (Becton Dickinson). Paralelamente, foram preparados os controlos negativos, utilizando as próprias amostras processadas da mesma forma, excetuando a adição de anticorpos marcados com fluorocromos, como esquematizado na tabela 2.

Tabela 2: Painel de anticorpos e fluorocromos utilizados para marcar as células.

Tubo	Anticorpos monoclonais e fluorocromos			Volume de amostra
	FITC	PE	APC	
1	N/A	N/A	N/A	500 µl
2	CD326	CD33	CD45	500 µl

A estratégia utilizada para realizar o *gating* teve em consideração o CD45 e o SSC, abrangendo até 50 mil eventos CD45⁺. De seguida, foi realizada a análise utilizando o *software* Infinicyt™ 1.8

(Cytognos), em que foram identificados os eventos CD326⁺, excluindo os eventos CD33⁺. Por fim, os eventos identificados foram avaliados nos eixos da FSC (tamanho) e SSC (complexidade). Os eventos identificados como células epiteliais são CD45⁻, CD33⁻ e CD326⁺. O critério utilizado para determinar a positividade para a presença células epiteliais nas amostras de líquido seroso baseia-se na presença de um grupo definido de eventos sugestivos de células epiteliais. Os passos visando a seleção dos eventos de interesse estão ilustrados na figura 10.

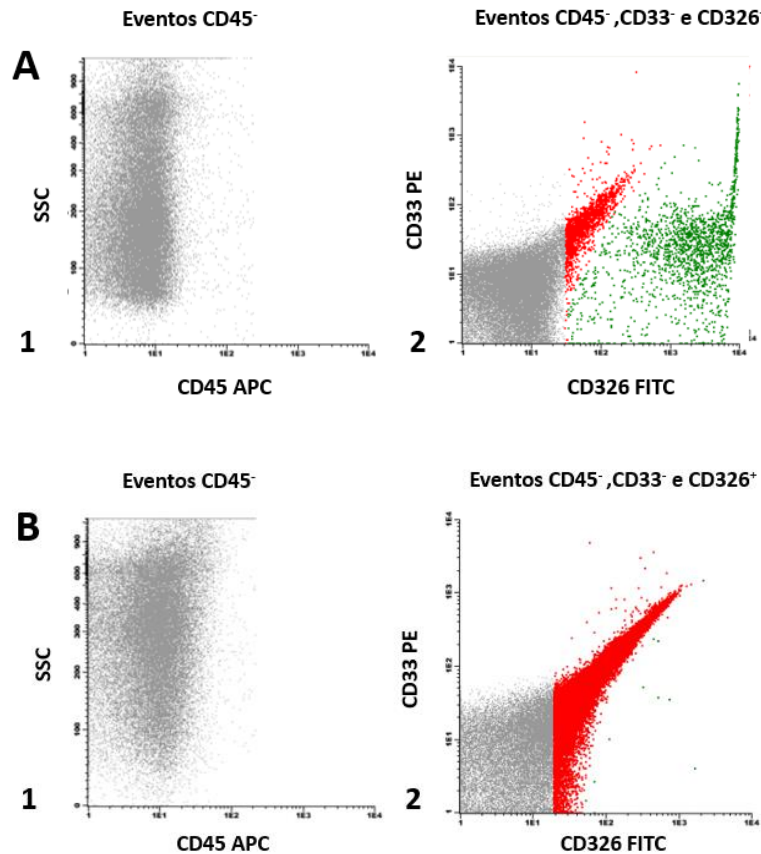


Figura 10: Estratégia de análise de CF, demonstrada em dois exemplos de amostras de líquido ascítico. A amostra (A) é positiva para a presença de células epiteliais (verde) e a amostra (B) é negativa.

Os resultados das análises por CF foram comparados com os resultados da AP para determinar os valores da sensibilidade e a especificidade, mediante as seguintes equações:

1. Sensibilidade = $(VP / (VP + FN)) \times 100$
2. Especificidade = $(VN / (VN + FP)) \times 100$

VP: Verdadeiro Positivo; VN: Verdadeiro Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo (43). VP e VN são determinados quando o respetivo resultado positivo e resultado negativo da CF são concordantes com os resultados da AP, enquanto FP e FN são determinados quando o respetivo resultado positivo e resultado negativo da CF não são concordantes com a AP.

3.3. Anatomia patológica

Os resultados da análise por CF foram comparados com os descritos no relatório anatomopatológico (do Laboratório de Patologia e Citopatologia), relativos a exames da morfologia citológica e estudos imunohistoquímicos de diversas amostras, incluindo amostras de líquido ascítico, pericárdico e pleural, bem como de tecidos de cólon e de intestino delgado.

4. Resultados

Das 35 amostras estudadas, 22 (62,8%) provêm de doentes do sexo masculino e 13 (37,1%) do sexo feminino, com uma média de 68 anos e uma mediana de 62 anos e com idades compreendidas entre os 47 e 89 anos, distribuídas por faixas etárias como representado na figura 11.

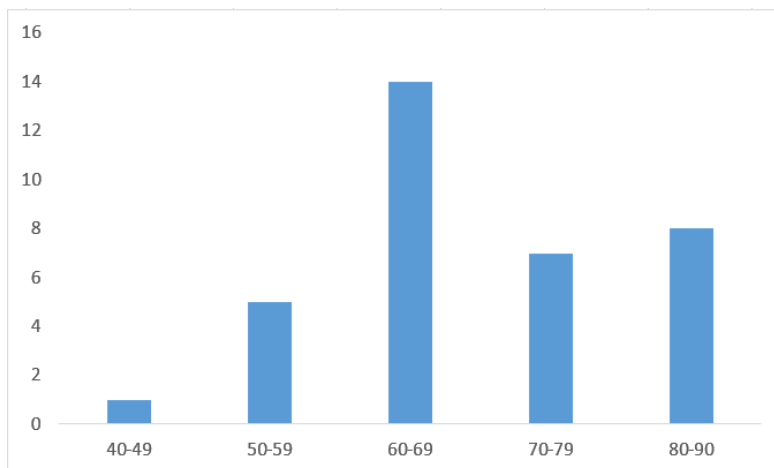


Figura 11: Distribuição das amostras estudadas por faixas etárias.

Segundo a CF, foram considerados 21 resultados negativos e 14 resultados positivos para a presença de células epiteliais CD326⁺. Os números totais de eventos CD45⁺ obtidos variaram em cada amostra, tendo um máximo de 500 mil e um mínimo de 6886 eventos. Essa variação ocorreu porque houve amostras com um número elevado células e outras com números reduzidos de células, respetivamente. Os números dos eventos sugestivos de células epiteliais, bem como a percentagem (considerando os CD45⁺), variaram com as amostras, tendo um máximo de 64356 eventos e 49,48% e um mínimo de 96 eventos e 0,16%, respetivamente. Quanto à AP, foram considerados 19 resultados negativos, 14 positivos e 2 inconclusivos para a presença de células tumorais. Os resultados de todas as amostras estão resumidos na tabela 3.

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

Tabela 3: Resumo das amostras e dos resultados da anatomia patológica e da CF. Resultados emitidos pela Anatomia Patológica, mediante a análise a amostras de biópsias de tumor no intestino delgado (*) e no cólon (**).

Nº	Tipo de amostra	Anatomia patológica	CD45 ⁻ , CD33 ⁻ e CD326 ⁺	Nº eventos CD 45 ⁻	Nº eventos CD45 ⁻ , CD33 ⁻ e CD326 ⁺	% eventos CD45 ⁻ e CD33 ⁻ e CD326 ⁺	Distribuição FSC e SSC
1	Ascítico	Negativo	Negativo	21182	N/A	N/A	N/A
2	Ascítico	Negativo	Negativo	500000	N/A	N/A	N/A
3	Pleural	Positivo	Positivo	50000	96	0,16	Homogénea
4	Ascítico	Positivo	Positivo	50000	113	0,23	Heterogéneo
5	Ascítico	Inconclusivo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
6	Ascítico	Negativo	Negativo	6886	N/A	N/A	N/A
7	Ascítico	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
8	Ascítico	Negativo	Negativo	10121	N/A	N/A	N/A
9	Pleural	Positivo	Positivo	50000	3903	7,81	Heterogénea
10	Ascítico	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
11	Ascítico	Negativo	Positivo	16755	758	4,52	Heterogénea
12	Ascítico	Positivo	Negativo	500000	N/A	N/A	N/A
13	Ascítico	Positivo	Positivo	301836	2358	0,78	Homogénea
14	Ascítico	Positivo	Positivo	124662	2016	1,62	Heterogénea
15	Ascítico	Negativo	Negativo	18055	N/A	N/A	N/A
16	Ascítico	Positivo	Positivo	10000	220	2,2	Homogénea
17	Ascítico	Positivo	Positivo	50000	1645	3,29	Homogénea
18	Ascítico	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
19	Ascítico	Negativo	Negativo	24794	N/A	N/A	N/A
20	Ascítico	Negativo	Negativo	46965	N/A	N/A	N/A
21	Pericárdico	Positivo	Positivo	10000	4848	48,48	Heterogénea
22	Ascítico	Positivo*	Positivo	123984	834	0,67	Homogénea
23	Ascítico	Positivo	Positivo	24702	989	4	Heterogénea
24	Pleural	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
25	Ascítico	Negativo	Negativo	348624	N/A	N/A	N/A
26	Ascítico	Negativo	Negativo	409547	N/A	N/A	N/A
27	Ascítico	Positivo**	Negativo	203976	N/A	N/A	N/A
28	Pleural	Positivo	Positivo	116790	4443	3,8	Homogénea
29	Ascítico	Negativo	Negativo	124449	N/A	N/A	N/A
30	Pleural	Positivo	Positivo	50000	27629	55,26	Heterogénea
31	Ascítico	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
32	Ascítico	Negativo	Negativo	500000	N/A	N/A	N/A
33	Ascítico	Negativo	Negativo	50000	N/A	N/A	N/A
34	Ascítico	Negativo	Negativo	500000	N/A	N/A	N/A
35	Pleural	Inconclusivo	Positivo	130933	64356	49,48	Homogénea

Excluindo os resultados inconclusivos da AP, a CF demonstrou elevada sensibilidade (85,71%) e especificidade (94,74%). No entanto, ao incluir os resultados inconclusivos da AP, a sensibilidade e a especificidade desceram para 80% e 90%, respectivamente, como demonstrado na tabela 4. Com a CF, 12 resultados foram considerados verdadeiros positivos e 18 resultados foram considerados verdadeiros negativos. Por outro lado, 1 resultado foi considerado falso positivo e 2 foram considerados falsos negativos. Utilizando o *software* Graphpad Prism, foi calculada a significância estatística da diferença entre a CF e a AP no diagnóstico da positividade para malignidade, sendo considerada estatisticamente significativa, tanto excluindo (Fisher exact t test, $P < 0,0001$) como incluindo (Fisher exact t test, $P < 0,0001$) os resultados inconclusivos da AP.

Tabela 4: Comparação entre os resultados da CF com a AP, para a determinação dos valores de sensibilidade e especificidade. VP: Verdadeiro Positivo; VN: Verdadeiro Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; AP: Anatomia Patológica.

		Citometria de Fluxo		
		Positivo	Negativo	Total
Anatomia Patológica	Positivo	12 (VP)	1 (FP)	13
	Negativo	2 (FN)	18 (VN)	20
	Total	14	19	33
	Inconclusivo	1	1	2
	Total incluindo inconclusivo para AP	15	20	35
	Excluindo inconclusivo	Incluindo inconclusivo		
Sensibilidade	$(12/14) \times 100$	85,71%	$(12/16) \times 100$	80%
Especificidade	$(18/19) \times 100$	94,74%	$(18/21) \times 100$	90%

5. Discussão

Atualmente, a análise da morfologia citológica auxiliada pela imunocitoquímica é o *gold standard* para a pesquisa de células tumorais em amostras de líquido seroso. Mas a eficácia do método pode ser afetada por muitos fatores, entre os quais o baixo número de células, amostras hemáticas e a dificuldade em diferenciar entre tumores epiteliais e células mesoteliais reativas, que aumentam a dificuldade de interpretação do observador. Adicionalmente, a imunocoloração é limitada pelo número de células presentes no bloco celular e é um processo moroso, que pode atrasar a decisão de um diagnóstico. Assim, o desenvolvimento de um método auxiliar que possa aumentar a sensibilidade e a especificidade, bem como reduzir o tempo de resposta seria uma mais-valia no contexto hospitalar. A CF é amplamente utilizada no diagnóstico de tumores hematológicos, mas não no diagnóstico e acompanhamento de tumores não hematológicos. Assim, é de interesse avaliar a capacidade da CF na análise e detecção de células epiteliais em amostras de líquido seroso, visando auxiliar a avaliação citopatológica, devido à sua facilidade de uso e o tempo de resposta rápido.

Nas amostras de líquidos serosos são encontrados leucócitos e células mesoteliais. No presente estudo foi utilizado um painel de anticorpos CD45, CD33 e CD326 marcados com fluorocromos, para a pesquisa de células epiteliais em amostras de líquido seroso por CF, considerando que a mera presença de, pelo menos, uma população de células epiteliais nesses líquidos é sugestiva de carcinoma.

O CD45, ou antígeno leucocitário comum, está presente nas células leucocitárias normais e tumorais. Na CF, é utilizado no diagnóstico de leucemias e linfomas, visto que a sua expressão

permite identificar populações de leucócitos e a presença de padrões anormais é sugestiva de patologia. Em líquidos serosos, a detecção de eventos CD45⁻ com valores de SSC elevados é sugestiva para a presença de tumores não hematopoiéticos (44). Isso justifica o passo de *gating* realizado neste estudo, em que são abrangidos os eventos CD45⁻. O CD33 é expresso em células estaminais mieloides, mieloblastos, monoblastos, monócitos/ macrófagos, precursores de granulócitos e mastócitos (45). No líquido seroso, eventos CD33⁺ indicam a presença de monócitos/ macrófagos, mas como estes leucócitos são CD45⁺, presume-se que são excluídos com o passo de *gating*. O início da análise dos eventos adquiridos é realizado num *dot plot* em que os eixos de Y e X representam o SSC e CD326, respetivamente. São selecionados os eventos CD326⁺, visto que esse marcador é específico para as células epiteliais. O próximo passo é realizado num *dot plot* em que os eixos de Y e X representam a expressão de CD33 e CD326, respetivamente. Ao analisar cada amostra, observa-se sempre um agrupamento de eventos com um padrão característico no meio do *dot plot*. Esses eventos representam uma população de células autofluorescentes, que são células com uma capacidade intrínseca de emitir fluorescência, que devem ser excluídas, pois não indicam a formação do complexo antígeno-anticorpo pretendido com os painéis de anticorpos utilizados, ou seja, provavelmente não expressam CD33 ou CD326 (46). No próximo passo, são selecionados somente os eventos CD326⁺, de forma a incluir somente eventos CD45⁻, CD33⁻ e CD326⁺. O CD326 é utilizado para diferenciar células mesoteliais que são CD326⁻, das células epiteliais, que são CD326⁺. Assim, somente os eventos que sugerem a presença de células epiteliais são selecionados. As células epiteliais tumorais geralmente são grandes e complexas, mas podem apresentar-se de diversos tamanhos e complexidades, sendo que essas características são observadas num *dot plot* com os eixos de FSC e SSC (42). As células mesoteliais reativas não expressam os CD45, CD33 e CD326. Em algumas amostras, são observadas duas populações bem definidas de eventos CD326⁺, CD45⁻ e CD33⁻, em que uma população expressa intensamente o CD326, enquanto que a outra população o expressa com menos intensidade. Ao analisar cada uma dessas populações, é possível observar no *dot plot* de FSC e SSC que a população que expressa CD326 com menos intensidade corresponde aos eventos situados na área dos detritos e a população que expressa CD326 intensamente corresponde aos eventos grandes e complexos. Possivelmente, durante o preparo da amostra, algumas células epiteliais tumorais fragmentaram-se, o que justifica a presença de vários eventos na área dos detritos (40). Após a análise, é aplicado o critério para a determinação de positividade para a presença de células epiteliais, em que o resultado é considerado positivo quando existe um grupo definido de eventos CD45⁻, CD33⁻ e CD326⁺.

Existem outros aspetos que podem ser considerados na interpretação destes resultados, como o critério para a determinação de positividade para células epiteliais e os tipos de amostras incluídas neste estudo. Quanto ao critério para a determinação de positividade para células epiteliais, além de obter eventos devidamente marcados com o painel de anticorpos de interesse, o número de eventos é importante para ter uma significância estatística. De um ponto de vista geral, tendo em conta a percentagem espectável de eventos de interesse que são adquiridos de uma amostra, sugere-se uma aquisição de 10⁶ eventos quando é expectável adquirir aproximadamente 1% de eventos de interesse, sendo que esse número aumenta ou diminui quanto menor ou maior é a percentagem de eventos de interesse, respetivamente (47). Atualmente, não existe um consenso no que diz respeito à pesquisa de células epiteliais tumorais em líquidos serosos por CF e o número de eventos a adquirir, por isso, esse aspeto não foi incluído no critério para a determinação de positividade para células epiteliais, neste estudo. O critério foi determinado visto a presença de células epiteliais no líquido seroso ser sugestiva de carcinoma. Mas em 2013, Pillai *et al* (40) publicaram um estudo em que pesquisaram a presença de células epiteliais em líquidos serosos

por CF, utilizando um painel ligeiramente diferente de anticorpos, formado pelos CD45, CD14 e Ber-EP4. Foram adquiridos 500 mil eventos em todas as amostras e determinaram que as amostras que apresentassem mais de 0,5% de eventos CD45⁻, CD14⁻ e Ber-EP4⁺, seriam consideradas positivas para a presença de células epiteliais. Mediante esse critério, a análise por CF teve uma sensibilidade e especificidade de 88,15% e 97,64%, respetivamente, ligeiramente superior ao que foi obtido no presente estudo (40). Considerando esses aspetos, é possível inferir que possivelmente, a aquisição de um maior número de eventos CD45⁻ e a determinação de uma percentagem de eventos de interesse, entre 500 mil a 10⁶ e 0,5% e 1%, respetivamente, poderá fornecer resultados mais fiáveis.

Quanto ao tipo de amostras incluído neste estudo, é importante notar que houve diferenças na relação entre o número total de eventos CD45⁻ adquiridos e o número de eventos de interesse entre os diferentes tipos de amostras declaradas positivas para a presença de células epiteliais. As amostras de líquido ascítico tiveram médias de 87742,38 eventos CD45⁻ adquiridos e 1116,62 (2%) de eventos de interesse adquiridos, enquanto que as amostras de líquido pleural tiveram médias de 79544,6 e 20166,4 (23,3%) respetivamente, e a amostra de líquido pericárdico teve um único resultado de 10000 e 4848 (48,48%). Uma possível explicação baseia-se no facto que geralmente, os derrames de líquido ascítico são de maior volume que os outros derrames, o que resulta numa maior dispersão de células metastáticas pelo líquido e, conseqüentemente, reduz o número de aquisição dessas células por mL (48). Outra explicação reside na possibilidade que, no caso de carcinomas do pulmão, o tumor poder desenvolver-se em vários pontos do pulmão e irromper através do mesotélio em muitas áreas, resultando numa percentagem elevada de células epiteliais, tanto no líquido pericárdico, como no líquido pleural (28).

Mediante o critério para a determinação de positividade para a presença de células epiteliais, foram considerados 14 resultados positivos e 21 resultados negativos. Entre os resultados positivos, 8 são de amostras de líquido ascítico, 5 de líquido pleural e 1 de líquido pericárdico. Dos 14 resultados positivos, 12 (85,72%) são concordantes com a AP e 2 (14,28%) são discordantes, que considerou um como negativo e outro como inconclusivo. Quanto aos resultados discordantes entre a AP e a CF, o doente do qual foi colhida a amostra de líquido ascítico declarada negativa pela AP foi submetido a uma laparotomia exploratória 12 dias depois de terem colhido a referida amostra, em que constataram a presença de carcinomatose peritoneal extensa que envolve vários órgãos, inclusive o peritoneu. A amostra correspondente analisada por CF também é de líquido ascítico, em que adquiriram 16755 eventos CD45⁻ e detetaram uma população de 758 (4,52%) eventos sugestivos de células epiteliais. Assim, é possível inferir que a análise da CF conseguiu detetar uma neoplasia existente, enquanto a análise da AP declarou como negativa. Quanto ao caso declarado inconclusivo pela AP, foi estudada uma amostra de líquido pleural, tanto pela AP como pela CF. Mediante a CF, foram adquiridos 130933 eventos CD45⁻, e detetaram 64356 (49,48%) eventos da população de interesse. Esse resultado é claramente sugestivo da presença de células epiteliais, o que é uma mais-valia, pois sugere que os estudos por CF originam resultados positivos conclusivos, mesmo quando não é possível determinar um resultado através da AP. Desta forma é evidenciado a importância de usar diferentes técnicas de forma a colmatar as limitações inerentes a cada uma.

Relativamente aos resultados positivos concordantes, tanto o número de eventos CD45⁻, como o número de eventos de interesse e a respetiva percentagem foram divergentes, com um máximo de 301836 eventos CD45⁻ adquiridos, um mínimo de 10000 e uma média de 79261,57. Não houve uma correlação evidente entre o número de eventos CD45⁻ obtido e o número de eventos de

interesse. Dos 14 resultados positivos, 12 foram concordantes com o critério de positividade para neoplasia estabelecido por Pillai *et al* (40), tendo em conta o mínimo de 0,5% de eventos de interesse para determinar a positividade, apesar de que para todas as amostras positivas foram adquiridos menos que 500 mil eventos CD45⁺. Mas os restantes dois resultados positivos demonstraram valores de percentagem de eventos de interesse abaixo do referido critério, de 0,16% e 0,23%, com valores de aquisição de CD45⁺ de 50 mil eventos. Considerando estes dois resultados, seria de interesse verificar a possibilidade de alcançar o limite mínimo de 0,5% caso fossem adquiridos pelo menos 500 mil eventos CD45⁺, ou seja, possivelmente a aquisição de pelo menos 500 mil eventos originam resultados mais conclusivos.

