



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Revisão e Atualização da Imunofenotipagem do Lavado Broncoalveolar no Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira**

**Mariana Pombal Feijó**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

**Versão Final Após Defesa**

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Andreia Sofia dos Reis Monteiro  
Coorientadora: Doutora Sara Carina de Lima Correia

**Covilhã, julho de 2019**

*Revisão e Atualização da Imunofenotipagem do Lavado Broncoalveolar no Centro Hospitalar  
Universitário da Cova da Beira*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Andreia, agradeço por tudo que o que me ensinou ao longo deste ano, pelo tempo e esforço investido e por tornar possível a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Doutora Sara Correia agradeço pela acessibilidade e disponibilidade.

À Dr.<sup>a</sup> Patrícia Amantegui, um muito obrigada por toda a paciência, motivação e pela contribuição ativa para este trabalho.

Ao Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, em especial ao Serviço de Patologia Clínica, onde o estágio e o projeto foram desenvolvidos. À Dra. Conceição Faria por ter permitido a realização deste estágio e pelo constante interesse e acessibilidade. A todos os colaboradores por me proporcionarem uma integração tão fácil, um ótimo ambiente laboral e por tudo o que com eles aprendi.

À Universidade da Beira Interior, onde realizei a minha formação académica.

À minha colega de estágio e amiga Cristiana Reis por toda a entreaajuda, apoio e companheirismo.

À minha família, por ser o meu maior alicerce e fonte de alegria.

Ao meu namorado e melhor amigo Alexandre, por estar sempre presente.

Aos meus amigos, por todo o apoio.



## Resumo

A lavagem broncoalveolar é uma técnica amplamente aceite como método de diagnóstico complementar em várias patologias do trato respiratório inferior, especialmente no que diz respeito ao grupo das doenças do interstício pulmonar.

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira conta com uma experiência de aproximadamente 13 anos no estudo de lavados broncoalveolares (LBA) por citometria de fluxo (CMF) e análise morfológica. Assim, é de extrema importância efetuar um estudo retrospectivo, com o objetivo de rever a bibliografia recente, atualizar o conhecimento relativo aos diferentes perfis celulares encontrados no LBA em condições normais e patológicas e verificar a necessidade de atualização dos protocolos vigentes.

Com a finalidade anteriormente referida, os resultados da análise morfológica e por CMF dos 763 LBA realizados entre 2006 e 2018 foram recolhidos, organizados e estudados tendo em conta outros dados importantes como o diagnóstico final, idade, sexo e hábitos tabágicos do paciente. Além disso, os resultados de CMF dos LBA realizados entre 2016 e 2018 foram reanalisados, de forma a identificar novas populações celulares. Os grupos estudados foram: doenças do interstício pulmonar (sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática (FPI), pneumonite por hipersensibilidade (PH)), doenças obstrutivas (doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e asma brônquica (AB)), infecciosas (pneumonia) e indivíduos sem patologia pulmonar.

Quanto ao padrão celular dos LBA estudados tem-se como principais resultados: (1) a linfocitose verificada na sarcoidose e na PH, (2) a razão CD4/CD8 aumentada na sarcoidose, (3) o aumento de neutrófilos na pneumonia e na PH, (4) o aumento de linfócitos *natural killer* (NK) na DPOC, (5) a inespecificidade do padrão celular do LBA na FPI e (6) a diminuição da razão CD4/CD8, assim como o aumento de macrófagos nos fumadores em comparação com os não fumadores. Quanto à identificação de novas populações celulares com relevância clínica no LBA, verificou-se a presença de células NKT, demonstrando-se significativamente elevadas nas doenças obstrutivas estudadas.

Após revisão bibliográfica foi possível verificar que os resultados apresentados neste estudo estão de acordo com o descrito na literatura. Sendo que a atualização dos protocolos vigentes torna-se imprescindível para a melhoria da abordagem analítica deste tipo de líquido biológico tendo em vista a identificação de novas populações celulares com interesse clínico e o registo de alguns pormenores que podem influenciar os resultados e a sua interpretação, tais como hábitos tabágicos, número de células epiteliais, seringas utilizadas, aspeto macroscópico e volume instilado e recolhido. Esta atualização tornará a análise do LBA mais completa e útil para o clínico nas decisões de diagnóstico.

## **Palavras-chave**

Citometria de Fluxo, Doenças Pulmonares, Lavado Broncoalveolar

## Abstract

Bronchoalveolar lavage (BAL) is a technique accepted as a complementary diagnostic method in several lower respiratory tract pathologies, with special emphasis to the group of interstitial lung diseases.

The Clinical Pathology Service of *Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira* has approximately 13 years of experience in the study of BAL by flow cytometry (CMF) and morphological analysis. Thus, it is extremely important to carry out a retrospective study aiming the review of recent literature, the update of the knowledge regarding the different cell profiles found in BAL under normal and pathological conditions, and to verify the need to update the current protocols. The results of morphological and CMF analysis of the 763 BAL performed between 2006 and 2018 were collected, organized and studied, taking into account other important data such as the patient's final diagnosis, age, gender and smoking habits. In addition, CMF results from BAL performed between 2016 and 2018 were reanalyzed in order to identify new cell populations. The groups studied were: interstitial lung diseases (sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), hypersensitivity pneumonitis (HP)), obstructive diseases (chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial asthma (BA)), infectious diseases (pneumonia), and subjects without pulmonary pathology.

The main results of this study are: (1) lymphocytosis verified in sarcoidosis and HP, (2) increased CD4/CD8 ratio in sarcoidosis, (3) increased neutrophils in pneumonia and HP, (4) increased natural killer (NK) lymphocytes in COPD, (5) non-specific cellular pattern of BAL in IPF, (6) decreased CD4/CD8 ratio, as well as increased macrophages in smokers compared with non-smokers and (7) presence of NKT cells, showing a significant increase in obstructive diseases.

The updating of the current protocols becomes essential for the improvement of BAL analytical approach in order to identify new cellular populations with clinical interest and to record some details that may influence the results and their interpretation, such as smoking habits, number of epithelial cells, syringes, macroscopic appearance and the instilled and collected volume. This update will make LBA analysis more complete and useful to the clinician in diagnostic decisions.

## Keywords

Bronchoalveolar Lavage, Flow Cytometry, Pulmonary Diseases



# Índice

<b>I - Introdução.....</b>	<b>1</b>
1. Enquadramento e Motivação.....	1
2. Entidade Acolhedora.....	1
<b>II - Objetivo Geral.....</b>	<b>2</b>
<b>III - Projeto de Investigação.....</b>	<b>3</b>
1. Contextualização Teórica.....	3
1.1. Sistema Imunitário.....	3
1.2. Sistema Respiratório e Anatomia Pulmonar.....	5
1.3. Broncoscopia e Lavagem Broncoalveolar.....	5
1.4. Critérios de Diagnóstico de Patologias Pulmonares: Utilidade do Lavado Broncoalveolar.....	7
1.4.1. Doenças do Interstício Pulmonar.....	7
1.4.1.1. Sarcoidose.....	7
1.4.1.2. Fibrose Pulmonar Idiopática.....	9
1.4.1.3. Pneumonite por Hipersensibilidade.....	9
1.4.2. Doenças Obstrutivas.....	11
1.4.2.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica.....	11
1.4.2.2. Asma Brônquica.....	11
1.4.3. Doenças Infeciosas.....	12
1.4.3.1. Pneumonia.....	12
2. Objetivo do Projeto de Investigação.....	12
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1. Receção e Manuseamento de Amostras.....	13
3.2. Processamento de Amostras.....	13
3.2.1. Análise Morfológica.....	13
3.2.2. Identificação das Populações Celulares por Imunofluorescência...	14
3.2.3. Análise por Citometria de Fluxo.....	15
3.3. Recolha de Dados.....	15
3.4. População em Estudo.....	16
3.5. Critérios de Seleção de Amostras.....	17
3.6. Definição de Valores de Referência.....	18
3.7. Análise Estatística.....	18
4. Resultados.....	18
4.1. Casuística dos Lavados Broncoalveolares.....	18
4.2. Padrão Celular dos Lavados Broncoalveolares.....	19