Dos 21 resultados negativos, 18 (85,71%) são concordantes e 3 (14,29%) são discordantes com a AP, em que 2 resultados são positivos e 1 é inconclusivo pela AP. Tal como os resultados positivos concordantes, o número de aquisição de eventos CD45⁺ foram diferentes entre os resultados negativos concordantes, com um máximo de 500 mil, um mínimo de 6886 eventos e uma média de 156145,7 eventos. Três resultados tiveram 500 mil eventos CD45⁺ adquiridos, que é igual ao parâmetro utilizado no estudo de Pillai *et al* (40). Semelhante aos outros resultados negativos que tiveram um menor número de aquisição de eventos CD45⁺, não foram adquiridos eventos de interesse que atingissem o critério para determinar a positividade utilizado neste estudo. Um dos resultados positivos da AP corresponde a um caso em que a amostra de líquido ascítico colhido pertence a um doente em que constataram intraoperatoriamente uma carcinomatose difusa no líquido ascítico, originária de cancro colorretal. Por CF, foram adquiridos 500 mil eventos CD45⁺ da amostra correspondente. Na literatura, está bem documentada que a expressão de CD326 é intensa nos casos de cancro colorretal, mas existem estudos que indicam que a diminuição da expressão desse marcador está correlacionada com a progressão e metástase do tumor (49). Visto que a carcinomatose peritoneal difusa indica a ocorrência de metástases e está associada a fases avançadas de cancro colorretal, é possível inferir que a análise por CF não detetou positividade, possivelmente porque o estágio avançado do cancro colorretal está inversamente relacionado com a expressão do CD326, ou seja, essas células tumorais podem não expressar o CD326. Outra hipótese reside na eventualidade de ter-se adquirido um número insuficiente de eventos, ao ponto de não ter sido possível adquirir eventos de interesse suficientes para cumprir o critério de positividade. No outro caso em que a AP relatou como positivo para a presença de adenocarcinoma, analisaram uma amostra de um tumor sólido, em que fizeram uma colectomia segmentar. Não se observou invasão de estruturas adjacentes, excetuando no tecido adiposo do peritoneu. Na literatura consta que é frequente a ocorrência de casos de carcinoma no cólon, sem envolver o peritoneu (50). Assim, é possível deduzir que a análise por CF não detetou positividade, porque possivelmente não ocorreu metástase do tumor para o líquido ascítico. Quanto ao caso declarado inconclusivo pela AP, foi analisada uma amostra de líquido ascítico, tanto pela AP como pela CF. Foi possível adquirir 50 mil eventos CD45⁺ mediante a CF e não foram identificados eventos de interesse, atribuindo um resultado negativo quanto à presença de células epiteliais. Assim, pode inferir-se que é possível atribuir um resultado negativo quanto à presença de células epiteliais, mesmo em casos que não foi observado um resultado na AP. No entanto, é importante frisar que é preferível a aquisição de um maior número de eventos para atribuir um resultado mais fiável, visto que existe o risco do resultado ser falso negativo, devido ao reduzido número de eventos CD45⁺ adquiridos e, conseqüentemente, da não aquisição de eventos de interesse.

Considerando os resultados da AP como *gold standard*, a CF demonstrou elevada sensibilidade (85,71%) e especificidade (94,74%) para a pesquisa de células epiteliais em derrames de líquidos

serosos. Das 35 amostras analisadas, 30 (85,71%) tiveram resultados concordantes entre os dois métodos de análise. Entre os 5 resultados discordantes, 4 não são realmente considerados como falsos negativos ou falsos positivos, visto que a AP declarou dois resultados inconclusivos, 1 resultado negativo contradito pelo resultado do relato cirúrgico e 1 resultado positivo em que não analisaram uma amostra de líquido seroso, mas de uma colectomia de um tumor. O resultado que realmente é um falso negativo corresponde ao caso que foi declarado como negativo pela CF, mas em que foi detetada a presença de células com características morfológicas compatíveis com carcinoma, pela AP. Assim, é possível inferir que a CF, bem como o painel de anticorpos e o critério para a positividade de células epiteliais em líquidos serosos utilizados neste estudo, fornecem resultados fiáveis, considerando os valores de sensibilidade e especificidade.

A CF e a estratégia utilizada neste estudo mostram várias vantagens para a pesquisa de células epiteliais em líquidos serosos. Assim, a CF deve ser considerada como uma técnica complementar à AP, permitindo diminuir o tempo de resposta da análise por CF, mantendo a sensibilidade e a especificidade. Adicionalmente, a CF possui várias características típicas de um método de rastreio, por ser menos invasivo, perigoso, dispendioso e desconfortável para os doentes (43). Deste modo, no contexto hospitalar, a CF pode ser utilizada conjuntamente com a análise morfológica, como um método de rastreio preliminar, para fornecer mais informações que auxiliem no diagnóstico realizado pela AP. Mas, por outro lado, é importante mencionar algumas desvantagens associadas ao método de análise utilizado neste estudo. Não é possível determinar a origem e o grau de diferenciação das células epiteliais tumorais, mas apenas presumir que os eventos analisados sugerem a presença de células epiteliais. Adicionalmente, existem células de origem epitelial que não expressam CD326, dos quais os epitélios escamosos, queratinócitos epidérmicos, células parietais gástricas, células mioepiteliais, epitélio cortical tómico e hepatócitos e células epiteliais tumorais de determinadas origens que não expressam CD326 em estádios avançados de carcinoma (51).

6. Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo vem fornecer dados importantes em relação à utilidade da análise dos líquidos serosos por CF como um método auxiliar no diagnóstico de tumores de origem epitelial. Visto que o desempenho da AP no diagnóstico de tumores de origem epitelial presentes nos líquidos serosos pode ser prejudicado por muitos fatores, torna-se necessário desenvolver um método auxiliar para aumentar a precisão no diagnóstico e reduzir o tempo de resposta. Esse facto motivou a realização do presente estudo, tendo em conta o potencial da CF para colmatar as dificuldades inerentes à análise citomorfológica. Mediante este estudo tornou-se evidente que a CF pode ser utilizada na pesquisa de células epiteliais tumorais no líquido seroso, visto que este método apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade. Este estudo sugere que é possível obter resultados conclusivos ou positivos mediante a CF, mesmo em casos que a AP não consegue determinar um resultado, ou obtém um falso negativo, respetivamente. No entanto, é de realçar que nenhuma das técnicas é completa por si só, sendo que ambas apresentam limitações e o ideal será a sua aplicação em paralelo.

Futuramente, devem ser realizados mais estudos com maior número de amostras, aumentando o número de eventos a adquirir, como por exemplo 10⁶ eventos, para fornecer resultados mais

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

fiáveis e retirar conclusões mais consistentes. Concomitantemente, devem ser desenvolvidos diretrizes para o estabelecimento de critérios de positividade para a presença de células epiteliais.

Capítulo 2 – Relatório de Estágio

1. Laboratório de Patologia Clínica

O CHUCB possui diversos serviços especializados, entre os quais o SPC. Em janeiro de 2000, o SPC passou a ocupar as novas instalações no novo Hospital Pêro da Covilhã. O SPC encontra-se certificado pela Norma 9001:2015, desde 1 de fevereiro de 2006 até a atualidade. Adicionalmente, este serviço encontra-se acreditado pela *Joint Commission Internacional*, continuando a trabalhar no “Programa de Melhoria da Qualidade” (52). A direção do serviço é da responsabilidade da Exma. Dra. Conceição Faria (52).

O SPC tem como missão:

- Recolher produtos biológicos dos utentes que recorrem ao serviço, efetuando a determinação analítica dos parâmetros solicitados, de forma a complementar o diagnóstico clínico e instituição de uma terapêutica adequada;
- Realizar colheitas em segurança, levando em conta o grau de satisfação dos utentes de forma a melhorar a qualidade do serviço prestado;
- Efetuar determinações analíticas fiáveis em tempo útil, baseadas na atualização técnica, na qualidade e na automatização;
- Motivar os colaboradores, delegando níveis de competência e promovendo a formação profissional;
- Participar no ensino pré-graduado e pós-graduado;
- Participar em projetos de investigação (52).

1.1. Áreas Laboratoriais

O SPC no Hospital Pêro da Covilhã é constituído por uma área administrativa, uma área de colheitas e seis áreas principais de diagnóstico, nomeadamente as áreas de Hematologia, Imunoquímica, Microbiologia, Virologia, Autoimunidade e Urgência. No Hospital do Fundão existe uma área administrativa, uma sala de colheitas e duas áreas de diagnóstico, que incluem as áreas de Hematologia e Bioquímica (52).

As etapas dos exames laboratoriais são divididas nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Toda a documentação e regulamentação é disponibilizada mediante a intranet do hospital, no [site http://intranet.chcbeira.pt](http://intranet.chcbeira.pt). O serviço utiliza, como sistema operativo, o “Sistema Informático de Laboratório - *Modulab Gold*”, possui ligação informática aos Serviços de Urgência pelo “Sistema *Alert*” e usufrui do “Sistema *PSM*” que administra o processo laboratorial pré-analítico.

1.2. Fase pré-analítica

A fase pré-analítica engloba o conjunto de atividades realizadas desde a receção da requisição de análise até ao início da fase analítica, incluindo a preparação do doente, colheita, manipulação e armazenamento da amostra biológica (53). No SPC, a fase pré-analítica é esquematizada da seguinte forma:

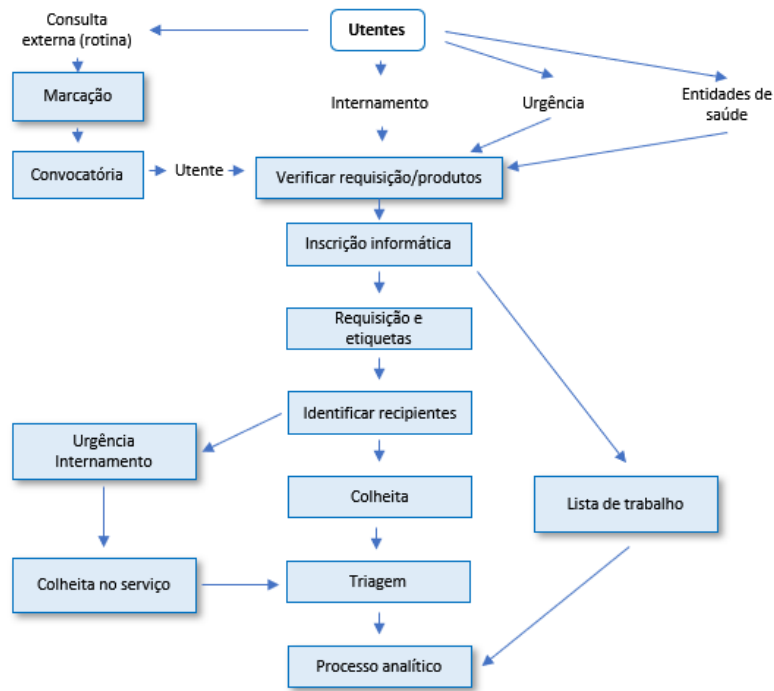


Figura 12: Esquema do processo pré-analítico do SPC do CHUCB (adaptado de 53).

Aquando da prescrição de uma requisição de análise pelo clínico, é gerado um código de barras contendo toda a informação do utente, bem como as análises requisitadas. As amostras são colhidas para os contentores já etiquetados com o código de barras, seguindo-se a sua distribuição pelas secções, conforme a tabela 5. O processo de distribuição é gerido pelo sistema Cobas p612, um equipamento totalmente automatizado que utiliza o *software* Cobas *Infinity*, gerindo de acordo com as prioridades das análises. Em paralelo, realiza alíquotas a partir do tubo primário. As amostras destinadas à secção de Microbiologia são distribuídas manualmente (53).

Tabela 5: Processo pré-analítico das principais amostras biológicas que são analisadas no SPC (53).

Distribuídos pelo Cobas p612	Imunoquímica	
	Sangue periférico em tubo sem anticoagulante com gel ativador de coagulação	Centrifugação (2500 rpm por 10 min)
	Outros líquidos biológicos	
	Urina tipo II	Centrifugação (2000 rpm por 10 min)
	Urina 24h	Sem centrifugação
	Urina aleatória	
	Hematologia	
	Sangue periférico em tubo de citrato trissódico	Centrifugação (3000 rpm por 10 min)
	Sangue periférico, medula óssea e líquidos biológicos em tubos de K3-EDTA	Sem centrifugação
	Sangue periférico em tubos de Mg ²⁺ e citrato trissódico (para velocidade de sedimentação)	
Concentrado de plaquetas em tubo neutro		
Distribuídos manualmente	Microbiologia	
	Hemoculturas, urina, fezes, pús, expetoração, líquidos biológicos, esperma, biópsia e exsudado	Colheita estéril, do local com maior probabilidade de isolar o agente infeccioso

1.3. Fase analítica

A fase analítica corresponde ao conjunto de procedimentos que permitem determinar um valor ou analisar as características de uma amostra (54). Nesta etapa, realiza-se o exame laboratorial, que é controlado pelo Controlo de Qualidade Interno (CQI) e pela participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ). Estes conjuntos de procedimentos são ferramentas utilizadas na prática laboratorial para garantir que a realização dos testes obedece os requisitos para a qualidade (54, 55). No SPC, a fase analítica é esquematizada da seguinte forma:

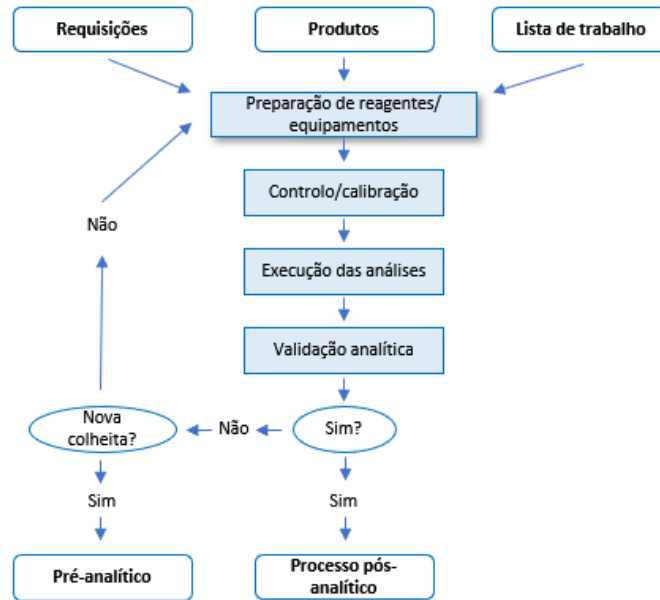


Figura 13: Esquema da fase analítica do SPC do CHUCB (adaptado de 56).

O CQI corresponde a um conjunto de procedimentos visando o controlo da qualidade dos resultados das análises, mediante uma avaliação da precisão e exatidão de cada método (57). O CQI tem como princípio a utilização regular de material de referência que deve ser do mesmo tipo que as amostras analisadas, em que o resultado esperado é conhecido antecipadamente. Se o resultado da análise do material de referência estiver dentro dos limites aceitáveis do valor conhecido, o procedimento de medição é verificado como estável e os resultados para amostras de doentes podem ser relatados com boa probabilidade de serem adequados para uso clínico (58). Caso contrário, quando os controlos não satisfazem os critérios estabelecidos, procede-se à reavaliação dos reagentes, dos controlos, das condições da execução da técnica, ou realiza-se uma nova calibração do equipamento (56). O gráfico de *Levey-Jennings* mostra cada resultado do CQI sequencialmente ao longo do tempo e permite uma avaliação visual rápida do desempenho do método, incluindo a deteção de tendências, possibilitando a aplicação das regras de advertência e rejeição, obedecendo as regras de *Westgard* (58, 59).

A calibração é o procedimento utilizado para estabelecer uma relação entre o sinal analítico obtido do equipamento com a concentração do analito (58). Este processo efetua-se através da análise dos valores obtidos utilizando várias soluções com concentrações conhecidas do analito, nas mesmas condições em que as amostras são submetidas. Os resultados são expressos numa curva de calibração. Deste modo, o valor obtido pela amostra pode ser comparado com a referida curva para determinar a sua concentração (60). Em princípio, uma calibração deve ser realizada apenas quando existem evidências que indicam que a calibração existente não é mais válida, como

exemplos, aquando da expiração da curva de calibração, mudança de lote de reagente, entre outros (58).

A AEQ consiste na avaliação do desempenho de um laboratório em comparação com outros laboratórios (61). Os controlos fornecidos para a realização da avaliação externa da qualidade são processados e analisados como uma amostra, seguindo os procedimentos habituais do laboratório. Os colaboradores têm acesso aos valores fornecidos por via informática e analisam os resultados, registando os eventuais erros ou desvios no relatório informático. Com isso, ações corretivas são efetuadas, visando a diminuição dos erros e a sua respetiva correção (56). No âmbito da AEQ, os programas aos quais o SPC atualmente participa são:

- Sociedade Espanhola de Química Clínica (SEQC);
- *National External Quality Assessment Scheme* (NEQAS) (Reino Unido);
- *External Quality Assurance Services* (EQAS) da Bio-Rad;
- *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEMIC).

1.4. Fase pós-analítica

A fase pós-analítica abrange todos os processos que são realizados após os exames laboratoriais, englobando a validação biopatológica, a receção e validação dos resultados de laboratórios externos e a emissão de resultados. Esta fase é esquematizada da seguinte forma (54, 62):

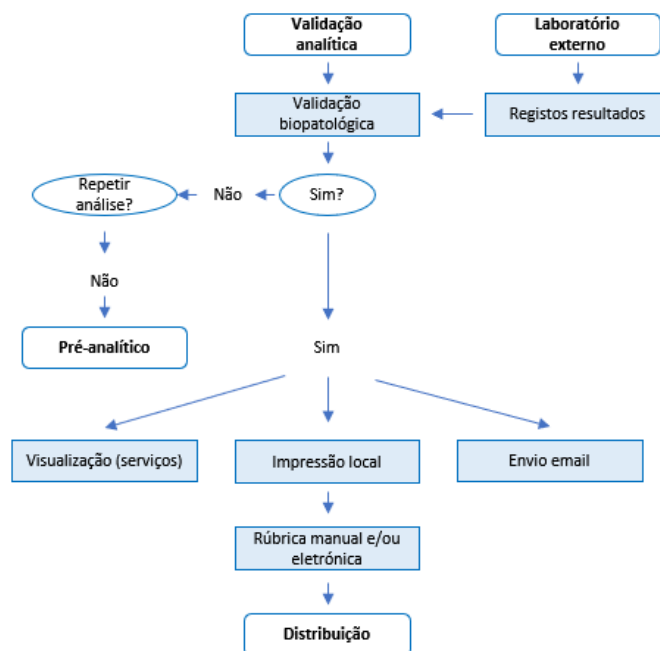


Figura 14: Esquema da fase pós-analítica do SPC do CHUCB (adaptado de 62).

A validação biopatológica corresponde à verificação da compatibilidade e da coerência do conjunto dos resultados das análises efetuadas para um utente, tendo em consideração o seu estado clínico atual, os tratamentos de que foi alvo e os resultados anteriores (62).

2. Secção de Imunoquímica

Na secção de Imunoquímica, vários analitos são analisados automaticamente, mediante várias técnicas, em diversos equipamentos. Atualmente, os equipamentos presentes nesta secção são os Cobas p612, Cobas 411, Architect i2000SR, ImmunoCAP 250, Atellica Neph 630, sistema Hydrasys, sistema Cobas 6000 que é constituído pelos módulos c501 e e601, sistema Cobas 4800 que inclui os módulos Cobas z480 e Cobas x480 e o sistema constituído pelos SediMax e AutionMax.

Nesta secção, o uso do imunoensaio é comum à maioria das outras técnicas analíticas, como a turbidimetria, nefelometria, electroquimioluminescência, quimioluminescência, entre outros, o que justifica a sua importância. Um imunoensaio é um método de análise baseado na ligação competitiva entre um anticorpo marcado e o seu antígeno, utilizado para quantificar os analitos de interesse, como ilustrado na figura 15. Os imunoensaios podem ser classificados em competitivo e não competitivo. No imunoensaio competitivo, uma quantidade conhecida de antígeno marcado compete com o antígeno da amostra por um número limitado de locais de ligação presentes no anticorpo, assim, o valor detetado do antígeno marcado é inversamente proporcional à concentração do antígeno presente na amostra. O imunoensaio em sanduíche é um exemplo de um imunoensaio não competitivo, em que dois anticorpos diferentes criam um “sanduíche” ao redor do antígeno, sendo que um dos anticorpos é marcado (63).

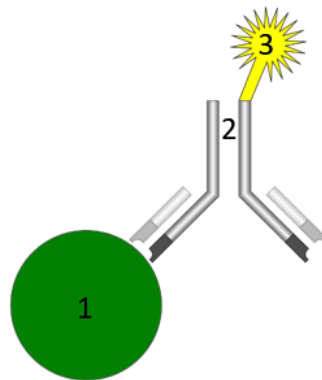


Figura 15: Ilustração dos componentes básicos de um imunoensaio, que incluem o analito (1), o anticorpo (2) e um marcador (3) (adaptado de 63).

2.1. Imunoturbidimetria

A imunoturbidimetria é uma técnica que consiste na quantificação de imunocomplexos em solução, consoante a diminuição da intensidade do feixe incidente, após a sua passagem através da solução, ou seja, mede a luz difratada. Assim, quanto maior for a concentração do analito, maior será a formação de imunocomplexos, resultando numa maior turbidez, que por fim, resulta numa menor intensidade de luz recebida pelo detetor (64).

Adicionalmente, na área de Urgência do SPC, a técnica de imunoturbidimetria é aplicada utilizando uma outra metodologia, denominada ensaio imunoturbidimétrico de inibição otimizado pela utilização de micropartículas (PETINIA), que é um imunoensaio competitivo homogéneo. Esta metodologia baseia-se na competição entre o composto presente na amostra e o que reveste uma micropartícula pelos locais de ligação no anticorpo do reagente de anticorpos contra o composto. Na ausência do composto competidor proveniente da amostra, as micropartículas revestidas aglutinam-se na presença do anticorpo contra o composto. Por outro lado, na presença do composto competidor proveniente da amostra, a reação de aglutinação é parcialmente inibida,

reduzindo a taxa de alteração da absorvância. Mediante a taxa máxima de aglutinação com a concentração mais baixa do composto da amostra e a taxa mínima de aglutinação com a concentração mais elevada na amostra, é possível obter uma curva de inibição da aglutinação dependente da concentração (65).

2.2. Nefelometria

A nefelometria tem como fundamento o conceito de que as partículas numa solução dispersam a luz incidente na solução, ao invés de absorver a luz. Os nefelómetros registam o grau de dispersão, correlacionando essa informação com a concentração de partículas existente na solução. Os imunoenaios por nefelometria baseiam-se na medição da luz dispersada, devido à formação de complexos imunológicos numa solução. A determinação dos antigénios é realizada na zona ascendente da curva de precipitinas, onde existe uma relação direta entre a concentração do antigénio e a densidade ótica (66).

2.3. Electroquimioluminescência

A eletroquimioluminescência é uma técnica em que há a conversão de energia elétrica em luz, utilizando percursoros estáveis na superfície de um elétrodo para a produção de intermediários reativos. Esses intermediários reagem sob uma variedade de condições e formam estados excitados que emitem luz. Associando a eletroquimioluminescência ao imunoenasão, são utilizados dois anticorpos monoclonais específicos ao antigénio, em que um anticorpo é biotinilado e o outro é marcado com ruténio. Estes anticorpos ligam-se ao antigénio presente na amostra, formando um complexo em “sanduíche”. Depois da inclusão de micropartículas revestidas por estreptavidina, o complexo formado liga-se a essas micropartículas, devido à interação entre a biotina e a estreptavidina. Essas micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do elétrodo e é aplicada uma corrente elétrica que induz a emissão de luz, que é medida por um fotomultiplicador. A luz medida é diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra (67, 68).

2.4. Quimioluminescência

O método de quimioluminescência baseia-se na produção de luz resultante de uma reação química, que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante. A energia que resulta da reação química é então transferida para uma molécula instável capaz de passar a um estado eletrónico excitado, emitindo luz ao regressar ao estado inicial (69). No imunoenasão quimioluminescente de micropartículas, a amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas com anticorpos contra o analito que se pretende determinar, são combinadas e incubadas. Com isso, o analito presente na amostra liga-se aos anticorpos correspondentes e, de seguida, retiram-se todos os compostos que não se ligaram aos anticorpos, mediante um processo de lavagem. Posteriormente, adiciona-se o conjugado formado por anticorpos marcados com acridínio, com especificidade para o referido analito. Por fim, adicionam-se as soluções ativadora e pré-ativadora, que resultam na reação de quimioluminescência, sendo esta medida em unidades de luz relativas (RLUs). Existe uma relação direta entre a concentração do analito presente na amostra e as RLUs detetadas no sistema ótico do equipamento (58).

Além de técnicas acima descritas, também são efetuadas técnicas que não estão associadas ao imunoenasão, como a potenciometria e o ensaio colorimétrico.

2.5. Potenciometria

A potenciometria é um método que se baseia na capacidade que certos materiais de membrana possuem para produzir um potencial elétrico. O eletrodo está coberto por uma membrana seletiva que está em contacto com a solução a analisar e uma solução de preenchimento interno, que possui uma concentração fixa. A membrana permite que os iões de ambos os lados se aproximem, gerando um potencial elétrico, que é calculado pela diferença de concentração entre o ião presente na amostra e o ião presente na solução de preenchimento interno. O cálculo da concentração de iões presentes na amostra é corrigido ao calcular o desvio obtido com a medição da solução de preenchimento. Baseando-se neste conceito, existe a potenciometria indirecta, havendo diluição da amostra (58).

2.6. Colorimetria

A colorimetria é um método de análise quantitativo que se baseia na comparação entre uma cor que é produzida por uma reação química com uma cor padrão. A concentração da substância que corresponde à cor padrão é conhecida e, com essa informação, calcula-se a concentração do analito, através da intensidade da cor produzida pelo mesmo (70).

2.7. Parâmetros analisados

As técnicas analíticas acima referidas são aplicadas na análise da maioria dos parâmetros de interesse para a secção de imunoquímica. Esses parâmetros podem ser agrupados segundo a sua finalidade. A seguir, são mencionados os parâmetros analisados automaticamente na secção de imunoquímica, incluindo alguns parâmetros que são analisados na área de Urgência do SPC, nomeadamente fármacos. Adicionalmente, são mencionados os ensaios envolvidos na análise dos referidos parâmetros, bem como os equipamentos nos quais são realizadas as análises.

2.7.1. Perfil hepático

O perfil hepático é usado para detetar, avaliar e acompanhar doenças hepáticas ou lesões hepáticas (58). Os parâmetros que são importantes para a sua avaliação estão indicados na tabela 6.

Tabela 6: Perfil hepático, contendo os respetivos parâmetros, ensaios e equipamento utilizado.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Alanina aminotransferase (ALT)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Aspartato aminotransferase (AST)		
Lactato desidrogenase (LDH)		
Gama-glutamilttransferase (GGT)		
Fosfatase alcalina (ALP)		
Bilirrubina total (BILT)		
Bilirrubina direta (BILD)		
Ácido úrico (UA)		
Creatinina (CRE)		
Ureia (UREA)		
Albumina (ALB)		
Haptoglobulina (HAPT)	Imunoturbidimétrico	
Alfa 1-antitripsina (AAT)		

2.7.2. Perfil pancreático

O perfil pancreático é utilizado no diagnóstico e monitorização da pancreatite aguda e da pancreatite crônica, na avaliação da ação ou secreção da insulina, que tem o seu papel no diagnóstico de Diabetes mellitus, incluindo outras patologias que envolvem o pâncreas (58). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 7.

Tabela 7: Perfil pancreático, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Amilase (AMYL)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Lipase (LIP)		
Glicose (GLUC)		
Péptido-C (PC)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)

2.7.3. Perfil lipídico

O perfil lipídico é utilizado para avaliar o risco de doença arterial coronária. São bons indicadores do risco de enfarte do miocárdio ou de acidente vascular cerebral causados por bloqueio de vasos sanguíneos ou aterosclerose (58). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Perfil lipídico, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Colesterol (CHOL)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Lipoproteína de alta densidade (HDL)		
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)		
Triglicéridos (TRIGL)		
Lipoproteína a (LPA)	Imunoturbidimétrico	Atellica Neph 630
Apolipoproteína A1 (Apo A)	Nefelométrico	
Apolipoproteína B (Apo B)		

2.7.4. Perfil Renal

O perfil renal é pedido para monitorizar distúrbios que afetam a função renal. Normalmente é solicitado como parte de uma triagem geral, em pessoas em risco de desenvolver doença renal ou na monitorização da doença renal (71). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: Perfil renal, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Ácido úrico (UA)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Creatinina (CRE)		
Ureia (UREA)		
Fósforo (P)		
Cistatina C (Cis C)	Nefelométrico	Atellica Neph 630

2.7.5. Metabolismo de ferro

No metabolismo de ferro, estão envolvidos vários analitos que são quantificados no diagnóstico e tratamento de vários tipos de anemia(72, 73). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 10.

Tabela 10: Perfil do metabolismo do ferro, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Ferro (IRON2)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Transferrina (TRSF2)	Imunoturbidimétrico	
Recetor de transferrina (STFR)		
Ferritina (FERR)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)
Folatos (FOL)		
Vitamina B12 (B12)		

2.7.6. Proteínas séricas

As proteínas séricas compreendem analitos que são quantificados em exames de rotina e no pré-operatório, bem como para a determinação do estado nutricional e a triagem de distúrbios renais e hepáticos. A quantificação destas proteínas é útil em várias situações, como nos casos de mieloma múltiplo, na detecção de processos inflamatórios sistêmicos, no diagnóstico de infecções graves, entre outras situações (74, 75). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 11.

Tabela 11: Perfil das proteínas séricas, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Albumina (ALB)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Proteínas totais (PT)		
Proteína-C-Reativa (CRPL3)	Imunoturbidimétrico	
Fator C3c (C3C)		
C4 (C4)		

2.7.7. Marcadores cardíacos

Marcadores cardíacos são substâncias libertadas no sangue quando há lesão cardíaca. São utilizados para diagnosticar patologias cardíacas, como o enfarte do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, a isquemia, a detecção de formas ligeiras de disfunção cardíaca, entre outros (76). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 12.

Tabela 12: Perfil dos marcadores cardíacos, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Creatina Quinase (CK)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Magnésio (Mg)		
Creatina Quinase-MB (CK-MB)	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência	Architect i2000SR
Mioglobina (Mb)		
Troponina (Tn)		
Procalcitonina (PCT)		
L-Homocisteína (HCY)		
Peptídeo natriurético tipo B (BNP)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)

2.7.8. Marcadores tumorais

Marcadores tumorais são substâncias como proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormonas presentes no sangue, na urina ou em outros fluídos corporais, que podem estar elevados com a presença de um determinado tipo de tumor. Os marcadores tumorais são doseados para auxiliar no diagnóstico de uma grande variedade de tumores, bem como na monitorização da resposta ao tratamento das mesmas (77, 78). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 13.

Tabela 13: Perfil dos marcadores tumorais, contendo os respetivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Antígeno do cancro CA 19.9 (CA19-9)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)
Antígeno do cancro CA 125 (CA125)		
Antígeno do cancro CA 15.3 (CA15-3)		
Antígeno do cancro CA 72.4 (CA72-4)		
Antígeno Específico da Próstata total (tPSA)		
Antígeno Específico da Próstata livre (fPSA)		
Alfa-feto proteína (AFP)		
Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	Imunoturbidimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Beta 2-microglobulina (B2MG)		

2.7.9. Perfil endócrino

O perfil endócrino é utilizado no auxílio de diagnóstico de uma grande variedade de situações, em que alguns são o diagnóstico diferencial de hÍper e hipocalcemia, monitorização após a remoção da tiroide, diagnóstico e tratamento de indivíduos com risco de aborto, entre outros (79). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 14.

Tabela 14: Perfil endócrino, contendo os respetivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Gonadotrofina Coriónica Humana (beta-hcg)	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência / Imunocromatografia	Architect i2000SR
Hormona paratiroideia intacta (PTH)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)
Tirotropina (TSH)		
Tri-iodotironina (FT3)		
Tiroxina (FT4)		
Tiroglobulina (Tg)		
Hormona anti-Mülleriana (AMH)		
Vitamina D total		
Cortisol (F)	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência	Architect i2000SR
Estradiol (E2)		
Hormona Folículo Estimulante (FSH)		
Hormona luteinizante (LH)		
Progesterona (P4)		
Prolactina (PRL)		
Globulina de ligação das hormonas sexuais (SHBG)		
Testosterona (T)	Colorimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Cálcio (Ca)		

2.7.10. Fármacos

A monitorização de fármacos consiste na sua quantificação em intervalos pré-determinados a fim de manter uma concentração relativamente constante na corrente sanguínea (58). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Perfil dos fármacos, contendo os respetivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Ácido Valproico	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência	Architect i2000SR
Digoxina		
Carbamazepina		
Vancomicina		
Teofilina		
Amicacina	Ensaio imunoturbidimétrico de inibição otimizado pela utilização de partículas	
Gentamicina		

2.7.11. Drogas de abuso

Os testes de drogas de abuso podem ser realizados na triagem do uso de drogas, no acompanhamento de doentes com problemas de uso abusivo de drogas, bem como para fins legais como no caso de uma ordem judicial, entre outras situações (80). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 16.

Tabela 16: Perfil das drogas de abuso, contendo os respetivos parâmetros e ensaios utilizados.

Parâmetro	Ensaio
Tetrahydrocannabinol (THC)	Imunocromatografia
Benzodiazepinas (BZO)	
Anfetamina (AMP)	
Opiáceos (MOP)	
Cocaína (COC)	

2.7.12. Serologia infecciosa viral

A serologia infecciosa viral inclui a determinação de anticorpos contra os agentes virais ou os antígenos dos agentes virais. É utilizada para avaliar o estado serológico de infeção por vírus, para controlar a necessidade e eficácia de vacinas contra determinados vírus, para monitorizar a evolução da doença após infeção aguda de vírus, sendo que a determinação da infeção viral é especialmente importante em gestantes (81, 82). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 17.

Tabela 17: Serologia infecciosa viral, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Antigénio da superfície de Hepatite B (HBsAg)	Imunoensaio de Electroquimioluminescência	Cobas 6000 (módulo e601)
Anticorpos contra o <i>core</i> de Hepatite B (HBcAc)		
Anticorpos IgM contra o <i>core</i> da Hepatite B (HBcAc IgM)		
Antigénio p24 do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)		
Anticorpo contra Hepatite C (HCVAc)		
Anticorpo IgG/M contra Citomegalovírus (CMVAc)		Cobas e411
Antigénio “e” de Hepatite B (HBeAg)		
Anticorpo contra o antigénio “e” de Hepatite B (HBeAc)		
Anticorpo IgG/M contra Rubéola		
Anticorpo IgG/M contra toxoplasmose		
Anticorpo IgG contra antigénio nuclear do vírus Epstein Barr (EBNA AcIgG)	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência	Architect i2000SR
Anticorpo IgG/M contra antigénio da Cápside Viral (VCA AcIgG/M)		
Anticorpo contra Vírus T-Linfotrópico Humano tipo 1 e 2 (HTLV I/II)		
Anticorpo IgG/M anti Hepatite A (HAVAc)		
RNA do Vírus da Hepatite C (HCV)	Reação em Cadeia da Polimerase	Cobas 4800
RNA do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1)		

2.7.13. Perfil imunológico

O perfil imunológico compreende anticorpos e proteínas que estão associadas a patologias que envolvem componentes do sistema imunológico. O doseamento destes componentes é realizado no auxílio de diagnóstico de várias patologias, como a artrite reumatoide, a doença tiroideia, as Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), distúrbios alérgicos mediados por IgE, entre outros (83, 84). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 18.

Tabela 18: Perfil imunológico, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetro	Ensaio	Equipamento
Imunoglobulina A (IGA)	Imunoturbidimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Imunoglobulina G (IGG)		
Imunoglobulina M (IGM)		
Fator Reumatoide (RF)		
Lambda (LAMB)		Atellica Neph 630
Kappa (KAPP)	Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência	Architect i2000SR
Anticorpo anti-tiroglobulina		
Anticorpo antiperoxidase tiroideia	Imunoensaio com enzima de fluorescência	ImmunoCAP 250
Calprotectina		
IgE específica (sIgE)		
IgE total (tIgE)		
Triptase		

2.7.14. Ionograma

Os eletrólitos estão envolvidos na maioria das principais funções metabólicas do organismo, sendo que o sódio, o potássio e o cloro enquadram-se entre os íons fisiológicos mais importantes. O doseamento desses íons é importante em várias situações, como a avaliação da função renal, na determinação de ocorrência de vômitos e diarreias prolongadas, entre outras situações (85, 86). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 19.

Tabela 19: Ionograma, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Cloro (Cl)	Potenciometria indireta	Cobas 6000 (módulo c501)
Sódio (Na)		
Potássio (K+)		

2.7.15. Serologia infecciosa bacteriana

Na serologia infecciosa bacteriana, são doseados anticorpos contra agentes bacterianos, que proporcionam informações úteis relativamente ao grau de infecção e da evolução de doenças causadas por essas bactérias. Adicionalmente são feitos rastreios com o objetivo de evitar a transmissão de bactérias para os recetores de dádivas de sangue, componentes do sangue, células, tecido e órgãos (87). Os parâmetros importantes para a sua avaliação estão descritos na tabela 20.

Tabela 20: Serologia infecciosa bacteriana, contendo os respectivos parâmetros, ensaios e equipamentos utilizados.

Parâmetros	Ensaio	Equipamento
Anticorpos antiestreptolisina O (ASLOT)	Imunoturbidimétrico	Cobas 6000 (módulo c501)
Anticorpos contra <i>Treponema pallidum</i>	Imunoensaio de Electroquimioluminescencia	Cobas 6000 (módulo e601)

A seguir, são descritas técnicas analíticas de rotina que são aplicadas para a análise determinados parâmetros, na secção de imunoquímica.

2.8. Imunoensaios fluoroenzimáticos

Um alérgico é uma substância capaz de desencadear uma reação alérgica (88). Na grande maioria dos casos, o desencadeamento dessa resposta imunológica é gerada pela imunoglobulina E (IgE) (89, 90). Para a deteção quantitativa dos alérgicos, são realizados testes de IgE total e IgE específica em amostras de soro ou plasma. O teste de IgE total tem como princípio o imunoensaio em sanduíche, como representado na figura 16. Neste teste, utiliza-se anti-IgE acoplado a uma fase sólida, que vai reagir com a IgE total na amostra do doente. Após a lavagem, são adicionados anticorpos contra a IgE, marcados com uma enzima, que de seguida são incubados. Posteriormente, faz-se uma lavagem para eliminar os anticorpos que não formaram complexos e os complexos ligados são incubados com um substrato que emite fluorescência ao reagir com a enzima. A fluorescência do eluído é medida e o seu valor é convertido em concentração do IgE total, com o auxílio de uma curva de calibração. Essa fluorescência é diretamente proporcional à concentração de IgE total na amostra. Este teste é utilizado para confirmar uma suspeita de alergia e determinar o alérgico agressor ou descartar alérgicos para os quais os resultados dos testes são negativos (91).



Figura 16: Fase final do processo de imunoenensaio em sanduíche, em que os anticorpos IgE (verde e amarelo) se ligaram aos anticorpos acoplados à fase sólida, bem como aos anticorpos marcados com a enzima (azul) e o substrato reagiram com a enzima, produzindo fluor (adpatado de 92).

A realização do teste de IgE específica é similar ao do IgE total, mas utiliza determinados alérgenos específicos acoplados à superfície sólida, para reagirem com a IgE específica da amostra do doente. Este teste permite identificar, a nível molecular, qual o componente do alérgeno a que o doente está sensibilizado (92). Adicionalmente, são realizados testes qualitativos e semi-quantitativos para determinar a presença ou não de atopia em doentes (93).

A calprotectina é uma proteína ligante do cálcio e do zinco que está presente predominantemente no citoplasma dos neutrófilos, monócitos e macrófagos. Em casos de DII, os neutrófilos migram através da parede intestinal para o lúmen intestinal, o que resulta em níveis elevados de calprotectina nas fezes. A calprotectina é extraída das fezes com o auxílio de um tampão de extração e, de seguida, é quantificada nas fezes através do imunoenensaio fluoroenzimático, com o princípio de imunoenensaio de sanduíche, usando anticorpos contra a calprotectina (94).

2.9. Reação em cadeia da polimerase

Vírus são estruturas parasitárias acelulares capazes de se reproduzirem somente quando utilizam a maquinaria celular de determinadas células hospedeiras (95).

Além das técnicas aplicadas em bioquímica clínica, também são realizadas técnicas de biologia molecular, em que são realizados um conjunto de procedimentos com a finalidade de quantificar a carga viral nas amostras dos doentes. Mediante estes procedimentos, são quantificados os genótipos 1 a 6 do RNA do vírus da hepatite C (HCV) em soro ou plasma, bem como o RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1 em plasma. Neste processo, uma quantidade conhecida de moléculas de RNA do Padrão de Quantificação (PQ) é introduzida nas amostras. Este conjunto de procedimentos é dividido em quatro processos principais, que são o isolamento do RNA alvo, a transcrição reversa do RNA alvo, a amplificação do cDNA e a deteção (96). Para o isolamento do RNA alvo, os ácidos nucleicos virais são libertados ao adicionar proteinase e reagente de lise à amostra. De seguida, são adicionadas partículas magnéticas de vidro, para que os ácidos nucleicos libertados se liguem à sua superfície de sílica. Após o processo de lavagem, os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas. Os ácidos nucleicos alvo da amostra são amplificados seletivamente com a utilização de *primers* senso e anti-senso específicos do vírus alvo. De seguida, é utilizada uma enzima de polimerase do DNA

termoestável para a transcrição reversa e para a amplificação por PCR. Este processo é repetido por um determinado número de ciclos, aumentando a intensidade de emissão dos corantes fluorescentes das sondas oligonucleotídicas sinalizadoras em cada ciclo, permitindo a detecção e identificação do RNA alvo e do RNA do PQ (58, 97). Quanto maior for o título do HIV-1 ou do HCV na amostra inicial, mais cedo o sinal da intensidade da fluorescência do corante sinalizador ultrapassa o nível de fluorescência da linha de base. Esse sinal é referido como um valor de Limite Essencial (Ct), como representado na figura 17 (58).

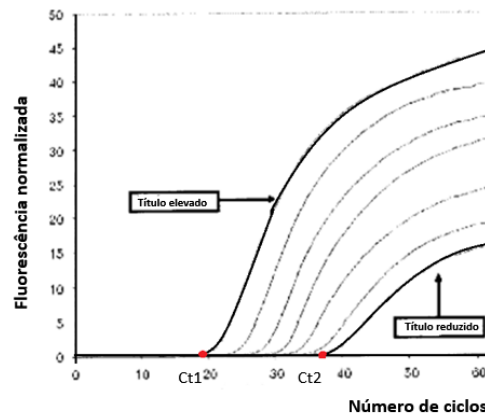


Figura 17: Curvas de crescimento do alvo para uma série de diluições da amostra (adaptado de 98).

Além dos vírus HIV e HCV, os vírus respiratórios são pesquisados, neste caso, por PCR em tempo real. Como os casos de infecção dos vírus respiratórios variam consoante as estações do ano, também são pesquisados diferentes vírus, mediante diferentes painéis. O painel 1 compreende os vírus influenza A e B e os vírus sincicial respiratório A e B. O painel 2 abrange os adenovírus, vírus parainfluenza 1, 2, 3 e 4, enterovírus e metapneumovírus. Como se trata de um PCR em tempo real, a intensidade da fluorescência é medida durante o processo, o que permite a detecção e quantificação da acumulação de produto em qualquer momento (99).

2.10. Electroforese, Imunofixação e focagem isoeletrica

Centenas de proteínas diferentes estão presentes no plasma. Ao dosear a concentração dessas proteínas, é possível obter informações sobre determinadas doenças em diferentes sistemas orgânicos (100).