4.2.1. Indivíduos Saudáveis.....	22
4.2.2. Sarcoidose.....	23
4.2.3. Fibrose Pulmonar Idiopática.....	24
4.2.4. Pneumonite por Hipersensibilidade.....	25
4.2.5. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica.....	27
4.2.6. Asma Brônquica.....	28
4.2.7. Pneumonia.....	29
4.3. Hábitos Tabágicos no Diagnóstico Diferencial.....	30
4.4. Células B, NK e NKT no Lavado Broncoalveolar.....	33
5. Discussão.....	34
6. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	39
<b>IV - Trabalho Desenvolvido no Estágio.....</b>	<b>40</b>
1. Procedimento Analítico.....	40
2. Controlo de Qualidade.....	41
3. Produtos Biológicos e Distribuição.....	42
4. Validação de Resultados.....	44
5. Laboratório de Microbiologia.....	44
5.1. Análise Microscópica.....	44
5.1.1. Coloração de Gram.....	45
5.1.2. Coloração Álcool-Ácido Resistente (Ziehl-Neelsen) .....	46
5.2. Meios de Cultura.....	46
5.3. Condições de Cultura.....	49
5.4. Produtos Biológicos.....	49
5.5. Deteção de Genes de Resistência a Antibióticos.....	58
5.5.1. Deteção de <i>M. tuberculosis</i> e resistência à Rifampicina.....	58
5.5.2. Deteção de Gram-Negativos não Suscetíveis a Carbapenemos.....	59
5.5.3. Deteção de <i>S. aureus</i> Resistente à Meticilina.....	59
5.5.4. Deteção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> .....	59
5.6. Testes de Identificação e Suscetibilidade a Antibióticos.....	60
5.6.1. Testes Manuais.....	60
5.6.2. Testes Automáticos.....	61
5.7. Principais Microrganismos Identificados.....	62
6. Laboratório de Imunoquímica.....	64
6.1. Química Analítica.....	64
6.1.1. Aparelhos Utilizados.....	64
6.1.2. Técnicas e Parâmetros Analisados.....	65
6.2. Testes Imunológicos.....	67
6.3. Virologia.....	70
6.3.1. Vírus Respiratórios.....	70

6.3.2. Vírus da Imunodeficiência Humana e da Vírus da Hepatite C.....	71
6.4. Pesquisa de <i>Coxiella burnetii</i> e <i>Rickettsia conorii</i> .....	73
6.5. Uranálise.....	74
6.6. Eletroforese de Proteínas.....	75
6.6.1. Proteinograma.....	75
6.6.2. Imunofixação.....	76
6.6.2.1. Imunofixação Sérica.....	76
6.6.2.2. Imunofixação Urinária.....	77
6.7. Testes Rápidos.....	78
6.7.1. Testes de <i>Screening</i> para Drogas de Abuso.....	78
6.7.2. Testes para Detecção da Gonadotrofina Coriônica Humana...	79
7. Laboratório de Hematologia.....	79
7.1. Hemograma.....	79
7.1.1. Técnica e Fundamento.....	80
7.2. Análise Microscópica.....	81
7.2.1. Esfregaço Sanguíneo.....	81
7.2.2. Coloração de May-Grunwald/Giemsa.....	82
7.2.3. Coloração de Perls.....	82
7.2.4. Coloração da Fosfatase Alcalina.....	83
7.2.5. Teste de Falciformação.....	83
7.3. Hemoglobina Glicada, H <sub>2</sub> e Fetal.....	84
7.4. Velocidade de Sedimentação.....	85
7.5. Coagulação.....	85
7.5.1. Plaquetas.....	86
7.5.2. Cascata da Coagulação.....	87
7.6. Trombofilia.....	89
7.7. Citometria de Fluxo.....	90
V - Conclusão e Balanço Final de Aprendizagem.....	92
VI - Referências Bibliográficas.....	93
VII - Anexos: Publicações e Comunicações.....	99

*Revisão e Atualização da Imunofenotipagem do Lavado Broncoalveolar no Centro Hospitalar  
Universitário da Cova da Beira*

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1.</b> - Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira	1
<b>Figura 2.</b> - Principais áreas de diagnóstico do Serviço de Patologia Clínica e número de análises efetuadas em 2018	2
<b>Figura 3.</b> - Representação esquemática do pulmão e estruturas associadas	5
<b>Figura 4.</b> - Representação do procedimento de broncofibroscopia flexível para recolha do lavado broncoalveolar	6
<b>Figura 5.</b> - Imagem de microscopia ótica do lavado broncoalveolar	14
<b>Figura 6.</b> - Estratégia utilizada para análise dos dados obtidos por citometria de fluxo	15
<b>Figura 7.</b> - Número de lavados broncoalveolares analisados por citometria de fluxo ao longo dos anos no Centro Hospitalar da Cova da Beira	18
<b>Figura 8.</b> - Distribuição da amostra em estudo por faixas etárias	19
<b>Figura 9.</b> - Percentagem de linfócitos totais, linfócitos T, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos distribuídas pelas patologias em estudo	21
<b>Figura 10.</b> - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos em indivíduos saudáveis	22
<b>Figura 11.</b> - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na sarcoidose	23
<b>Figura 12.</b> - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores e fumadores com sarcoidose	24
<b>Figura 13.</b> - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na fibrose pulmonar idiopática	25
<b>Figura 14.</b> - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com fibrose pulmonar idiopática	25
<b>Figura 15.</b> - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na pneumonite por	26