A **electroforese** é uma técnica em que se aplica um campo elétrico num solvente, visando o transporte de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. A maioria das moléculas biológicas possui uma carga líquida, em qualquer pH que é diferente do seu ponto isoeletrico e migram a uma velocidade proporcional à sua densidade de carga. É possível construir um perfil eletroforético das proteínas do soro, separando as proteínas em cinco frações, por ordem decrescente, sendo posteriormente coradas com um corante apropriado e medidas por densitometria, como ilustrado na figura 18 (101).

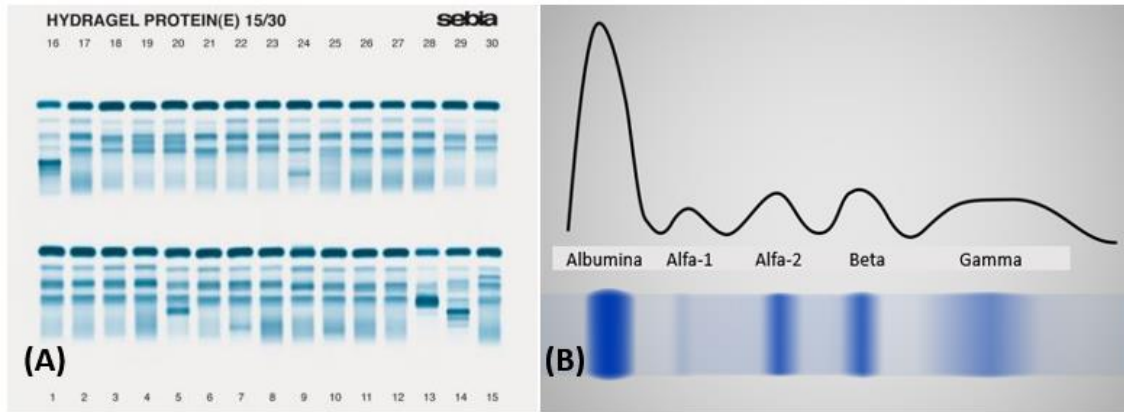


Figura 18: (A) Perfil eletroforético de proteinogramas de 29 amostras, sendo que a amostra 30 é o controle. (B) Interpretação das bandas de eletroforese proteica, numa situação normal (adaptado de 101).

Aplicando a densitometria, é possível determinar a percentagem de cada fração, com base na concentração de proteínas totais. Deste modo, é possível determinar o aumento ou a diminuição da concentração de cada fração, bem como a presença de picos monoclonais, que é caracterizado mediante a imunofixação (58).

A **eletroforese por imunofixação** é uma técnica utilizada para identificar proteínas em misturas complexas, após a separação por eletroforese em géis ou membranas, ou pelo foco isoeletrico. Uma quantidade de anticorpos e fixador são introduzidos na superfície do meio utilizado na eletroforese, visando a formação de grandes precipitados com os homólogos dos anticorpos presentes no meio (102). Cada anticorpo é específico para cadeias diferentes, incluindo as cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM) e as cadeias leves Kappa e Lambda livres e ligadas. Posteriormente, os anticorpos não complexados são removidos do meio, deixando apenas os imunoprecipitados. Para que seja possível caracterizar as bandas monoclonais, é utilizado em paralelo um anti-soro poliespecífico com o intuito de produzir um padrão eletroforético de referência (103). Na secção de imunquímica são utilizados vários géis e reagentes para imunofixação, em que a escolha de cada procedimento e gel baseia-se em algoritmos representados pela figura 19.

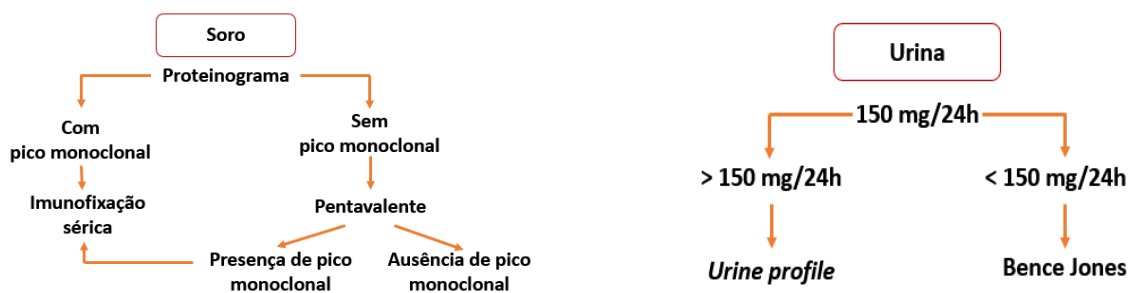


Figura 19: Algoritmos utilizados para escolher o procedimento e o gel de imunofixação.

A imunofixação sérica serve para detetar proteínas monoclonais existentes no soro. As imunoglobulinas monoclonais apresentam-se sob a forma de bandas que representam picos monoclonais, situadas principalmente nas zonas da beta ou da gama globulinas (104). Quanto à imunofixação pentavalente, é utilizado um antissoro poliespecífico com anti-cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM) e as cadeias leves Kappa e Lambda livres e ligadas, que permitem detetar a maioria das proteínas monoclonais e oligoclonais no soro humano. Este procedimento é

realizado quando o proteinograma não apresenta alterações, como forma de rastreio e confirmação da ausência de picos monoclonais (105).

Relativamente às amostras urinárias, a imunofixação de painel alargado é realizada quando a proteinúria é superior ao valor do *cutoff* de 150 mg/24h. Esta imunofixação permite identificar as principais proteínas presentes na urina, para determinar o tipo de insuficiência renal existente, ou seja, os tipos glomerular, tubular ou mista. Adicionalmente, permite a deteção das imunoglobulinas monoclonais e policlonais G, A e M, bem como das cadeias leves livres policlonais e monoclonais Kappa ou Lambda, na urina (106). Por fim, a imunofixação das proteínas Bence-Jones permite detetar e identificar as cadeias leves livres monoclonais Kappa e Lambda na urina. A produção excessiva dessas proteínas são pode estar associada a casos de mieloma múltiplo (107).

A técnica de **focagem isoeletrica** consiste num método de eletroforese de alta resolução em gel de agarose, seguido de imunofixação realizado com antissoros anti-IgG. Esta técnica destina-se à deteção e identificação de determinados perfis IgG oligoclonais nas bandas eletroforéticas do líquido cefalorraquidiano e confirmação do carácter das imunoglobulinas do mesmo. Esta técnica está indicada quando há suspeita de algumas doenças do sistema nervoso central, como a esclerose múltipla (108).

2.11. Imunofluorescência indireta

A *Rickettsia conorii* é uma bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, que provoca a febre escaro-nodular mediterrânea nos humanos (109). A *Coxiella burnetii* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, que pode provocar a febre Q (110). A imunofluorescência indireta é a técnica utilizada com mais frequência na deteção de anticorpos IgG da *Rickettsia conorii* e dos anticorpos IgG e IgM da *Coxiella burnetii*, em soro ou plasma humano. Esta técnica baseia-se na reação entre os anticorpos presentes no soro ou plasma da amostra com os antígenos das bactérias presentes nos poços das lâminas. De seguida, os antígenos e os anticorpos que não formaram complexos são eliminados por um processo de lavagem. Desta forma, o complexo antígeno-anticorpo remanescente é revelado mediante a aplicação de globulina anti-humana marcada com fluoresceína, sendo observado através de um microscópio de fluorescência. Um resultado positivo é quando se observam pontos de fluorescência verde na amostra em estudo, enquanto que num resultado negativo não é observada a referida fluorescência, como representado na figura 20 (111, 112).

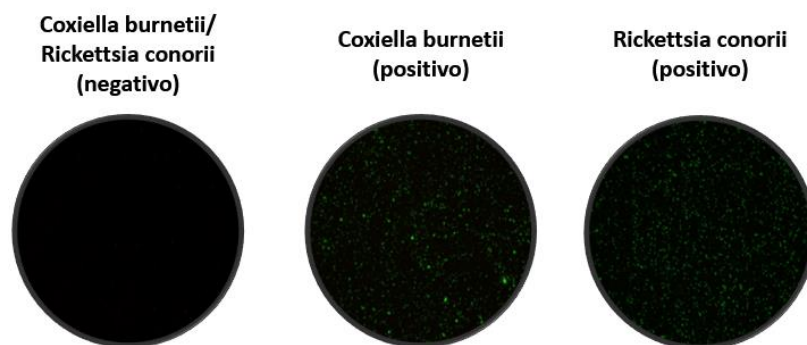


Figura 20: Exemplos de resultados positivo e negativo do teste de imunofluorescência indireta para as *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii* em amostras de soro, visualizado com microscópio de fluorescência (adaptado de 113, 114).

2.12. Testes rápidos

Os testes rápidos utilizam o imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral para a detecção qualitativa de determinados fármacos e seus metabolitos na urina. Este imunoensaio é baseado no princípio da ligação competitiva, ou seja, os fármacos presentes na amostra competem com o respectivo conjugado por locais de ligação nos anticorpos específicos. Ao realizar o teste, se o fármaco presente na urina não ultrapassar o valor de *cutoff*, os locais de ligação do seu anticorpo específico não ficam saturados. Por sua vez, esses anticorpos que não se ligaram ao fármaco vão reagir com o conjugado de fármacos-proteínas e uma linha visível colorida vai aparecer na região da linha do teste, sendo considerado um resultado negativo. Se o fármaco ultrapassar o valor de *cutoff* da concentração, os locais de ligação ao anticorpo ficam saturados, não ocorre reação entre o anticorpo e o conjugado de fármacos-proteínas, resultando na ausência de uma linha na região do teste e o resultado é considerado como positivo. As três interpretações estão representadas na figura 21. Os fármacos testados são benzodiazepinas, cocaína, anfetaminas, tetrahydrocannabinol e opiáceos (115, 116).

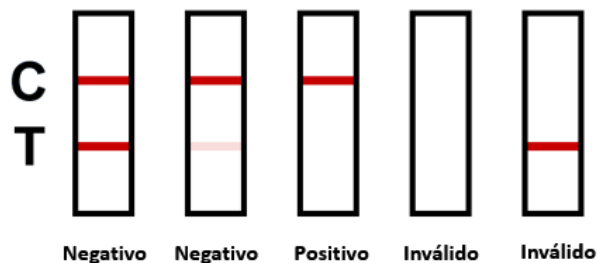


Figura 21: As possíveis interpretações, quando da realização do teste rápido de imunoensaio de fluxo lateral, para a detecção qualitativa de drogas na urina (adaptado de 115).

O imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral também é utilizado para detecção qualitativa de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na urina, para detecção de gravidez numa fase inicial. Como princípio, este teste utiliza anticorpos monoclonais específicos para hCG na região da linha de teste, enquanto utiliza anticorpos policlonais na região da linha de controle. Se, na região da linha do teste, aparecer uma linha colorida, considera-se que o resultado é positivo, caso contrário, o resultado é considerado negativo (115, 117).

2.13. Urianálise

A urina tipo II é analisada automaticamente nos equipamentos SediMax e AutionMax, visualizando o sedimento urinário e realizando o exame físico e químico, por microscopia digital e pelo método de fotometria por reflectância, respectivamente. O exame microscópico do sedimento urinário é importante para diagnosticar e acompanhar uma série de condições que afetam os rins, como exemplo, na avaliação de doentes com Lesão Renal Aguda (118). Neste teste, é possível identificar elementos presentes na urina, como eritrócitos, células epiteliais, leucócitos, bactérias, parasitas, cristais e cilindros (58). O exame físico e químico da urina é importante no auxílio do diagnóstico de uma variedade de patologias, como nefropatias hipertensivas ou diabéticas, entre outros. Neste exame são avaliados a cor, a densidade e o aspeto da urina e são utilizadas tiras com reagentes que permitem avaliar o valor de vários parâmetros, nomeadamente o pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue na urina (58). No método de fotometria por reflectância, uma luz é emitida de uma lâmpada com comprimentos de onda e ângulos definidos. Esta luz incide na superfície de

frações da tira de teste, que contêm determinados reagentes. Quando a urina a analisar entra em contacto com esses reagentes, ocorrem reações químicas que resultam na alteração da cor dessas frações. A luz refletida das tiras diminui de intensidade dependendo da cor produzida e é detetada pelo fotodetector, que converte esse sinal para os valores de refletância que são comparados com intervalos de referência para cada parâmetro, que são transmitidos semi-quantitativamente (58).

3. Secção de Microbiologia

Na secção de Microbiologia, são analisados vários microrganismos, incluindo bactérias, micobactérias, parasitas, fungos e vírus, provenientes de diversas amostras do organismo humano, mediante procedimentos manuais e/ou automáticos. Atualmente, os equipamentos presentes nesta secção são os BACT/ALERT 3D, Vitek 2 Compact, BACTEC MGIT 320, FilmArray e o sistema composto pelos *Plate Washer*, *Plate Reader* e o software *QuantiFERON-TB Gold Plus*.

3.1. Meios de cultura

Os meios de cultura possuem diversos nutrientes e outros constituintes, que permitem ou inibem o crescimento de determinados microrganismos (119). Existem várias formas de classificar os meios de cultura, sendo que pela sua funcionalidade, podem ser classificados como meios não seletivos, seletivos e diferenciais. Os meios não seletivos permitem o crescimento da maioria dos microrganismos, os seletivos permitem o crescimento de microrganismos com determinadas características, inibindo os microrganismos que não possuem essas características e os meios diferenciais permitem que colónias de determinados microrganismos exibam características que os diferenciam de colónias de outros microrganismos (120). Os meios de cultura frequentemente utilizados no SPC do CHUCB estão descritos na tabela 21.

Tabela 21: Meios de cultura utilizados no SPC do CHUCB.

Meios	Classificação	Principais características	Função	Referências
Gelose de sangue	Não seletivo Diferencial	Sangue de carneiro (5%) Mistura de peptonas altamente nutritiva	Crescimento de microrganismos não fastidiosos Diferenciação pelo tipo de hemólise Isolamento de colónias	(121)
Gelose de sangue CNA	Seletivo	Ácido nalidíxico e colimicina	Inibição de Gram-negativo Crescimento de Gram-positivo	
Gelose MacConkey	Seletivo Diferencial	Cristal de violeta e sais biliares	Inibição de Gram-positivo Crescimento de Gram-negativo Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose Deteção de <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	
Gelose MacConkey com sorbitol	Diferencial	Sorbitol	Identificação e isolamento de colónias de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	
Gelose Chocolate PolyviteX™	Não seletivo Diferencial	Hemina Dinucleótido de nicotinamida e adenina	Crescimento de microrganismos fastidiosos (<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> spp. e <i>S. Pneumoniae</i>) Isolamento de colónias	
Gelose Chocolate	Seletivo	Vancomicina, colistina,	Isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>	

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

PolyviteX™ VCAT3		anfotericina e timetroprim	
Gelose Chocolate Haemophilus	Seletivo	Bacitricina	Isolamento de <i>Haemophilus</i> spp.
Gelose SS	Seletivo Diferencial	Cristal de violeta e sais biliares	Inibidor de Gram-positivo Isolamento de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> spp. Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose bem como das redutoras e não redutoras de tiosulfato
Gelose Campyloset	Seletivo	Sangue de carneiro Agentes redutores Antibióticos e antifúngicos específicos	Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. Intestinal
Gelose Yersinia	Seletivo Diferencial	Cefsulodina, Irgasan, Novobiocina (CIN) Manitol e vermelho neutro Cristal violeta, colato, desoxicolato	Inibição de Gram-positivo Isolamento de <i>Yersinia</i> spp.
Gelose Pylori	Seletivo	Plasma de cavalo Polyvitex™ Antibióticos específicos	Isolamento de <i>Helicobacter pylori</i>
Gelose Manitol Salgado	Seletivo Diferencial	Manitol Cloreto de sódio	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras de manitol
Gelose Mueller- Hinton	Não seletivo	Concentração de iões bivalentes ajustada Baixa concentração de timina-timidina	Antibiogramas por difusão de discos Crescimento de bactérias não fastidiosas
Gelose Granada	Seletivo Diferencial	Granadaene Metotrexano	Isolamento do <i>Streptococcus</i> do grupo B (<i>S. agalactiae</i>)
Gelose Candida	Seletivo Diferencial	Hexosaminidase Antibióticos específicos	Inibição de crescimento de bactérias Crescimento de leveduras Identificação de <i>Cândida albicans</i>
Gelose Sabouraud	Seletivo	Gentamicina Cloranfenicol Peptonas e dextrose pH levemente ácido	Isolamento de leveduras e fungos
Gelose Sabouraud para dermatófitos	Seletivo	Semelhante ao Sabouraud, com adição de actidiona (cicloheximida)	Crescimento de dermatófitos (<i>Microsporium</i> , <i>Tricophyton</i> e <i>Epidermophyton</i> spp.)
Meio de pesquisa de MRSA	Seletivo Diferencial	Cefoxitina Outros antibióticos	Deteção de <i>Staphylococcus Aureus</i> Resistentes a Meticilina (MRSA)
Gelose Carba Smart	Seletivo Diferencial	Mistura seletiva de OXA Mistura seletiva de CARB	Deteção de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase

Avaliação do CD326 como marcador para a pesquisa de células neoplásicas em amostras de líquidos serosos

Caldo de carne (líquido)	Não seletivo Diferencial	Dextrose Partículas de carne Cloreto de sódio	Diferenciação de <i>Clostridium</i> spp. Determinação de atividade proteolítica de anaeróbios	(122)
Todd-Hewitt (líquido)	Seletivo	Gentamicina Ácido nalidíxico Peptonas Dextrose	Isolamento de <i>Streptococcus</i> do grupo B	(123)
Tetrionato (líquido)	Seletivo	Tiosulfato de sódio e tetrionato Sais biliares e carbonato de cálcio	Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.	(121)
Meio de Lownstein (semi-sólido)	Seletivo	Glicerol, fécula de batata, sais, ovos e verde malaquita	Isolamento de micobactérias	
Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (líquido)	Seletivo	Mistura de enriquecimento OADC Mistura de antibióticos PANTA	Deteção e recuperação de micobactérias	(124)

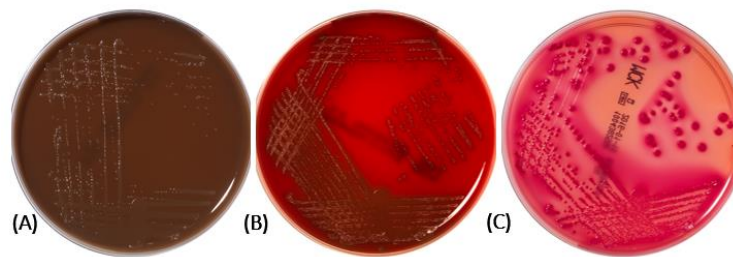


Figura 22: Exemplos de meios utilizados no SPC. Gelose Chocolate PolyviteXTM (A), Gelose Sangue (B) e Gelose MacConkey (C) (adaptado de 121).

Além do meio de cultura, os microrganismos também necessitam de condições ambientais ideais. Os quatro fatores ambientais mais importantes incluem a disponibilidade de oxigênio e dióxido de carbono, a temperatura, o pH e a umidade do meio e da atmosfera. Quanto ao primeiro fator, as bactérias são aeróbias, que utilizam o oxigênio como um receptor final de elétrons, anaeróbias facultativas, que utilizam o oxigênio no seu metabolismo, mas podem crescer sem a presença do mesmo, ou estritamente anaeróbias, que não crescem com a presença de oxigênio. Quanto à temperatura, as bactérias patogênicas multiplicam-se melhor à temperatura do hospedeiro humano. Mas também existem bactérias que crescem melhor a temperaturas de 30°C e outras a 42°C. Quanto ao pH, a maioria das bactérias clinicamente relevantes preferem uma faixa de pH de 6,5 a 7,5, sendo denominados de neutrófilos. Os acidófilos preferem um pH inferior a 5,5 enquanto que os alcalinófilos preferem um pH superior a 8. Quanto à umidade, a perda da água dos meios de cultura por evaporação prejudica o crescimento bacteriano, visto que são essenciais para as vias metabólicas bacterianas e também ocorre um aumento relativo da concentração de soluto do meio, que pode causar a lise bacteriana por choque osmótico. Com isso são adotadas medidas para manter a umidade durante todo o processo de incubação, como exemplo, a vedação das placas de agar (119).

3.2. Observação ao microscópio e colorações

A microscopia ótica é um método frequentemente utilizado, tanto na visualização direta de microrganismos em amostras biológicas, como na caracterização dos microrganismos cultivados (119). As amostras biológicas podem ser preparadas para visualização direta, mediante montagens a fresco, ou para visualização após a coloração, em que as amostras são coradas por técnicas de coloração, entre os quais as colorações de Gram e de Ziehl-Neelsen, (125).

3.2.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é utilizada para detectar quase todas as bactérias clinicamente importantes. Esta técnica é utilizada para dividir a maioria das espécies bacterianas em dois grandes grupos, as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas, como exemplificado na figura 23. O procedimento desta técnica envolve a fixação da amostra na superfície da lâmina, por aquecimento ou com a utilização de metanol. Posteriormente, é aplicado o corante primário (Cristal de Violeta) e, de seguida, é aplicado um mordente (iodo) para ligar quimicamente o corante primário à parede celular bacteriana. O diferenciador (álcool-acetona) é aplicado para descorar as bactérias Gram-negativas e, por fim, é aplicado o corante secundário (safranina) para corar as bactérias descoradas. O princípio desta técnica baseia-se na diferença entre as paredes celulares das bactérias, em que as Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano com várias ligações cruzadas com ácido teicóico e as Gram-negativas possuem uma camada mais fina de peptidoglicano e uma bicamada lipídica externa. As ligações cruzadas com ácido teicóico e a espessa camada de peptidoglicano contribuem na resistência das Gram-positivas à descoloração do álcool, enquanto que a bicamada lipídica é desidratada pelo diferenciador e a camada de peptidoglicano não é suficientemente espessa para impedir que as Gram-negativas sejam descoradas pelo diferenciador, perdendo o corante primário (119).