hipersensibilidade

**Figura 16.** - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com pneumonite por hipersensibilidade 26

**Figura 17.** - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na doença pulmonar obstrutiva crónica 27

**Figura 18.** - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com doença pulmonar obstrutiva crónica 28

**Figura 19.** - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na asma brônquica 28

**Figura 20.** - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores e fumadores com asma brônquica 29

**Figura 21.** - Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na pneumonia 30

**Figura 22.** - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com pneumonia 30

**Figura 23.** - Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos em pacientes não fumadores e fumadores nas patologias em estudo 32

**Figura 24.** - Percentagem de linfócitos B, NK e NKT nas patologias em estudo 34

**Figura 25.** - Fases do processo analítico 41

**Figura 26.** - Produtos biológicos analisados no serviço de patologia clínica e critérios de rejeição de amostra 43

**Figura 27.** - Cobas® p612 44

**Figura 28.** - Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e morfologia das bactérias 45

**Figura 29.** - Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia 48

**Figura 30.** - Representação da cassete de teste 51

<b>Figura 31.</b> - Principais produtos biológicos analisados no laboratório de microbiologia	57
<b>Figura 32.</b> - Cartucho e sistema GeneXpert®	58
<b>Figura 33.</b> - Teste da optoquina e teste de gradiente de difusão (Etest)	61
<b>Figura 34.</b> - Testes automáticos de identificação e de suscetibilidade a antibióticos	62
<b>Figura 35.</b> - Cobas® 6000	65
<b>Figura 36.</b> - Analisador architect i2000SR e técnica de quimioluminescência	66
<b>Figura 37.</b> - Aparelho ImmunoCAP250 e reação alérgica atópica	68
<b>Figura 38.</b> - Testes de IgE total e específica	69
<b>Figura 39.</b> - Teste EliA Calprotectina	70
<b>Figura 40.</b> - Aparelho MagNA Pure Compact	71
<b>Figura 41.</b> - Sistema CFX96™ com termociclador C1000™	71
<b>Figura 42.</b> - Analisador Cobas® 4800	72
<b>Figura 43.</b> - Curvas de crescimento do alvo para uma série de diluições de amostra	73
<b>Figura 44.</b> - Resultados de microscopia de fluorescência	73
<b>Figura 45.</b> - Sedimento urinário	74
<b>Figura 46.</b> - Sistema para uranálise	75
<b>Figura 47.</b> - Aparelhos utilizados para efetuar proteinograma e imunofixação	75
<b>Figura 48.</b> - Perfil eletroforético do proteinograma	76
<b>Figura 49.</b> - Algoritmo de escolha do procedimento e gel de imunofixação	76
<b>Figura 50.</b> - Gel para imunofixação sérica e gel pentavalente	77
<b>Figura 51.</b> - Gel para perfil urinário (painel alargado)	77
<b>Figura 52.</b> - Gel para pesquisa de Bence-Jones	78
<b>Figura 53.</b> - Testes imunocromatográficos realizados	79

<b>Figura 54.</b> - Unicel DxH 800	81
<b>Figura 55.</b> - Técnica de esfregaço sanguíneo	81
<b>Figura 56.</b> - Coloração de May-Grunwald/Giemsa em sangue periférico e em medula óssea	82
<b>Figura 57.</b> - Coloração de Perls (medula óssea)	83
<b>Figura 58.</b> - Coloração de fosfatase alcalina (medula óssea)	83
<b>Figura 59.</b> - Aparelho ADAMS™ A1c HA-8180V e respetivos resultados	85
<b>Figura 60.</b> - Sediplus® S 2000	85
<b>Figura 61.</b> - Hemostase primária	86
<b>Figura 62.</b> - Aparelho PFA-200	86
<b>Figura 63.</b> - Aparelho ACL TOP e hemostase secundária	87
<b>Figura 64.</b> - Aparelho FACSCalibur™ (Becton Dickinson) e principais componentes	90