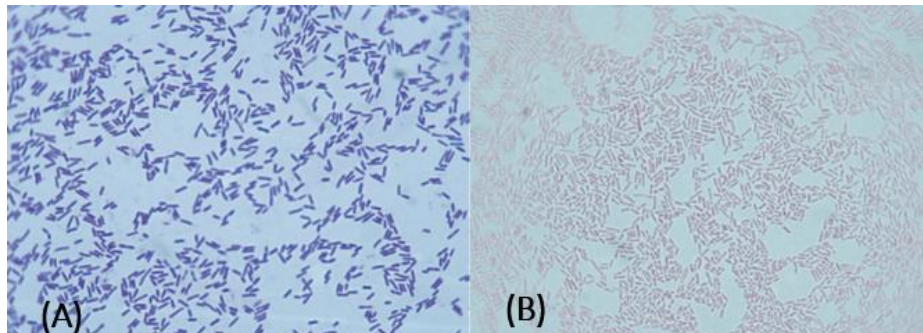


Figura 23: Exemplo de bacilos Gram-positivos (A) e Gram-negativos (B) (adaptado de 119).

3.2.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Existem subgrupos de bactérias, como as micobactérias, que possuem paredes celulares com ácido micólico. Essas bactérias são resistentes a descorantes álcool-ácido, sendo denominadas de bactérias álcool-ácido resistentes. A coloração de Ziehl-Neelsen é uma técnica de coloração projetada para esse subconjunto de bactérias. Como princípio, essa técnica expõe as bactérias a altas temperaturas para permitir que o corante primário (Fucsina Básica) penetre na parede celular das bactérias álcool-ácido resistentes. De seguida, é aplicado um descorante álcool-ácido, que descora todas as bactérias, excetuando as referidas bactérias álcool-ácido resistentes. Por fim, é

aplicado um corante secundário (Azul de Metileno) para corar as células descoradas e servir de contraste (119).

3.3. Urina

Os procedimentos realizados com a urina são urocultura, exame citológico e testes rápidos para a detecção de antigénios para diagnóstico de infeção por *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*. A urocultura é efetuada quando a urina é semeada em meios de cultura de Gelose Sangue e Gelose MacConkey, encubando de 18 a 24h a 35°C e também é semeada no meio de Gelose Cândida, quando há suspeita de candidíase. A sementeira é efetuada com uma ansa calibrada de 1 µL para permitir a contagem das Unidades Formadoras de Colónias/mL (UFC/mL) (126). Assim, quando a contagem for inferior a 10⁴ UFC/mL, é considerado um caso de contaminação do meio, entre 10⁴ e 10⁵ UFC/mL é considerado um resultado duvidoso e quando é superior a 10⁵ UFC/mL é considerado um resultado positivo quanto à presença de um agente causador de infeção bacteriana (119).

O exame citológico é realizado automaticamente, através do aparelho SediMAX, mas por vezes, pode ser realizado manualmente, através da análise microscópica (126). Neste exame, é avaliada a presença ou ausência de elementos figurados como leucócitos, eritrócitos e células epiteliais na urina e é determinada a significância da sua contagem, em casos positivos. Também é determinada a presença de cilindros, cristais, bactérias ou leveduras (127).

Relativamente ao teste rápido para a detecção de antigénios urinários, é realizado um teste de imunoensaio de fluxo lateral, em que se utiliza uma tira revestida com uma faixa de anticorpos contra *L. pneumophila*, uma outra faixa de anticorpos contra *S. pneumoniae* e uma faixa de anticorpos anti-IgG, servindo este último como linha de controlo. Caso o resultado for positivo, este pode ser confirmado repetindo o teste, após ferver a amostra por aproximadamente 10 minutos e deixar arrefecer, visto que *L. pneumophila* e *S. pneumoniae* são resistentes a altas temperaturas (119, 126).

3.4. Fezes

Mediante as amostras de fezes recebidas de frascos fornecidos pelo laboratório, podem ser realizadas coproculturas e testes rápidos para detecção de bactérias, parasitas, vírus e sangue oculto nas fezes (126).

A **coprocultura** é realizada com a sementeira de amostra de fezes por quadrantes nos meios de Gelose MacConkey, Gelose SS (35°C por 24h), Gelose Yersinia (30°C por 24h) e Gelose Campyloset (42°C por 48h, em atmosfera de microaerofilia). Em casos de fezes originárias de crianças com idade inferior a 5 anos, também é semeada no meio de Gelose E.coli (O:157). Adicionalmente, também é realizada a sementeira em meio líquido de tetrato e lugol (35°C por 6h), para de seguida ser semeada no meio Gelose SS (126).

Quanto aos **testes rápidos parasitológicos**, são realizados testes de concentração de parasita e teste de detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia lamblia*. No teste de concentração de parasitas é realizada a concentração da amostra para, posteriormente, realizar a análise microscópica da presença de larvas ou ovos de helmintas e oócitos de protozoários (126, 128). O teste de detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia lamblia* é realizado mediante um imunoensaio de fluxo lateral para

a detecção qualitativa de antígenos dos respectivos parasitas. A amostra reage com as faixas de partículas revestidas com anticorpos contra *Cryptosporidium* e uma outra faixa revestida com anticorpos contra *Giardia* (129).

Quanto aos **testes rápidos para detecção vírica** são realizados dois testes de imunoensaio de fluxo lateral, um para a detecção de *Rotavírus* e *Adenovírus* e o outro para a detecção de *Norovírus*. Para a detecção de *Rotavírus* e *Adenovírus*, são utilizadas duas tiras revestidas com faixas de anticorpos monoclonais contra *Rotavírus* e outra faixa revestida com anticorpos monoclonais contra *Adenovírus*, representando as linhas de teste. As duas tiras também estão revestidas com faixas de anticorpos policlonais contra proteína específica, representando a linha de controlo (130). Para a detecção de *Norovírus*, são utilizados anticorpos biotinilados ou marcados a ouro, que são específicos para o vírus. Na presença de *Norovírus* numa amostra, formam-se imunocomplexos com os anticorpos em suspensão. Essa suspensão é pipetada para uma tira revestida com estreptavidina existente na linha de teste, que se liga aos imunocomplexos introduzidos, através da biotina acoplada ao anticorpo, aparecendo uma faixa vermelha. Na linha de controlo, ligam-se os anticorpos que não formaram complexo, marcados a ouro (131).

Os **testes rápidos para detecção bacteriana** incluem testes direcionados ao *Clostridium difficile* e ao *Helicobacter pylori* (126). Quanto ao *Clostridium difficile*, é realizado um teste imunocromatográfico qualitativo para detecção em simultâneo do antígeno glutamato desidrogenase e das toxinas da bactéria. As duas faixas de teste são formadas por uma membrana de nitrocelulose revestida com anticorpos monoclonais, em que um é contra o referido antígeno e o outro é contra as toxinas. A linha de controlo é revestida com anticorpos de antiperoxidase de rábano. Se o resultado for positivo só na faixa de antígeno, significa que há presença de *C. difficile* nas fezes, mas se o resultado for positivo nas duas faixas, significa a bactéria presente é produtora de toxinas (132). O teste de *Helicobacter pylori* é um teste imunocromatográfico, em que a faixa de teste é formada por uma membrana de nitrocelulose revestida com anticorpos monoclonais contra *Helicobacter pylori*, conjugados com microesferas de latex e a faixa de controlo é composto por um reagente que se liga ao conjugado de controlo (133).

O **teste rápido para pesquisa de sangue oculto nas fezes** é um ensaio imunocromatográfico projetado para realizar a detecção de hemorragias causadas por várias doenças do trato gastrointestinal, como o cancro do cólon, úlceras, entre outros. A hemoglobina migra na membrana por ação capilar e reage com os anticorpos contra a hemoglobina existentes na faixa de teste, formando uma linha colorida, que é interpretada como um resultado positivo (134).

3.5. Hemoculturas

No SPC, chegam 4 garrafas de hemoculturas com as amostras e estas são introduzidas no sistema BACT/ALERT 3D, que realiza a incubação, agitação e detecção da presença de microrganismos nas amostras. A incubação é realizada durante 5 a 7 dias, a 35°C, mas em casos de suspeita de endocardite ou brucelose, incuba-se durante 28 dias (126). As garrafas de hemocultura sinalizam quando há crescimento de bactérias e leveduras no sangue, mediante a alteração da cor do fundo das garrafas. Essa alteração ocorre porque o CO₂ produzido pelos microrganismos presentes na amostra difunde-se através de uma membrana semipermeável existente na garrafa e reage com a água, formando iões de hidrogénio. Com isso, o indicador que apresenta uma cor verde ou azul escura quando possui um pH alcalino, altera-se para um verde claro ou amarelo aquando do pH ácido. Nesses casos, uma luz emitida por um díodo é refletida pelo fundo da garrafa, produzindo um sinal que aumenta de voltagem proporcionalmente à intensidade de luz refletida, que por sua

vez é proporcional à concentração de CO₂ produzido (119). Assim, a amostra é semeada em meios de cultura e é preparada uma lâmina para coloração de Gram. No caso de amostras provenientes de garrafas de aerobiose ou pediátricas, a sementeira é realizada nos meios de Gelose MacConkey e Sangue, sendo estes incubados em atmosfera de aerobiose e de CO₂, respetivamente e ambos incubam a 35°C, de 24 a 48h. Quando as amostras advêm de garrafas de anaerobiose, a sementeira é realizada nos meios de Gelose Sangue e PVX, são incubados em atmosfera de anaerobiose e de CO₂, de 48h e de 24 a 48h, respetivamente e ambos incubam a 35°C (126).

3.6. Soro

São realizados os testes serológicos de Rosa Bengala, Widal-Wright, VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) e RPR (*Rapid Plasma Reagin*) (126). O teste de Rosa Bengala é um teste de rastreio para a deteção de *Brucella* spp., um cocobacilo Gram-negativo responsável pela brucelose. Neste teste, o soro do doente é pipetado para um reagente que consiste numa suspensão padronizada de antigénios corados da *Brucella* spp. Quando a amostra possui anticorpos contra a *Brucella* spp., ocorre uma reação de aglutinação, visível a olho nu, com intensidades variáveis. No teste de Widal-Wright, são utilizadas suspensões com antigénios do tipo O (somático) e H (flagelar) que aglutinam na presença dos anticorpos correspondentes. Em casos de infeção por *Salmonella* spp, ocorre a reação de aglutinação na presença de ambos os tipos de antigénios (O e H) e por *Brucella* spp., a aglutinação ocorre apenas na presença do antigénio O. Nos casos positivos, são realizadas diluições do soro do doente de 1/20, 1/40, 1/80, assim sucessivamente, assumindo o resultado positivo com maior diluição da amostra (135). Para diagnosticar a sífilis (causada pelo *Treponema pallidum*), normalmente são utilizados testes serológicos que são os biologicamente não específicos e os específicos, que correspondem aos treponémicos e não treponémicos, respetivamente. Os não treponémicos são utilizados como testes de rastreio e, quando há positividade, são confirmados pelos testes treponémicos. Durante a fase inicial da sífilis, são desenvolvidos IgM e IgG contra os lípidos libertados pelas células danificadas, sendo esses anticorpos doseados pelos testes não treponémicos. No teste não treponémico, é utilizado o antigénio cardiolipina, que se aglutina com os dois anticorpos. Os dois testes não treponémicos mais comuns são do VDRL e o RPR. Adicionalmente, somente o VDRL é utilizado na análise do líquido cefalorraquidiano, para diagnosticar a neurosífilis (136).

3.7. Aparelho respiratório

Relativamente ao aparelho respiratório, são colhidas amostras de expetorações, secreções brônquicas, aspirados brônquicos e lavados broqueoalveolares (LBA) (126).

Quando a amostra de expetoração chega à secção, é efetuada a verificação do aspeto macroscópico e a realização de um esfregaço por esmagamento para as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen, com o intuito de verificar a qualidade da amostra e a presença de bacilos álcool-ácidos resistentes, respetivamente. Quando solicitado, é realizada uma alíquota para análise na secção de micobactérias. Ao observar a lâmina submetida à coloração de Gram, se forem observados menos que 5 células epiteliais/campo e mais que 20 leucócitos/campo, a amostra é considerada adequada para sementeira por quadrantes nos meios de Gelose Sangue (em atmosfera de CO₂), Gelose Chocolate Haemophilus e Gelose MacConkey e são incubados de 24 a 48h, a 35°C (126).

O aspirado é semeado nas mesmas condições que as expetorações, enquanto que o LBA é processado de uma outra forma. Normalmente, 3 a 4 frações de amostras de LBA chegam ao SPC,

em que a primeira, correspondente à fração brônquica, é utilizada para a cultura de BAAR, a segunda é utilizada para a sementeira e análise ao microscópio e a terceira é analisada na secção de hematologia, por CF. A sementeira é realizada para contagem, com uma ansa calibrada de 10 µL, em Gelose Chocolate PVX e a incubação é realizada em atmosfera de CO₂, por 24 a 48h, a 35°C. Utilizando um volume mínimo de amostra de 5 mL, a amostra é centrifugada e com o sedimento, são preparadas lâminas para as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen, por citocentrifugação. Quando a contagem for superior a 10⁵ UFC, considera-se a existência de um agente causador de infeção respiratória (126).

3.7.1. Análise de micobactérias

As amostras destinadas à secção de micobactérias chegam em alíquotas, semeadas em meio Lowenstein ou em tubos especializados para ensaios de libertação de interferão-gama (IGRA). Relativamente às amostras que chegam em alíquotas, é preparada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) e N-acetil-L-cisteína (NALC) para a digestão e descontaminação das referidas amostras. Posteriormente, a amostra é semeada num tubo indicador de crescimento de micobactérias e num meio Lowenstein. O tubo indicador de crescimento de micobactérias é introduzido no BACTEC MGIT 320 e encuba a 37° C (137). No fundo do tubo existe um composto fluorescente sensível à presença de oxigénio existente no meio. Inicialmente, a elevada concentração de oxigénio anula a emissão de fluorescência, sendo detetada apenas uma pequena quantidade de fluorescência. Posteriormente, com a respiração dos microrganismos, a concentração do oxigénio diminui e a fluorescência é emitida com maior intensidade, detetável pelo equipamento que sinaliza a amostra como positiva. As amostras que não positivam após 42 dias são consideradas negativas (138). De seguida, as amostras positivas são semeadas no meio de Gelose Sangue e são preparadas lâminas para coloração de Ziehl-Neelsen. Se houver crescimento no meio de Gelose Sangue, é sugestivo da presença de contaminantes. Das amostras positivas sem contaminantes, é realizado o teste de identificação (ID) das micobactérias e, se for identificado o *M. tuberculosis*, é realizado o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA). Normalmente, no meio de Lowenstein (encuba até 42 dias, a 37°C), ocorre formação de colónias sugestivas de micobactérias depois de realizar o ID e TSA das amostras semeadas no tubo indicador de crescimento de micobactérias, mas se houver crescimento antes, é preparada uma lâmina para Ziehl-Neelsen e de seguida, é efetuado o ID (139).

As amostras que chegam à secção de micobactérias semeadas em meio Lowenstein são processadas como anteriormente descrito, mas se o ID acusar a presença de *M. tuberculosis*, uma colónia é introduzida no tubo indicador de crescimento e a amostra é processada até realizar o TSA (139).

Quanto aos IGRA, chegam ao SPC tubos especializados com sangue total, que incluem os tubos de Nil, TB1, TB2 e mitógeno. Os tubos TB1 e TB2 possuem um cocktail de péptidos que simulam as proteínas ESAT-6 e CFP-10, concebidos para induzir respostas imunitárias pelas células CD⁴⁺ e CD⁸⁺ respetivamente, que consiste na produção de IFN-γ contra a *M. tuberculosis*. Os tubos de mitógeno e Nil são os controlos positivo e negativo respetivamente. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN-γ (UI/mL) é medida mediante o ensaio de imunoabsorção enzimática. Neste ensaio, as proteínas ESAT-6 e CFP-10 permanecem fixas nos poços da placa e são adicionados o plasma do doente com o conjugado anti IFN-γ e enzima em cada poço, deixando encubar à temperatura ambiente para permitir a ligação do IFN-γ com as proteínas e o conjugado. Também são

preparados poços de calibração e de controles. De seguida, os poços são lavados, é adicionado o substrato de enzimas e os poços são encubados. Posteriormente, é adicionada uma solução de paragem de enzimas e a absorvância é medida por espectrofotometria. Os cálculos são realizados tendo em conta os valores dos padrões e o resultado é considerado positivo quando os valores de absorvância forem acima do valor de Nil (136, 140).

3.8. Produtos em zaragatoa

Normalmente são analisados exsudados que chegam em zaragatoa, originários de várias áreas do corpo, nomeadamente vaginal, retal, uretral, orofaríngeo, ocular, auricular e nasal. Quanto aos exsudados vaginal e uretral, a zaragatoa em meio de Stuart é utilizada para sementeira por quadrantes em Gelose Sangue, Gelose VCAT (em atmosfera de CO₂, por 48h a 35°C) e Gelose Candida (de 24 a 48h, a 30°C). Antes da análise ao microscópio, a zaragatoa em meio de Stuart deve permanecer pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, a zaragatoa é pressionada contra uma lâmina e é analisada ao microscópio, de forma a avaliar o número de células epiteliais e polimorfonucleares e realizar a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. Se pedido, também são realizados testes rápidos para pesquisa de *Clamidia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em tempo real ou para a pesquisa de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* (126).

Quanto à pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em grávidas, chegam duas zaragatoas (vaginal e retal), que são colocadas em meio líquido Todd-Hewitt, por 24h a 35°C. Posteriormente, o meio líquido é repicado para Gelose Granada, realizando uma sementeira por quadrantes e uma lamela é colocada sobre o meio semeado, que incuba por 24h a 35°C, em atmosfera de anaerobiose (126).

Quanto à pesquisa de *Acinetobacter baumannii* em exsudado retal, a sementeira é realizada por quadrantes em Gelose MacConkey e a zaragatoa é introduzida no Caldo de Carne, que incubam por 24h a 35°C. Caso não houver crescimento no meio de Gelose MacConkey, o Caldo de Carne é utilizado para realizar uma nova sementeira no meio de MacConkey, que incuba nas mesmas condições que o passo anterior (126).

Nas amostras de orofaríngeo, é realizada a pesquisa de *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A, em que a zaragatoa é introduzida em Caldo de Carne e incuba por 24h a 35°C, para de seguida realizar a sementeira em Gelose Sangue, para incubar por 48h, a 35°C (126).

As amostras ocular e auricular são colhidas com duas zaragatoas, em que a primeira é semeada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO₂, de 24 a 48h, a 35°C), Sabouraud (24h, a 30°C), Gelose Chocolate Haemophilus e é introduzida em Caldo de Carne, que incuba de 24 a 48h, a 35°C. A segunda zaragatoa é aproveitada para efetuar o esfregaço para coloração de Gram. Em recém-nascidos, o exsudado ocular é também semeado em Gelose Chocolate VCAT, incubando de 24 a 48h, a 35°C em atmosfera de CO₂ e o exsudado auricular é também semeado em Gelose MacConkey, que incuba de 24 a 48h, a 35°C (126).

Nas amostras nasais, a zaragatoa é utilizada para sementeira por quadrantes no meio cromogénico MRSA e, de seguida, é introduzida no meio Todd-Hewitt, que após incubação de 24h a 35°C, o meio é inoculado para o meio cromogénico MRSA, que incuba por 24h, a 35°C (126).

3.9. Pús

Normalmente, o produto chega ao serviço em meio de portagerm, que apresenta um indicador de contaminação por oxigénio, mudando para azul. A tampa é desinfetada com etanol a 70% e a sementeira é realizada por quadrantes nos meios de Gelose MacConkey, Caldo de Carne e em dois meios de Gelose de Sangue, em que um incuba em atmosfera de CO₂ e o outro em anaerobiose. Adicionalmente, é realizado um esfregaço para coloração Gram. Aquando da contaminação por oxigénio não é necessário realizar a cultura em condições de anaerobiose. Quando o produto chega em zaragatoa, são recebidas duas zaragatoas, uma sem meio e outra em meio de transporte Stuart. A zaragatoa em meio de transporte é semeada em Gelose Sangue, em atmosfera CO₂, e em Gelose MacConkey, ambos incubam durante 24 a 48h, a 35°C e a zaragatoa sem meio é colocada em Caldo de Carne (24h a 35°C) e depois é semeada nos meios Gelose Sangue e MacConkey, caso o Caldo de Carne estiver turvo e não houver formação de colónias nos dois meios sólidos previamente semeados (126).

3.10. Esperma

A amostra é semeada para contagem, com uma ansa calibrada de 10 µL, em Gelose Sangue em atmosfera de CO₂, Gelose MacConkey (de 24 a 48h, a 35°C), Gelose Chocolate VCAT (em atmosfera de CO₂, por 48h, a 35°C) e Gelose Candida. É realizada uma alíquota de 100 µL para a pesquisa de *Chlamydia Trachomatis* e é pipetada 200 µL para um meio de transporte para a pesquisa de *Mycoplasma hominis*. São realizados dois esfregaços, um para a coloração de Gram e outro para exame a fresco, para contagem celular leucocitária e avaliação da presença de *Trichomonas vaginalis* (126).

3.11. Outros líquidos biológicos

Os líquidos biológicos, como LCR, sinovial/articular, pleural e ascítico podem ser recebidos em contentores variáveis (garrafas de hemoculturas ou outro contentor assético). Quando o LCR é demasiado fluído ou quando existe uma quantidade adequada, é centrifugado para a realização de um esfregaço com o sedimento, destinado às colorações de Gram e Ziehl-Neelsen. O exame citológico é efetuado na câmara de contagem Nageotte. Após a centrifugação, a sementeira é realizada em Gelose Sangue, Gelose Chocolate PVX (ambos os meios são encubados em atmosfera de CO₂, por 24h a 35°C), Gelose MacConkey (de 24 a 48h, a 35°C), Gelose Sabouraud (por 48h a 30°C) e em garrafa de hemocultura pediátrica se existe uma amostra com um volume entre 1 a 3 mL, mas se for colhido um volume inferior, a amostra é semeada no Caldo de Carne, que incuba de 24 a 48h, a 35°C. Adicionalmente, quando pedido, também são semeadas 3 a 4 gotas da amostra em meio Lowenstein, para cultura de BAAR na secção de micobactérias. Quando há suspeita de meningite bacteriana, também é realizada a pesquisa de antigénios capsulares por testes de PCR (126).

3.12. Biópsias

Com um bisturi, a amostra de biópsia é reduzida em pequenas frações e de seguida é semeada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO₂), Gelose MacConkey e Caldo de Carne (de 24 a 48h, a 35°C). Adicionalmente, é realizado um esfregaço para coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen. Para a pesquisa de *H. pylori*, a amostra é semeada em duas placas de Gelose pylori (em atmosfera de microaerofilia, por 14 dias a 35°C) (126).

3.13. Unhas, cabelos, pelos e raspados de pele

As amostras de unhas, cabelos, pelos e raspados de pele são usadas para realizar a pesquisa de dermatófilos, sendo que a sementeira é realizada em Gelose para dermatófilos e Gelose Sabouraud (por 28 dias, a 30°C). As placas são observadas a cada 7 dias para verificar se há crescimento (126).

3.14. Detecção de genes de resistência a antibióticos

Na secção de microbiologia, são realizados PCR em tempo real para efetuar testes qualitativos de diagnóstico in vitro. A preparação da amostra, extração, amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo ocorre automaticamente. Em cada teste estão incluídos um controlo de processamento de amostra e um controlo de verificação de sonda. O controlo de processamento de amostra, que contém esporos de *Bacillus giobigii*, é utilizado com o intuito de assegurar que o processamento da amostra ocorreu adequadamente e que a bactéria sofreu lise celular, aquando da sua presença. No controlo de verificação de sonda, é realizado a medição do sinal de fluorescência das sondas, de forma a monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante (126).

3.14.1. Detecção de *M. tuberculosis* e Resistência à rifampicina

As estirpes de *M. tuberculosis* podem adquirir resistência a um ou mais fármacos, o que dificulta o seu tratamento pela administração de fármaco. Como solução, são realizados testes destinados à detecção do DNA das estirpes *M. tuberculosis* em amostras de expetoração ou em sedimentos para a detecção de mutações do gene *rpoB*, associadas à resistência contra a rifampicina, mediante a amplificação do gene pelos *primers* que contêm a região *core*. A detecção desta mutação ocorre devido à diferença entre a sequência conservada do *wild-type* e a mutações na região *core* associadas à resistência à rifampicina (119).

3.14.2. Detecção de Gram-negativos não suscetíveis a carbapenemos

O surgimento de bactérias resistentes a uma classe de antibióticos β -lactâmicos (carbapenemos), nomeadamente espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, resultam em limitações nas opções de tratamento, constituindo um problema importante de saúde pública. Visto isso, são utilizados testes de PCR destinados à detecção e diferenciação das sequências dos genes associados à resistência a carbapenemos em bactérias Gram-negativas, sendo estes os genes bl_{IMP-1} , $bl_{\alpha VIM}$, $bl_{\alpha OXA-48}$, $bl_{\alpha NDM}$ e $bl_{\alpha KPC}$, que codificam para imipenemase, oxacilinase de classe D, Nova Deli metalo- β -lactamase e carbapenemase *Klebsiella pneumoniae*, respetivamente (141). As amostras são obtidas mediante zaragatoa retal, em doentes com risco de colonização intestinal por bactérias resistentes a carbapenemos (126).

3.14.3. Detecção de *S. aureus* resistente à meticilina

S. aureus que produzem β -lactamases comprometem a eficácia da penicilina no tratamento de infeções causadas por estas bactérias. Assim, o fármaco de eleição para o tratamento dessas bactérias é a meticilina. Mas, quando a bactéria obtém um complexo de gene *mec*, que contém o gene *mecA* ou *mecC*, esta adquire resistência à meticilina, sendo designadas de *Staphylococcus*

aureus Resistentes à Meticilina (MRSA) (119). Visto isso, é utilizado um ensaio destinado à detecção de MRSA diretamente de zaragatoas nasais em doentes com risco de colonização nasal. Esse ensaio contém iniciadores e sondas que detetam as sequências genéticas *mecA* e *mecC*, responsáveis pela resistência à meticilina e o SCCmec, que é inserida no cromossoma do *S. aureus* (126).

3.15. Detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

A *C. trachomatis* e a *N. gonorrhoeae* são bactérias Gram-negativas, que causam doenças sexualmente transmissíveis, nomeadamente a clamídia e a gonorreia, respetivamente (119). É utilizado um teste destinado à detecção e diferenciação do DNA genómico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, em que se deteta um alvo para *C. trachomatis* e dois alvos diferentes para *N. gonorrhoeae*, em que neste último caso, os dois resultados têm de ser positivos para que o ensaio seja considerado como positivo. Este teste pode ser usado numa variedade de amostras diferentes, como o jato inicial da urina, zaragatoa endocervical e vaginal (126).

3.16. Testes de identificação e de sensibilidade aos antibióticos

São realizados vários testes de identificação e de sensibilidade, que podem ser agrupados em testes manuais e testes automáticos. Os testes manuais incluem a oxidase, catalase, coagulase, urease, factor X e V, tipagem de estreptococos, optoquina, difusão em disco e gradiente de difusão (126). A **oxidase** é um teste realizado para determinar a presença da enzima intracelular citocromo C Oxidase em bactérias, permitindo a diferenciação entre bacilos Gram-negativo oxidase positivos (como exemplo, as *Pseudomonas* spp.) dos oxidase negativos (119).

A **catalase** é uma enzima presente em bactérias como os *Staphylococcus* spp., que catalisam a decomposição de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em H_2O e O_2 . O teste da catalase é realizado para determinar a presença dessa enzima em colónias puras de uma bactéria, diferenciando cocos Gram-positivos em catalase positivo (*Staphylococcus* spp.) e catalase negativos (*Streptococcus* e *Enterococcus* spp.). Quando adicionado ao reagente com peróxido de hidrogénio, é verificada a formação de efervescência (catalase positivo) e quando não se observa qualquer reação, é catalase negativo (119).

O teste da **coagulase** é utilizado para verificar a capacidade de um microrganismo na formação de um coágulo, aquando da presença de plasma, devido à enzima coagulase. Após a determinação da presença de um *Staphylococcus* spp., esse teste permite diferenciar o *S. aureus* (coagulase positivo) dos restantes *Staphylococcus* spp (119).

O teste de **urease** determina a presença da enzima urease, que hidrolisa a ureia em amónia. O pH do meio aumenta com o aumento dos níveis de amónia, que é detetado por um indicador. Este teste auxilia na identificação de algumas espécies de Enterobacteriaceae, como os *Proteus* spp (119).

No teste dos **fatores X e V**, são utilizados três discos, em que um contém o fator X (hemina), o segundo contém o fator V (dinucleótido adenina nicotinamida) e o terceiro contém os dois fatores. É um teste diferenciador de *haemophilus* spp., que dependendo da necessidade diferencial dos fatores para crescer, é possível identificar presuntivamente a espécie de *haemophilus* spp (119).

O teste de **tipagem dos estreptococos** é um teste de aglutinação em latex, para identificação dos *Streptococcus* dos grupos A, B, C, D, F e G, segundo Lancefield, obtidos de colónias do meio de

cultura. Cada grupo possui antígenos complexos formados por oligossacáridos com diferentes cadeias laterais, que consistem primeiramente de glucosamina acetiladas ou não acetiladas. O antígeno para o streptococci do grupo D é formado por ácido lipoteicóico. Este teste tem como princípio a utilização do ácido nítrico para extrair o antígeno específico de cada grupo, que vai se ligar a partículas de latex envoltos por IgGs específicos aos referidos antígenos, formando aglutinações (119).

No teste de **optoquina**, é introduzido um disco de optoquina no meio Gelose Sangue. Geralmente, os estreptococos, principalmente os estreptococos α -hemolíticos, não são sensíveis à optoquina e, por outro lado, os pneumococos são sensíveis. Assim, depois de incubar o meio com o disco de optoquina, é medido o halo de inibição provocada pela optoquina. Quando a zona de inibição é maior que 12 mm, é possível presumir a presença de *S.pneumoniae* (119, 126).

No teste de **difusão em disco**, primeiramente é utilizado uma suspensão bacteriana padronizada, que é semeada no meio sólido Mueller Hinton. de seguida, os discos com antibióticos são introduzidos na sementeira e, após a incubação, os halos de inibição de crescimento são medidos, sendo possível classificar qualitativamente o nível de sensibilidade ao antibiótico como sensível, intermédio ou resistente (126).

O teste de **gradiente de difusão** é um teste quantitativo em que se introduz uma tira com um gradiente de concentração de antibiótico definido, no meio sólido Mueller Hinton. Após a incubação, é possível observar o halo elíptico de inibição à volta da tira, permitindo quantificar a concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/mL}$ (126).

3.17. Testes automáticos

Normalmente, o TSA e a identificação do microrganismo ID são realizados automaticamente, mediante o sistema Vitek 2 Compact (126). Este sistema possui um conjunto de cartas de identificação com vários poços que apresentam uma determinada cor, dependendo do consumo ou não do substrato pelo organismo. O conjunto de cores é interpretado como um código pelo aparelho e este é comparado com a base de dados do sistema, para determinar o microrganismo com maior correspondência e apresentar o resultado mais provável. Quanto ao TSA, são utilizadas cartas que possuem poços com diferentes antibióticos a diferentes concentrações, que permitem avaliar a sensibilidade das bactérias, classificando-as como sensíveis, intermédias ou resistentes (142). A interpretação desses resultados é realizada de acordo com os dados padronizados por organizações especializadas, como a *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (142).

3.18. Principais microrganismos identificados

Existem milhares de microrganismos diferentes que colonizam o organismo humano que, em condições normais, são importantes no metabolismo do hospedeiro, na defesa contra outros microrganismos patogénicos e não provocam doença. Mas, por outro lado, existem partes do organismo que devem permanecer estéreis, como sangue, LCR, entre outros, sendo que a presença de qualquer microrganismo é considerado patológico. Quanto à patogenicidade, os microrganismos podem ser classificados como patogénicos oportunistas ou patogénicos obrigatórios, que causam infeção aquando da alteração da flora ou que a sua presença é sempre patogénica, respetivamente (136). Perante a extensa diversidade de microrganismos com

potencial patogénico, é de interesse mencionar alguns dos agentes infecciosos identificados com mais frequência em infeções humanas.

3.18.1. Cocos Gram positivos

Os cocos Gram positivos mais estudados são os Estreptococos, Estafilococos e Enterococos. Os Estreptococos são uma família de microrganismos que normalmente são aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase negativa e são visualizados aos pares ou em cadeia, no microscópio. Os géneros pertencentes a esta família são *Streptococcus* spp. e *Lactococcus* spp., sendo que as espécies mais encontradas são *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* e *S. viridans*. *S. pyogenes* é um dos estreptococos β -hemolíticos mais comuns isolados em hemoculturas, apresentando como positivo na maioria dos doentes com fascite necrosante ou síndrome do choque tóxico. O *S. agalactiae* (β -hemolítico) é a única espécie com o antigénio do grupo B e constitui uma importante causa de septicemia, pneumonia e meningite em recém-nascidos, sendo estes infetados durante a gestação ou na hora do parto. O *S. pneumoniae* (α -hemolítico) está presente na nasofaringe e na orofaringe em situações normais, mas este pode espalhar-se para os pulmões, seios paranasais, ouvido ou meninges, causando pneumonia, sinusite, otite média e meningite respetivamente. O *S. viridans* corresponde a uma coleção heterogênea de estreptococos α -hemolíticos e γ -hemolíticos. Este coloniza a orofaringe, o trato gastrointestinal e o trato geniturinário e é considerado um patógeno oportunista de baixa virulência, normalmente envolvidos na endocardite bacteriana (136).

Os Estafilococos são patógenos importantes em humanos, causando infeções oportunistas e várias doenças sistémicas, incluindo infeções da pele, tecidos moles, ossos e trato urinário. Algumas das espécies associadas a doenças humanas com maior frequência são os *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e o *S. aureus*, sendo este último o mais virulento. *S. epidermidis* normalmente está presente nas infeções de próteses e, menos comumente, de válvulas cardíacas nativas. *S. haemolyticus* estão associados a casos de bacteremia, endocardite, infeções ósseas e articulares, do trato urinário, de feridas e oportunistas. Em placas de Gelose Sangue, o *S. aureus* geralmente se apresenta como colónias amareladas com um halo de β -hemólise e causa doenças mediante a produção de toxinas ou pela invasão e destruição direta do tecido. Algumas das doenças derivadas das toxinas incluem síndrome da pele escaldada estafilocócica, intoxicação alimentar estafilocócica e síndrome do choque tóxico, enquanto outras doenças que resultam da proliferação desta bactéria incluem a formação de abscesso e destruição de tecidos, como infeções cutâneas, endocardite, pneumonia, entre outros (136).

Os Enterococos clinicamente mais importantes são os *E. faecium* e *E. fecalis*, que causam infeção do trato urinário, peritonite, bacteremia, entre outros. No meio de Gelose Sangue, estes formam colónias pequenas, brancas, com γ -hemólise ou α -hemólise (136).

3.18.2. Bacilos Gram positivos

Os géneros mais importantes dos bacilos Gram positivos são os *Listeria* spp. e *Corynebacterium* spp. Os *Listeria* spp. causam doenças como granulomas disseminados, meningite e septicemia em recém-nascidos, doença semelhante à gripe em adultos saudáveis e bacteremia ou doença disseminada com meningite em mulheres grávidas e doentes com defeitos imunológicos. As colónias são pequenas e formam um pequeno halo de β -hemólise. Os *Corynebacterium* é um vasto grupo de anaeróbios facultativos e, na sua maioria, são catalase positivos. Estas bactérias fazem parte da flora da mucosa e da pele do homem e estão distribuídas no solo e na água. O isolamento

desses microrganismos de amostras biológicas geralmente é considerado como contaminante. Na Gelose Sangue, as suas colónias são pequenas, acinzentadas e não provocam hemólise (136).

3.18.3. Cocos Gram negativos

O género mais comum dos cocos Gram negativos são os *Neisseria*, sendo *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* espécies que causam infeção apenas no homem. As espécies de *Neisseria* são bactérias Gram-negativas aeróbicas, oxidase positiva e a maioria são catalase positivas. A *N. gonorrhoeae* causa gonorreia. Este é um microrganismo de crescimento fastidioso, não cresce em Gelose Sangue, necessitando de meios enriquecidos e complexos. A *N. meningitidis* pode colonizar a nasofaringe de pessoas saudáveis sem serem patológicas ou podem causar meningite adquirida na comunidade, septicemia fatal ou broncopneumonia. Na Gelose Sangue, este microrganismo produz colónias pequenas, sem hemólise (136).

3.18.4. Bacilos Gram negativos

Incluído nos bacilos Gram negativos, existe a família das *Enterobacteriaceae* que corresponde à família mais diversificada e clinicamente importante dos bacilos Gram positivos. Existem espécies de *enterobacteriaceae* que existem na flora comensal da maioria dos animais, incluindo os humanos (como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus*) e existem aqueles que a sua presença em humanos é sempre patológica (como *Salmonella typhi*, *Shigella* e *Yersinia pestis*). Incluindo nas *Enterobacteriaceae*, existem as espécies fermentadoras de lactose e de glicose, anaeróbios facultativos e oxidase negativos, como as *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., entre outros. Os não fermentadores de lactose diferenciam das enterobacteriaceas por serem oxidase positivas e não fermentarem a glicose. Nesta família incluem os géneros *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e *Stenotrophomonas* spp. Estes microrganismos não pertencem à flora comensal humana, mas estão presentes em ambiente hospitalar, colonizando a pele e o aparelho respiratório dos doentes hospitalizados (136).

3.18.5. Micobactérias

Mycobacterium é um dos géneros mais frequentes de bactérias álcool-ácido resistentes responsáveis por doenças humanas. O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, transmitido através de aerossóis, capaz de estabelecer uma infeção ao longo da vida e estima-se que um terço da população mundial está infetada por esta espécie. Esta bactéria causa tuberculose, que pode envolver qualquer órgão, mas a maioria das infeções em doentes imunocompetentes é restrita aos pulmões (136).

3.18.6. Fungos

O género *Candida* spp., mais especificamente *Candida albicans* é o mais frequentemente identificado. Este é um patógeno fúngico humano oportunista, que faz parte da microbiota do corpo humano, mas podem causar infeções (candidíase) mediante leveduras endógenas ou adquiridas no hospital (119).

4. Secção de Hematologia

Na secção de Hematologia, são realizados vários testes para o diagnóstico e prognóstico de anemias, hemoglobinopatias, alterações congénitas e adquiridas da coagulação, doenças tromboembólicas e hemorrágicas, entre outras. Atualmente, os equipamentos existentes nesta secção são DXH 800 *Hematology Analyser* (Beckman Coulter), ACL Top 3G (*Instrumentation Laboratory*), FACSCalibur (Becton Dickinson), ADAMS A1c HA-8180T (arkray), INNOVANCE PFA-200 *Systems* (SIEMENS Healthliners) e *Aerospray Hematology Pro* (*Biomedical Systems*).

4.1. Hemograma

A hematopoiese corresponde a um processo que resulta na formação de células sanguíneas, dos quais os eritrócitos, leucócitos e plaquetas (143). A avaliação dos constituintes celulares de uma amostra sanguínea é realizada mediante o hemograma completo, em que consta o eritrograma (avalia eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos), leucograma (avalia os leucócitos) e plaquetograma (avalia as plaquetas) (144). O hemograma completo, a contagem de reticulócitos e dos eritrócitos nucleados são realizados automaticamente, com a aplicação do princípio de Coulter e a análise de dispersão de luz. A análise de outros líquidos biológicos (LCR, lavado bronco-alveolar, líquido sinovial e líquidos serosos) podem ser processadas manualmente. Quanto ao princípio de Coulter, as partículas (neste caso células e plaquetas) são suspensas num diluente e, mediante um fluxo, cada célula passa através de um orifício que possui uma corrente elétrica, gerado por dois elétrodos. Cada célula atua como um isolador e à medida que atravessam pela abertura, aumentam momentaneamente a resistência da corrente elétrica entre os elétrodos, originando um pulso elétrico mensurável. O número de pulsos indica o número de células ou partículas e a amplitude do pulso é proporcional ao volume da célula. Existem cinco ângulos de dispersão de luz, que indicam o tamanho, estrutura nuclear, complexidade e granularidade celular. Esses sinais são enviados e analisados pelo sistema informático do aparelho. Para contagem dos leucócitos, eritrócitos nucleados, plaquetas e doseamento da hemoglobina, é utilizado um reagente lítico que destrói os eritrócitos e converte a hemoglobina num pigmento estável, enquanto os núcleos dos leucócitos e eritrócitos nucleados, bem como as plaquetas permanecem intactos. Após a contagem dos leucócitos, eritrócitos nucleados e plaquetas, a amostra é enviada para uma cuvette, onde a hemoglobina é doseada fotometricamente a 525nm, usando um branco como referência. A absorvância do pigmento é diretamente proporcional à concentração da hemoglobina presente na amostra (145).

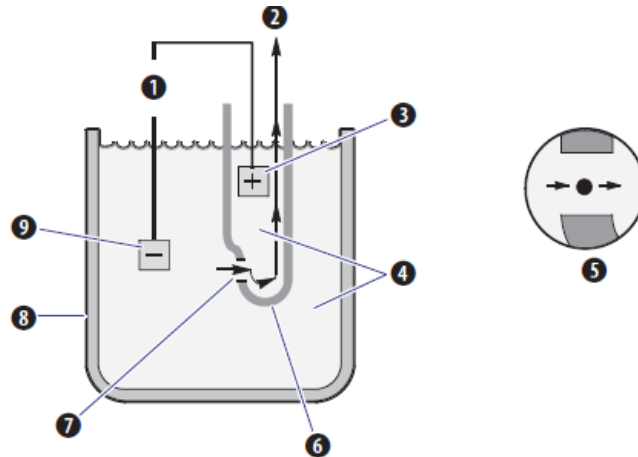


Figura 24: Esquema do método de Coulter. (1) corrente de abertura, (2) vácuo, (3) eletrodo interno, (4) suspensão de células sanguíneas, (5) detalhe da abertura, (6) tubo da abertura, (7) abertura, (8) béquer de amostra, (9) eletrodo externo (adaptado de 146).

4.2. Análise microscópica

Apesar do amplo uso de instrumentos automatizados, as técnicas manuais, como a realização do esfregaço, coloração e análise microscópica permanecem importantes como métodos de referência para a análise automática de amostras de sangue que apresentam resultados anômalos. Além disso, estas técnicas permitem identificar características celulares específicas de certas patologias, como leucemias, infecções parasitárias, entre outros. As amostras analisadas são sangue periférico, medula óssea e outros líquidos biológicos (147).

4.2.1 Esfregaço sanguíneo

Um esfregaço sanguíneo é feito com sangue capilar, venoso ou medular, presente num tubo com K3-EDTA, ou a fresco no caso das amostras de sangue medular. Com um tubo capilar, é colocada uma gota da amostra de sangue sobre a lâmina. Uma outra lâmina é posicionada sobre a lâmina com a gota de sangue num ângulo de aproximadamente 45°, é arrastada até entrar em contacto com a gota e é arrastada até à outra extremidade da lâmina, formando uma monocamada de sangue sobre a lâmina, apropriada para a visualização ao microscópio, como representado na figura 25 (147).

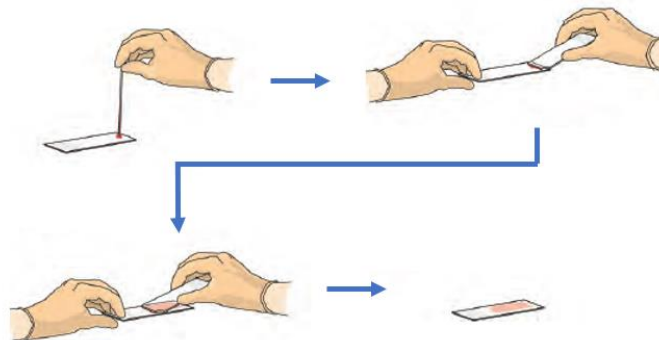


Figura 25: Método de esfregaço sanguíneo (adaptado de 147).

4.2.2. Coloração de May-Grunwald/Giemsa

Este método de coloração consiste na aplicação de corantes ácidos e básicos que coram estruturas básicas (acidófilas) e ácidas (basófilas), respetivamente. O corante May-Grunwald é composto por uma mistura de eosina, que cora estruturas básicas como hemoglobina e grânulos acidófilos de vermelho ou num tom alaranjado, e por azul-de-metileno, que cora estruturas ácidas como DNA, RNA, grânulos de basófilos e neutrófilos num tom de violeta ou azul. O corante Giemsa é composto por uma mistura de azur II (mistura de azur e azul-de-metileno) e eosinato de azur II (mistura de azur, azul-de-metileno e eosina). Após a coloração com o May Grunwald, é realizada uma segunda coloração com o Giemsa, para obter um resultado mais detalhado. A coloração de May-Grunwald/Giemsa é utilizada para corar esfregaços de sangue periférico, medula óssea e outros líquidos biológicos, como líquidos serosos (147).

4.2.3. Coloração de Wright Giemsa

A coloração Wright-Giemsa é uma coloração modificada de Romanowsky composta por uma combinação de corantes básicos, dos quais o azul de metileno e seus produtos oxidativos, azul A e azul B, e um corante ácido, a eosina. Esta coloração tem como princípio o “efeito Romanowsky”, em que o azul B e a eosina combinam-se para formar um complexo molecular que produz três cores distintas num esfregaço de sangue periférico. Os eritrócitos ficam corados de rosa salmão, os núcleos de leucócitos apresentam uma cor roxa-azulada e as plaquetas exibem um citoplasma lilás escuro, contendo grânulos vermelho-púrpura. A coloração Giemsa é adicionada para intensificar a coloração das características nucleares e das granulações dos neutrófilos (148).

4.2.4. Coloração de Perls

A coloração de Perls é baseada em uma reação entre o ferrocianeto ácido e o ferro férrico (Fe^{3+}) da hemossiderina para formar o ferrocianeto férrico, que possui uma cor azul intensa (azul da Prússia) e precipita sob a forma de sal insolúvel nos eritrócitos e noutras células. A coloração de Perls é mais frequentemente realizada na medula óssea, para avaliar os depósitos de ferro medular, permitindo avaliar as alterações na distribuição e utilização do ferro pelos eritroblastos. Mas também pode ser aplicada na coloração de sangue periférico, a fim de detetar sideroblastos e siderócitos, que são detetáveis em vários casos, nomeadamente envenenamento por chumbo, anemias sideroblásticas e alcoolismo (147).

4.2.5. Coloração de Fosfatase Alcalina

O princípio da coloração de Fosfatase Alcalina é baseado no facto que o naftoL-1 é agregado num sal de diazónio, formando um corante castanho que precipita somente em células com atividade de fosfatase alcalina. Esta coloração é utilizada para a determinação de Leucemia Mieloide Crónica (LMC), que nesses casos os neutrófilos apresentam uma baixa atividade de fosfatase alcalina nos seus organelos, bem como para diferenciação de outras doenças mieloproliferativas que apresentam neutrófilos com atividades de fosfatase alcalina normal a elevado como policitemia vera e mieloma múltiplo (147).

4.2.6. Coloração de Peroxidase

A coloração da peroxidase tem como princípio o facto que as peroxidases são catalases lisossomais que transferem um dador (cloro-4-naftol-1) para um peróxido de hidrogénio. O cloro-4-naftol-1 é oxidado e convertido num corante castanho-escuro insolúvel, que pode ser considerado como um indicador de atividade da peroxidase. Os grânulos dos neutrófilos e dos eosinófilos contêm peroxidases, sendo designados de mieloperoxidases. Esta coloração serve para evidenciar elementos celulares mieloides, que possibilita a avaliação do grau de maturidade dos granulócitos, pela intensidade da coloração castanho-escuro e também permite estabelecer e confirmar o diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda (147).

4.3. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são patologias hereditárias como a talassemia, que resultam de mutações nos genes que codificam as cadeias α , β , γ e δ da hemoglobina (Hb). Mutações nos genes α produzem anormalidades que afetam as Hb A, A₂ e F e mutações nos genes β (que pode resultar na anemia falciforme, β -talassemias), γ e δ afetam as Hb A, F e A₂, respetivamente (147).

4.3.1. Teste de anemia falciforme

A anemia falciforme é uma doença hereditária autossómica recessiva da cadeia β que se manifesta em indivíduos homocigóticos para a mutação da posição 6 da extremidade N-terminal do cromossoma 11, em que há substituição do ácido glutâmico por valina, originando na produção de HbS. O teste da anemia falciforme baseia-se no facto que a HbS polimeriza e precipita em condições de hipoxia, atribuindo aos eritrócitos uma forma de foice e diminuindo a sua elasticidade. Para realizar o teste de anemia falciforme, é adicionado metabissulfito de sódio a 2% ao sangue entre uma lâmina e uma lamela, que são vedadas com parafina e, após uma hora de incubação a 37°C, a lâmina é observada ao microscópio para verificar a presença de eritrócitos em forma de foice. Em caso de resultado negativo para a anemia falciforme, a lâmina é observada após 24h (147).

4.3.2. Hemoglobina A₂, fetal e glicada

A β -talassémia é uma patologia em que ocorre a deficiência na produção da cadeia β da Hb, resultando em níveis elevados de HbA₂ e HbF. Para separar e quantificar as HbA₂, HbF e hemoglobina glicada (HbA_{1C}), é utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O processo é dividido em três fases, a hemólise, separação e deteção. A amostra de sangue total é hemolisada pela solução de lavagem e o hemolisado é injetado na coluna. As moléculas de Hb possuem carga positiva e são separadas ao interagir com a matriz carregada negativamente. Estas moléculas de Hb ligam-se à matriz hidrofóbica (fase estacionária não polar) e são eluídas com tampão fosfato inorgânico com diferentes forças iónicas, que fazem com que as diferentes frações de hemoglobina sejam eluídas a tempos diferentes, sendo detetados por método colorimétrico a 420 e 500nm. Os resultados são representados em forma de cromatograma, compostos por picos, tempos de retenção e percentagem das diferentes frações (149).

A HbA_{1C} resulta da incorporação de glicose na hemoglobina, durante os 120 dias de vida de um eritrócito. Quanto maior a concentração de glicose no sangue, maior será o valor de HbA_{1C}

detetado. O teste de doseamento da HbA_{1C} tem como princípio a clivagem da hemoglobina mediante a enzima endoproteínase Glu-C e, de seguida, a separação dos hexapeptídeos N-terminais glicosados e não-glicosados. Com este teste, é possível estipular a média da concentração de glicémia, num período de aproximadamente 120 dias, sendo assim utilizado como um método de diagnóstico e de acompanhamento de doentes com Diabetes mellitus, para avaliar o controlo glicémico e determinar o risco de complicações (143).

4.4. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é um marcador não específico da inflamação. Este teste mede a taxa de precipitação dos eritrócitos durante 1h, seguindo o método de Westergren. Existem vários fatores que afetam a VS, que podem ser divididos em fatores plasmáticos e eritrocitários. Alguns dos fatores plasmáticos incluem os fibrinogénios e as α -, β -, e γ -globulinas, sendo que o aumento dos seus níveis diminuem a carga negativa dos eritrócitos, favorecendo a formação de *roleaux*, que resulta num aumento da VS. Um dos fatores eritrocitários inclui a presença de eritrócitos com formas irregulares, como os esferócitos, que interferem com a formação de *roleaux*, reduzindo a VS (58). A VS aumentada está associada a várias patologias, como doenças reumáticas, infeções crónicas e doenças tumorais (150).

4.5. Coagulação

O sistema hemostático é baseado num equilíbrio entre os mecanismos coagulantes e anticoagulantes, aliados a um sistema de fibrinólise. Este sistema possui cinco componentes principais, dos quais as plaquetas, fatores de coagulação, inibidores de coagulação, fibrinólise e vasos sanguíneos (143).

4.5.1. Plaquetas

As plaquetas têm como principal função a formação de tampão mecânico durante a resposta hemostática à lesão vascular. A função plaquetar pode ser dividida nas reações de adesão, agregação e libertação. A adesão consiste na imobilização das plaquetas nos locais onde ocorre a lesão vascular, em que ocorrem interações específicas entre a parede vascular e as plaquetas, sendo parcialmente mediadas pelo Fator *von Willebrand* (FvW). A agregação é caracterizada pela ligação cruzada entre as plaquetas e pontes de fibrinogénio, por meio de recetores ativos de GPIIb/IIIa presentes nas plaquetas. A libertação consiste na produção de moléculas como o tromboxano A₂, que são importantes na formação e estabilização dos agregados plaquetários e na atividade vasoconstritora (143). Para analisar a função plaquetária, são realizados os testes de agregação plaquetária e os testes de tempo de hemorragia. O cartuxo com colagénio e epinefrina é o primeiro a ser utilizado para avaliar a disfunção plaquetária induzida por defeitos nas plaquetas, doença de *von Willebrand* ou exposição a agentes inibidores da atividade plaquetária. O cartuxo com colagénio e adenosina difosfato é utilizado para indicar se o resultado anormal obtido com o anterior é devido ao ácido acetilsalicílico. A amostra de sangue periférico com anticoagulante citrato é aspirada por pressão negativa, através dos capilares e da abertura da membrana do cartucho, onde as plaquetas são sujeitas a condições de elevado fluxo. Na membrana existe uma abertura central revestida por agonistas plaquetários (colagénio e adrenalina ou adenosina difosfato, consoante o cartucho utilizado). A presença dos agonistas

plaquetários e as taxas elevadas de cisalhamento resultam na adesão, agregação e libertação plaquetária, formando um tampão estável na abertura, reduzindo gradualmente o fluxo sanguíneo até à oclusão completa. O aparelho contabiliza o tempo decorrido desde o início do teste, até quando ocorre a oclusão completa (tempo de oclusão), que em situações normais, vai até 200 segundos (151).

4.5.2. Cascata de coagulação

A coagulação do sangue é um processo que envolve a amplificação de substâncias que ativam sequencialmente uma cascata de proteínas precursoras circulantes (cascata de coagulação gerada pelos fatores de coagulação), culminando na formação de trombina, que converte fibrinogénio em fibrina. A fibrina infiltra nos agregados plaquetários instáveis e converte-os em tampões hemostáticos definitivos. Por outro lado, o processo de coagulação deve ser controlado por mecanismos de inibição para evitar a formação de trombos. Esses mecanismos envolvem a via do fator tecidual (TF) que inibe os fatores de coagulação Xa e VIIa, a antitrombina que é a principal inibidora da trombina, as proteínas C e S que atuam em conjunto na destruição dos cofatores de coagulação V e VIII ativados e também ativam a fibrinólise, e o fluxo sanguíneo que dilui e dispersa os fatores ativados antes da formação de fibrina (143). Os testes da função hemostática são realizados com plasma obtido do sangue em citrato de sódio e incluem o tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), bem como o doseamento dos fatores de coagulação e do FvW, descritos na tabela 22. Para realizar estes testes, são utilizadas três técnicas diferentes, as de deteção coagulométrica, cromogénica e imunológica (152).

A técnica de **deteção coagulométrica** mede o tempo necessário para ocorrer a coagulação plasmática. Esta técnica tem como princípio o facto que quando a luz passa por um meio onde o fibrinogénio é convertido em fibrina, é absorvida pelos filamentos de fibrina. A absorção da luz aumenta à medida que a formação do coágulo de fibrina aumenta e, assim, a transmitância através da amostra diminui continuamente. O sinal detetado pelo fotodetector é processado através de um *software* para determinar o ponto de formação do coágulo (152).

A técnica **cromogénica** utiliza cromóforos, como a para-nitroalínina (pNA), ligados a peptídeos sintéticos que possuem uma sequência de aminoácidos semelhante ao sítio ativo de uma proteína de coagulação de interesse. Quando o peptídeo sintético reage com a enzima apropriada, o pNA é libertado e possui uma cor amarela que é medida fotometricamente e quantificada por sua absorbância a 405nm. A absorção da luz aumenta e a transmitância diminui com o aumento da concentração do pNA. A luz detetada pelo fotodetector é convertida num sinal elétrico e é processado informaticamente para determinar a atividade enzimática (152). Os testes podem ser realizados da forma direta, em que o analito de interesse atua diretamente sobre um substrato sintético específico, ou indireta, em que o analito de interesse reage primeiramente sobre uma quantidade fixa de enzimas para formar complexos inativos e posteriormente, a atividade enzimática residual é avaliada mediante um substrato sintético específico (152).

A técnica **imunológica** consiste no princípio imunoturbidimétrico, semelhante ao descrito na secção de imunoquímica. Nesta técnica, transmitem uma luz através da amostra numa cuvette e medem a transmitância, que é inversamente proporcional à quantidade de complexos antígeno-anticorpo formado, sendo esta convertida em sinal elétrico que é processado para determinar a concentração do analito (152).

Tabela 22: Testes de função hemostática, com as suas respectivas técnicas e funções. Todos estes ensaios são realizados no equipamento ACL TOP.

Parâmetro	Função	Técnica	Referência
Tempo de Protrombina (TP),	Avalia via extrínseca da coagulação Monitorização da terapia anticoagulante oral	Coagulométrica	(143)
Tempo de Trombina (TT)	Avalia via comum da coagulação		
Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)	Avalia via intrínseca da coagulação Monitorização da terapia anticoagulante com heparina		
Anti-Lúpicos	Interfere com as provas de coagulação em que participam os fosfolípidos, como o TTPa	Imunológica	
D-Dímeros	Deteção dos produtos de degradação da atividade da plasmina sobre os coágulos de fibrina		
Fator Von Willebrand (FvW Ag)	Promove a adesão das plaquetas ao endotélio lesado e é responsável pelo transporte do fator VIII	Cromogénico	
Proteína S	É um cofator da proteína C ativada, aumentando os seus efeitos anti-coagulantes e fibrinolíticos		
Proteína C	É um inibidor fisiológico da coagulação		
Antitrombina (AT)	É o principal inibidor fisiológico da coagulação		
Fibrinogénio C	Auxilia na conversão do fibrinogénio em fibrina na cascata de coagulação		

4.6. Trombofilia

Existem muitas doenças associadas ao aumento de risco de trombose que podem ser diagnosticadas mediante exames laboratoriais, como as doenças hereditárias derivadas de mutações do Fator II (G20210A) e do Fator V Leiden (G1691A). O alelo G20210A da protrombina é uma variante que resulta no aumento dos níveis plasmáticos de protrombina e no aumento de risco de trombose na ordem de 5%. A mutação do fator V Leiden é a causa hereditária mais comum de aumento de risco de trombose venosa, que resulta numa resistência do fator V à clivagem provocada pela proteína C e não ocorre o alongamento do TTPa. A pesquisa dessas mutações é realizada com amostras de sangue periférico em K3-EDTA ou citrato de sódio, utilizando um sistema de PCR em tempo real (143).

4.7. BCR-ABL

A LMC é um dos tumores hematológicos mais frequentes, que corresponde de 15% a 20% de todos os casos de leucemia. Mais de 95% dos indivíduos com LMC possuem o cromossoma Philadelphia que resulta da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. Essa translocação envolve a transferência do gene Abelson (ABL1) do cromossoma 9 para a *Breakpoint Cluster Region* (BCR) do cromossoma 22, o que resulta no gene BCR-ABL1. Esse gene produz BCR-ABL, uma tirosina quinase com atividade desregulada, que é importante no desenvolvimento da LMC. A pesquisa dessa mutação é realizada com amostras de sangue periférico em tubos com K3-EDTA, mediante ensaios de RT-PCR e PCR para detetar os transcritos de mRNA de translocação dos cromossomas para a forma p210, resultante das translocações e13a2 (b2a2) e e14a2 (b3a2) (153).

4.8. Citometria de fluxo

A CF é tradicionalmente aplicada em estudos de tumores hematológicos, servindo também como meio de diagnóstico, seguimento e monitorização de doença residual mínima em casos de leucemias e linfomas (42, 154). A imunofenotipagem é aplicada no estudo do perfil leucocitário, permitindo identificar, quantificar e caracterizar diferentes populações linfocitárias (155). No SPC, são realizados vários estudos hematológicos mediante a CF, nomeadamente, os estudos de doenças linfoproliferativas, populações linfocitárias, gamapatias monoclonais, hemoglobinúria paroxística noturna e controlo de desleucocitação.

As **doenças linfoproliferativas** consistem na proliferação anormal dos linfócitos, sendo os linfócitos B os mais frequentes. No estudo de doenças linfoproliferativas, são utilizadas amostras de sangue periférico, medula óssea, entre outras, para analisar a percentagem relativa e características dos linfócitos B e T, sendo efetuada quando existem suspeitas clínicas ou quando os resultados do hemograma o justificam (58).

Para estudar as **populações linfocitárias**, são utilizadas amostras de sangue periférico para saber o número absoluto de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, B e células NK. Para isso, são utilizados tubos *trucount*, que possuem um determinado número de esferas que permite calcular automaticamente o número absoluto de células presentes numa amostra. Este estudo é aplicado no acompanhamento de doentes portadores do HIV, que possui tropismo para os linfócitos T CD4⁺ (58).

Nos estudos das **gamapatias monoclonais**, a amostra mais utilizada é a medula óssea e o painel de anticorpos monoclonais utilizado permite estudar os plasmócitos. O estudo da proporção de cadeias leves kappa e lambda é importante na identificação de populações de plasmócitos monoclonais (58).

A **hemoglobinúria paroxística noturna** é um distúrbio hematopoiético clonal adquirido das células estaminais da medula óssea, caracterizado pela existência de mutações genéticas envolvidas na biossíntese da molécula de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), que serve como uma âncora para muitas proteínas da superfície celular. Essa alteração genética se traduz em uma deficiência total ou parcial de proteínas de superfície ligadas à célula mediante o GPI, como os CD55 e CD59. A deficiência dessas proteínas de superfície leva a um aumento da suscetibilidade dos eritrócitos à lise celular mediada por complemento, resultando em hemólise intravascular crónica (156). A análise deste distúrbio é efetuada em sangue periférico, para pesquisar a perda total ou parcial dos CD55 e CD59 nos eritrócitos e nos leucócitos (156).

O SPC recebe concentrados plaquetares provenientes do Serviço de Sangue para efetuar o **controlo de desleucocitação**, ou seja, para verificar se a remoção de leucócitos foi devidamente realizada. Com essa finalidade, são utilizados tubos *trucount*, iodeto de propídeo e RNase. O iodeto de propídeo marca somente os leucócitos, porque intercala as bases de DNA. Esse iodeto é detetável por CF ao emitir fluorescência, permitindo a quantificação dos leucócitos presentes na amostra. As esferas presentes nos tubos *trucount* servem para extrapolar o número de leucócitos presentes na amostra (157).

5. Conclusão e balanço final da aprendizagem

Por fim, a realização deste estágio foi um complemento importante para a consolidação da formação adquirida durante o mestrado em bioquímica, fornecendo oportunidades únicas para o enriquecimento dos conhecimentos teóricos aprendidos. A oportunidade de entrar em contacto com um vasto leque de metodologias, profissionais dispostos a transmitir conhecimentos reunidos durante vários anos de experiência e as boas condições de trabalho forneceram uma experiência rica e diversificada. Este estágio reforçou a noção da responsabilidade e do espírito crítico que o SPC exerce para assegurar a qualidade de todo o processo analítico. Também é de reconhecer e louvar a dedicação e o espírito de trabalho em equipa demonstrados pelos profissionais do SPC, nos tempos de pandemia que se sucederam. Resumindo, este estágio foi essencial para a minha formação profissional, em que forneceu diversas oportunidades para aplicar todo o conhecimento técnico e teórico aprendido, sempre com espírito crítico.

Concluindo, acredito que os objetivos propostos para este estágio foram alcançados, através de um contínuo processo de autoaprendizagem e de desenvolvimento de competências profissionais estimulados pelas atividades diárias nas áreas mais importantes de um laboratório de patologia clínica.

6. Referências Bibliográficas

1. Hospital pêro da covilhã centro hospitalar universitário cova da beira : Disponível em: <http://www.chcbeira.pt/?cix=584> Consultado a: 15/09/2019
2. Hospital pêro da covilhã centro hospitalar universitário cova da beira : Disponível em: <http://www.chcbeira.pt/?cix=584> Consultado a: 15/09/2019
3. Butina M. Body fluid analysis in the hematology laboratory. Rodak's hematology-e-book: Clinical principles and applications. 2019:236.
4. D'Agostino P, Edens A. Physiology, pleural fluid. StatPearls publishing; 2019.
5. Charalampidis C, Youroukou A, Lazaridis G, Baka S, Mpoukovinas I, Karavasilis V, et al. Pleura space anatomy. Journal of thoracic disease. 2015;7(1):S27.
6. Sureka B, Thukral B, Mittal K, Mittal A, Sinha M. Radiological review of pleural tumors. The indian journal of radiology & imaging. 2013;23(4):313.
7. Richardson S, Hill J, Skadsberg D, Ujhelyi M, Xiao Y-F, Iaizzo A. The pericardium. Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices: Springer; 2015. p. 163-74.
8. Vogiatzidis K, Zarogiannis G, Aidonidis I, Solenov I, Molyvdas A, Gourgoulianis I, et al. Physiology of pericardial fluid production and drainage. Frontiers in physiology. 2015;6:62.
9. Rodriguez R, Tan D. Structure and anatomy of the human pericardium. Progress in cardiovascular diseases. 2017;59(4):327-40.
10. Kalra A, Tuma F. Anatomy, abdomen and pelvis, peritoneum. StatPearls publishing; 2018.
11. Wefers C, Duiveman-de Boer T, Zusterzeel M, Massuger G, Fuchs D, Torensma R, et al. Different lipid regulation in ovarian cancer: Inhibition of the immune system. International journal of molecular sciences. 2018;19(1):273.
12. Comar R, Schulz T, Araújo N, Silva F, Haas P. Análise citológica do líquido peritoneal. Estudos de biologia. 2011;32(76/81).
13. Wasnik P, Maturen E, Kaza K, Al-Hawary M, Francis R. Primary and secondary disease of the peritoneum and mesentery: Review of anatomy and imaging features. Abdominal imaging. 2015;40(3):626-42.
14. Davidson B, Firat P, Michael W. Serous Effusions: Etiology, diagnosis, prognosis and therapy: Springer; 2018.
15. Skok K, Hladnik G, Grm A, Crnjac A. Malignant pleural effusion and its current management: A review. Medicina. 2019;55(8):490.
16. Light W. Pleural effusions. Medical clinics. 2011;95(6):1055-70.
17. Asciak R, Rahman M. Malignant pleural effusion: from diagnostics to therapeutics. Clinics in chest medicine. 2018;39(1):181-93.
18. Awadallah F, Bowling R, Sharma N, Mohan A. Malignant pleural effusion and cancer of unknown primary site: A review of literature. Annals of translational medicine. 2019;7(15).
19. Lepus M, Vivero M. Updates in effusion cytology. Surgical pathology clinics. 2018;11(3):523-44.
20. Small W, Donnelly D. Leibel and Phillips textbook of radiation oncology. JAMA. 2012;307(1):93.

21. Albugami S, Al-Husayni F, AlMalki A, Dumyati M, Zakri Y, AlRahimi J. Etiology of pericardial effusion and outcomes post pericardiocentesis in the western region of Saudi Arabia: A single-center experience. *Cureus*. 2020;12(1).
22. Vakamudi S, Ho N, Cremer C. Pericardial effusions: causes, diagnosis, and management. *Progress in cardiovascular diseases*. 2017;59(4):380-8.
23. Burazor I, Imazio M, Markel G, Adler Y. Malignant pericardial effusion. *Cardiology*. 2013;124(4):224-32.
24. Amer O, Elsiey H. Ascites: Causes, diagnosis, and treatment. *Liver cirrhosis: Update and current challenges*. 2017:117.
25. Cavazzoni E, Bugiantella W, Graziosi L, Franceschini S, Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International journal of clinical oncology*. 2013;18(1):1-9.
26. Patel M, Sahdev A, Reznick RH. CT, MRI and PET imaging in peritoneal malignancy. *Cancer Imaging*. 2011;11(1):123.
27. Davidson B. Malignant effusions: from diagnosis to biology. *Diagnostic cytopathology*. 2004;31(4):246-54.
28. Naylor B. Pleural, peritoneal, and pericardial effusions. *Comprehensive cytopathology*: Elsevier; 2008. p. 515-77.
29. Metzgeroth G, Kuhn C, Schultheis B, Heilmann R, Hastka J. Diagnostic accuracy of cytology and immunocytochemistry in carcinomatous effusions. *Cytopathology*. 2008;19(4):205-11.
30. Passetbosc-Faure K, Li G, Lambert C, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, et al. Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions. *Clinical cancer research*. 2005;11(19):6862-7.
31. Carneiro F, Muniz M, Pittella F, Carneiro M, Takano G, Vianna L, et al. A panel of markers for identification of malignant and non-malignant cells in culture from effusions. *Oncology reports*. 2017;38(6):3538-44.
32. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2017;37(2):163-76.
33. Hungerford G, Benesch J, Mano J, Reis R. Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin. *Photochemical & photobiological sciences*. 2007;6(2):152-8.
34. McKinnon K. Flow cytometry: An overview. *Current protocols in immunology*. 2018;120(1):5-1.
35. Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z, et al. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases. *International journal of molecular medicine*. 2018;42(4):1771-85.
36. Ordóñez N. Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Human pathology*. 2013;44(7):1195-215.
37. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019;3(6):165.
38. Patriarca C, Macchi R, Marschner A, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(1):68-75.
39. Ensani F, Nematizadeh F, Irvanlou G. Accuracy of immunohistochemistry in evaluation of malignant pleural and peritoneal effusions. *Polish journal of pathology*. 2011;62(2):95-100.

40. Pillai V, Cibas E, Dorfman D. A simplified flow cytometric immunophenotyping procedure for the diagnosis of effusions caused by epithelial malignancies. *American journal of clinical pathology*. 2013;139(5):672-81.
41. Acosta M, Pereira J, Arroz M. Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: a study of 238 cases. *Cytometry part b: Clinical cytometry: The journal of the international society for analytical cytology*. 2016;90(3):289-94.
42. Pillai V, Dorfman D. Flow cytometry of nonhematopoietic neoplasms. *Acta cytologica*. 2016;60(4):336-43.
43. Trevethan R. Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilitys, and pitfalls in research and practice. *Frontiers in public health*. 2017;5:307.
44. Stacchini A, Aliberti S, Demurtas A, Maletta F, Molinaro L, Godio L, et al. Flow cytometry identification of nonhemopoietic neoplasms during routine immunophenotyping. *International journal of laboratory hematology*. 2019;41(2):208-17.
45. Naeim F. The human cell differentiation molecules. *Hematopathology: Morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches*. 2009:27.
46. Hulspas R, O'Gorman M, Wood B, Gratama J, Sutherland D. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry part b: Clinical cytometry: The journal of the international society for analytical cytology*. 2009;76(6):355-64.
47. Hedley B, Keeney M. Technical issues: Flow cytometry and rare event analysis. *International journal of laboratory hematology*. 2013;35(3):344-50.
48. Inadomi J, Cello J, Koch J. Ultrasonographic determination of ascitic volume. *Hepatology*. 1996;24(3):549-51.
49. Han S, Zong S, Shi Q, Li H, Liu S, Yang W, et al. Is Ep-CAM expression a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer? A systematic meta-analysis. *EBioMedicine*. 2017;20:61-9.
50. Vatandoust S, Price T, Karapetis C. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(41):11767.
51. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: An immunohistochemical analysis. *Journal of clinical pathology*. 2011;64(5):415-20.
52. Laboratório de patologia clínica: Centro hospitalar universitário cova da beira, E.P.E.; Disponível em: <http://www.chcbeira.pt/?cix=729> Consultado a: 15/09/2019.
53. CHCB.PI.PATCLI.01. Processo pré-analítico. 6ª Edição ed. Centro hospitalar universitário cova da beira, E.P.E.2018.
54. Vieira K, Shitara E, Mendes M, Sumita N. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *Jornal brasileiro de patologia e medicina Laboratorial*. 2011;47(3):201-10.
55. Plebani M, Astion M, Barth JH, Chen W, Oliveira C, Escuer M, et al. Harmonization of quality indicators in laboratory medicine. A preliminary consensus. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2014;52(7):951-8.
56. CHCB.PI.PATCLI.02. Processo analítico. Centro hospitalar cova da beira, E.P.E.2016.
57. Pang R. A practical guide to internal quality control (IQC) for quantitative tests in medical laboratories (proposed guidelines). *Hong Kong association of medical laboratories*. 2009:1-40.

58. McPherson R, Pincus M. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods e-book: Elsevier health sciences; 2017.
59. Teixeira R. Procedimento operativo. Controlo de qualidade interno. Centro hospitalar universitário cova da beira, E.P.E.2019.
60. Moosavi S, Ghassabian S. Linearity of calibration curves for analytical methods: A review of criteria for assessment of method reliability. Calibration and validation of analytical methods: A sampling of current approaches. 2018:109.
61. World Health Organization. Overview of external quality assessment (EQA): module 10, content sheet 10-1. WHO, Geneva, Switzerland. 2011.
62. CHCB.PI.PATCLI.03. Processo pós-analítico. Centro hospitalar universitário cova da beira, E.P.E.2018.
63. Darwish I. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. International journal of biomedical science: 2006; 2(3):[217.
64. Immunoturbidimetry vs nephelometry for protein detection: Randoxlaboratories; 2016 Disponível em: <https://www.randox.com/immunoturbidimetry-vs-nephelometry/> Consultado a: 9/10/2019.
65. Sinwat W, Sappat A, Tuantranont A, Laiwattanapaisal W. On-site determination of microalbuminuria based on particle enhanced turbidimetric-inhibition immunoassay (PETINIA) by portable fiber-optic spectrometer. Journal of chemical & pharmaceutical research. 2012;4:2879-87.
66. Moticka E. A historical perspective on evidence-based immunology: Newnes; 2015.
67. Richter M. Electrochemiluminescence. Optical biosensors: Elsevier; 2008. p. 317-84.
68. Fung A, Knauer M, Blasutig I, Colantonio D, Kulasingam V. Evaluation of electrochemiluminescence immunoassays for immunosuppressive drugs on the roche cobas e411 analyzer. Research. 2017;6.
69. Fereja T, Hymete A, Gunasekaran T. A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on pharmaceutical analysis. ISRN Spectroscopy. 2013;2013.
70. Pearce J. Open-source lab: How to build your own hardware and reduce research costs: Newnes; 2013.
71. Wasung M, Chawla L, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? Clinica chimica acta. 2015;438:350-7.
72. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. New England journal of medicine. 2015;372(19):1832-43.
73. Stabler S. Vitamin B12 deficiency. New England journal of medicine. 2013;368(2):149-60.
74. Klaus D, Carvalho D, Baldessar M. Caso clássico de mieloma múltiplo: Uma revisão. Arquivos catarinenses de medicina. 2009;38(4):110-3.
75. Aguiar F, Ferreira-Júnior M, Sales M, Cruz-Neto L, Fonseca L, Sumita N, et al. Proteína C reativa: Aplicações clínicas e propostas para utilização racional. Revista da associação médica brasileira. 2013;59(1):85-92.
76. Bottomley P, Panjrath G, Lai S, Hirsch G, Wu K, Najjar S, et al. Metabolic rates of ATP transfer through creatine kinase (CK Flux) predict clinical heart failure events and death. Science translational medicine. 2013;5(215):215.

77. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Van den Bergh R, Bolla M, Van Casteren N, et al. Guidelines on prostate cancer. *European urology*. 2014;65(1):124-37.
78. Oliveira G, Fonseca C. Uso de marcadores tumorais no diagnóstico e acompanhamento do tratamento do câncer. *Revista eletrônica de farmácia*. 2011;8(2):15.
79. Mackawy A, Al-Ayed B, Al-Rashidi B. Vitamin D deficiency and its association with thyroid disease. *International journal of health sciences*. 2013;7(3):267.
80. Moeller K, Lee K, Kissack J, editors. *Urine drug screening: Practical guide for clinicians*. 2008: Elsevier.
81. Jubaida N, Mondal M, Kawsar N. Seroprevalence of rubella antibodies in pregnant women. *Journal of armed forces medical college, Bangladesh*. 2011;7(1):20-4.
82. Amendoeira M, Coura L. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia medica*. 2010;20(1):20.
83. Goeldner I, Skare T, Messias Reason I, Rosa Utiyama S. Artrite reumatoide: Uma visão atual. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. 2011;47(5):495-503.
84. Junior J, Neto M, Lins L, Flores N. Existe associação entre a colonoscopia e a calprotectina. *Journal of coloproctology*. 2018;38:80.
85. Krefta B, Vechi C, Pinezi F, Mezzomo T. Monitoramento de eletrólitos, de marcadores de danos musculares e função renal em atletas de futebol de elite. *Revista brasileira de nutrição esportiva*. 2018;11(68):1042-9.
86. Nogueira T. Insuficiência renal crônica. *Revista UNIPLAC*. 2015;3(1).
87. Seña A, White B, Sparling P. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: A paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *Clinical infectious diseases*. 2010;51(6):700-8.
88. Hamilton R. Assessment of human allergic diseases. *Clinical immunology: Elsevier*; 2019. p. 1283-95.
89. Johansson S, Hourihane J, Bousquet Jr., Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813-24.
90. Cianferoni A, Spergel J. Food allergy: Review, classification and diagnosis. *Allergology international*. 2009;58(4):457-66.
91. Test principle immunoCAP total IgE: Thermofisher scientific; Disponível em: <http://www.phadia.com/en-GB/5/Products/ImmunoCAP-Assays/ImmunoCAP-Total-IgE/Test-Principle-ImmunoCAP-Total-IgE/> Consultado a: 01/10/2019.
92. ImmunoCAP specific IgE Thermofisher scientific; Disponível em: <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Assays/sIgE/> Consultado a: 01/10/2019.
93. Peebles R, Church M, Durham S. Principles of allergy diagnosis. *Allergy: Elsevier*; 2012. p. 129-46.
94. Fluorenzimoimunoensaio para a determinação da calprotectina. Phadia; 2015.
95. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Viruses: Structure, function, and uses. *Molecular cell biology 4th edition: WH Freeman*; 2000.
96. Cresswell F, Fisher M, Hughes D, Shaw S, Homer G, Hassan-Ibrahim M. Hepatitis C core antigen testing: A reliable, quick, and potentially cost-effective alternative to hepatitis C

polymerase chain reaction in diagnosing acute hepatitis C virus infection. *Clinical infectious diseases*. 2014;60(2):263-6.

97. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). *The journal of investigative dermatology*. 2013;133(3):e6.

98. Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). Teddington: LGC. 2013.

99. Huijskens E, Biesmans R, Buiting A, Obihara C, Rossen J. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *Virology journal*. 2012;9(1):276.

100. Alves M, Scotti M, Felix M, Ishiki H, Rodrigues C, Ribeiro F, et al. In silico and in vivo toxicological evaluation of cissampelos sympodialis secondary metabolites in rattus norvegicus. *Current drug metabolism*. 2017;18(6):566-76.

101. Kurien B, Scofield R. *Protein electrophoresis: methods and protocols*: Springer; 2012.

102. Csako G. Immunofixation electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies. *Protein electrophoresis*: Springer; 2012. p. 147-71.

103. Liu X, Sun S, Song Y. Clinical value of immunofixation electrophoresis, serum protein electrophoresis, quantitative analysis of in diagnosis of multiple myeloma. *Chinese journal of laboratory diagnosis*. 2010;5.

104. Wood P, McElroy Y, Stone M. Comparison of serum immunofixation electrophoresis and free light chain assays in the detection of monoclonal gammopathies. *Clinical lymphoma myeloma and leukemia*. 2010;10(4):278-80.

105. Eisele L, Dürig J, Hüttmann A, Dührsen U, Assert R, Bokhof B, et al. Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany. *Annals of hematology*. 2012;91(2):243-8.

106. Levinson S. Urine protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis supplement one another in characterizing proteinuria. *Annals of clinical & laboratory science*. 2000;30(1):79-84.

107. Basile U, Gulli F, Torti E, Napodano C, Dell'Abate M, Santis E, et al. Evaluation of screening method for Bence Jones protein analysis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016;54(11):331-3.

108. Friedman D, Hoving S, Westermeier R. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. Elsevier; 2009. p. 515-40.

109. Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier P-E, Barbe V, Samson D, et al. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science*. 2001;293(5537):2093-8.

110. Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. *Annals of the new york academy of sciences*. 2005;1063(1):105-14.

111. Camer G, Alejandria M, Amor M, Satoh H, Muramatsu Y, Ueno H, et al. Detection of antibodies against spotted fever group *Rickettsia* (SFGR), typhus group *Rickettsia* (TGR), and *Coxiella burnetii* in human febrile patients in the Philippines. *Japanese journal of infectious diseases*. 2003;56(1):26-8.

112. Odell I, Cook D. Immunofluorescence techniques. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(1):e4.

113. *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA. Vircell microbiologists; 2017.

114. *Rickettsia conorii* IFA IgG. Vircell microbiologists; 2017.

115. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015;19(6):689-705.
116. Jaffee W, Trucco E, Levy S, Weiss R. Is this urine really negative? A systematic review of tampering methods in urine drug screening and testing. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2007;33(1):33-42.
117. Fan J, Wang M, Wang C, Cao Y. Advances in human chorionic gonadotropin detection technologies: A review. *Bioanalysis*. 2017;9(19):1509-29.
118. Cavanaugh C, Perazella M. Urine sediment examination in the diagnosis and management of kidney disease: Core curriculum 2019. *American Journal of Kidney Diseases*. 2019;73(2):258-72.
119. Tille P. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*: Elsevier health sciences; 2015.
120. Zimbro M, Power D, Miller S, Wilson G, Johnson J. *Manual of microbiological culture media*. Maryland: Beckton Dickinson diagnostics. 2009.
121. Meios de cultura convencionais: Biomérieux; Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais>. Consultado a 3/01/2020.
122. Converse R, Blackwood A, Kirs M, Griffith J, Noble R. Rapid QPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp. as a tool for assessing fecal contamination in recreational waters. *Water Research*. 2009;43(19):4828-37.
123. Culture media for perinatal GBS prevention: Biomérieux; Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/node/1583>. Consultado a 03/01/2020.
124. BD BBL™MycoPrep™: Becton, Dickinson and company; Disponível em: <https://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html?func=new&>. Consultado a 10/02/2020.
125. Pereira R, Petrechen G. Principais métodos diagnósticos bacterianos: Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária, garça*. 2011(16):1-12.
126. CHCB.PO.PATCLI.10. *Processamento de amostras em microbiologia*. Centro hospitalar universitário cova da beira, E.P.E.2018.
127. Simerville J, Maxted W, Pahira J. Urinalysis: a comprehensive review. *American Family Physician*. 2005;71(6):1153-62.
128. Kaewpitoon S, Rujirakul R, Tongtawee T, Matrakul L, Panpimanmas S, Wakkuwattapong P, et al. Detection of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* using a mini parasep SF faecal parasite concentrator. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17(1):373-6.
129. Gutiérrez-Cisneros M, Martínez-Ruiz R, Subirats M, Merino F, Millán R, Fuentes I. Assessment of two commercially available immunochromatographic assays for a rapid diagnosis of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;29(3):201-3.
130. De Grazia S, Bonura F, Pepe A, Muli S, Cappa V, Collura A, et al. Performance analysis of two immunochromatographic assays for the diagnosis of rotavirus infection. *Journal of Virological Methods*. 2017;243:50-4.
131. Bruggink L, Witlox K, Sameer R, Catton M, Marshall J. Evaluation of the RIDA® QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *Journal of Virological Methods*. 2011;173(1):121-6.

132. Sharp S, Ruden L, Pohl J, Hatcher P, Jayne L, Ivie W. Evaluation of the C. Diff quik chek complete assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(6):2082-6.
133. Prasetyo D, Mertens P, Labrune V, Leclipteux T. Comparison of enzyme-immunoassay and rapid immunochromatography test for detecting *Helicobacter pylori* stool antigen. *Majalah kedokteran bandung*. 2014;46(1):52-6.
134. hiang C, Jeng J, Wang W, Jheng B, Hsu W, Chen B. A comparative study of three fecal occult blood tests in upper gastrointestinal bleeding. *The kaohsiung journal of medical sciences*. 2006;22(5):223-8.
135. Meliço-Silvestre A, Saraiva da Cunha J. *Doenças Infecciosas: O desafio da clínica*. Departamento de doenças infecciosas do hospital da universidade de coimbra; 2008. p. 1-148.
136. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical microbiology: Elsevier health sciences*; 2015.
137. Rüsç-Gerdes S, Pfyffer G, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):688-92.
138. Kolibab K, Yang A, Parra M, Derrick SC, Morris SL. Time to detection of *Mycobacterium tuberculosis* using the MGIT 320 system correlates with colony counting in preclinical testing of new vaccines. *Clinical Vaccine Immunology*. 2014;21(3):453-5.
139. Kassaza K, Orikiriza P, Llosa A, Bazira J, Nyehangane D, Page A-L, et al. Lowenstein-Jensen selective medium for reducing contamination in *Mycobacterium tuberculosis* culture. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(7):2671-3.
140. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Campisi D, Castellotti PF, et al. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. *European respiratory journal*. 2016;48(5):1411-9.
141. Ko YJ, Kim J, Kim H-N, Yoon S-Y, Lim CS, Lee CK. Diagnostic performance of the Xpert Carba-R assay for active surveillance of rectal carbapenemase-producing organisms in intensive care unit patients. *Antimicrobial resistance & infection control*. 2019;8(1):127.
142. Pincus D. *Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system*. Encyclopedia of rapid microbiological methods bethesda, MD: Parenteral drug association. 2006:1-32.
143. Hoffbrand A, Moss P. *Fundamentos em hematologia*. 2013. p. 454.
144. George-Gay B, Parker K. Understanding the complete blood count with differential. *Journal of perianesthesia nursing*. 2003;18(2):96-117.
145. Carr J, Geesaman S, Czader M. Performance evaluation of the new UniCel DxH800 coulter cellular analysis system in a large hospital setting. *Laboratory medicine*. 2012;43(5):157-63.
146. Don M. The Coulter principle: foundation of an industry. *Journal of the association for laboratory automation*. 2003;8(6):72-81.
147. Bain BJ. *Blood cells: A practical guide: John Wiley & Sons*; 2014.
148. Dunning K, Safo AO. The ultimate Wright-Giemsa stain: 60 years in the making. *Biotechnic & histochemistry*. 2011;86(2):69-75.

149. Kunwande J, Srivorakun H, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. ARKRAY ADAMS A1c HA-8180T analyzer for diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies common in southeast Asia. *Laboratory medicine*. 2014;45(3):112-21.
150. Santos V, Cunha S, Da Cunha D. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Revista da Associação Médica brasileira*. 2000;46(3):232-6.
151. Favaloro E, Bonar R, editors. External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update 2014: Thieme Medical Publishers.
152. Crichton G. *Methods of Coagulation*. Haemostasis: Springer; 2013. p. 73-83.
153. Day G-J, Lockwood C, Payton JE, Uy GL, Schiffer C, Feldman G, et al. Development of Xpert® BCR-ABL ultra, an automated and standardized multiplex assay with required performance characteristics for BCR-ABL1 quantitative measurement on an international reporting scale. American Society of Hematology Washington, DC; 2015.
154. Dorwal P, Moore H, Stewart P, Harrison B, Monaghan J. CD326 (EpCAM) testing by flow cytometric BerEP4 antibody is a useful and rapid adjunct to histopathology. *Cytometry part b: Clinical cytometry*. 2018;94(3):536-41.
155. Fleisher T, Oliveira J. *Flow cytometry*. Clinical immunology: Elsevier; 2019. p. 1239-51.
156. Hernández-Campo P, Almeida J, Orfao A. Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Medicina clínica*. 2008;131(16):617-30.
157. Dzik S, Moroff G, Dumont L. Biomedical excellence for safer transfusion working party of the I. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry. *Transfusion*. 2000;40(5):513-20.