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> – Apresentação clínica, resultados de tomografia computadorizada de alta resolução e diagnóstico diferencial da sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite por hipersensibilidade	10
<b>Tabela 2.</b> – Painel de anticorpos utilizados na marcação das células	14
<b>Tabela 3.</b> – Distribuição populacional por diagnóstico final e hábitos tabágicos	17
<b>Tabela 4.</b> – Análise de frequências das patologias em estudo, discriminadas por sexo	19
<b>Tabela 5.</b> – Padrão celular dos lavados broncoalveolares nas patologias pulmonares estudadas	20
<b>Tabela 6.</b> – Comparação de resultados entre estudos	23
<b>Tabela 7.</b> – Populações linfocitárias dos LBA nas patologias pulmonares estudadas	33
<b>Tabela 8.</b> – Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira	46
<b>Tabela 9.</b> – Parâmetros analisados, aparelhos, técnicas de análise e produtos biológicos	67
<b>Tabela 10.</b> – Testes efetuados, respetiva função e patologias/alterações associadas	89



## Lista de Acrónimos

AB	Asma Brônquica
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
APC	Aloficocianina
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira
CMF	Citometria de Fluxo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DIP	Doença do Interstício Pulmonar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FPI	Fibrose Pulmonar Idiopática
Hb	Hemoglobina
hCG	Gonadotrofina Coriónica Humana
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado Broncoalveolar
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Major
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Peridina-Clorofila
PH	Pneumonite por Hipersensibilidade
RNA	Ácido Ribonucleico
SPC	Serviço de Patologia Clínica
Tc	T citotóxicos
TCAR	Tomografia Computorizada de Alta Resolução
TCR	Recetor dos Linfócitos T
Th	T <i>helper</i>



# I - Introdução

## 1. Enquadramento e Motivação

Este trabalho surge no âmbito da componente de estágio (60 ECTS) que enquadra o programa do 2º ano do Mestrado em Bioquímica da Universidade da Beira Interior. Assim, com este trabalho pretende-se consolidar o conhecimento adquirido ao longo do mestrado em Bioquímica, na área das análises clínicas. Este estágio concede a oportunidade de, em contexto de trabalho, conhecer os vários tipos de técnicas utilizadas nas diversas áreas de um laboratório de patologia clínica. Sendo, desta forma, um passo crucial para o percurso profissional e desenvolvimento pessoal.

## 2. Entidade Acolhedora

A entidade acolhedora deste estágio foi o Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, E.P.E. (CHUCB, Figura 1), mais concretamente o Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Pêro da Covilhã. A missão do CHUCB baseia-se na prestação de cuidados de saúde com eficiência, qualidade, em tempo útil e a custos socialmente comportáveis à população da sua área de influência, e a todos os cidadãos em geral. Simultaneamente participa no ensino de alta responsabilidade, por ser Hospital Nuclear da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, nos termos do Protocolo nº 11/2001, publicado em Diário da Republica, II Série de 16 de Abril de 2001; na participação no ensino pré e pós graduado, em colaboração com as Escolas Superiores de Enfermagem e Escolas Superiores de Tecnologia de Saúde e outras com as quais venham a ser celebrados protocolos (1).



Figura 1. Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira (CHUCB). Logótipo do CHUCB e fotografia do Hospital Pêro da Covilhã. Adaptada de (1).

O SPC iniciou a sua atividade no Hospital da Santa Casa da Misericórdia, que mais tarde se designou por Hospital Distrital da Covilhã (1). Em Janeiro de 2000, este Serviço passou a ocupar as novas instalações no novo Hospital Pêro da Covilhã e integrou também o SPC do Hospital do Fundão, pertencendo estes dois Hospitais ao CHUCB (1). Este serviço tem como missão a recolha de produtos biológicos aos utentes internados, provenientes da consulta externa e externos à instituição que recorrem ao serviço, efetuando a determinação analítica dos parâmetros solicitados, de forma a complementar o diagnóstico clínico e possibilitar a

instituição de uma terapêutica adequada; efetuar colheitas em segurança, auscultando 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 (1). No piso 0 localiza-se o laboratório, com 6 áreas distintas (Figura 2), e no piso 1 a central de colheitas e área de atendimento ao público (1).

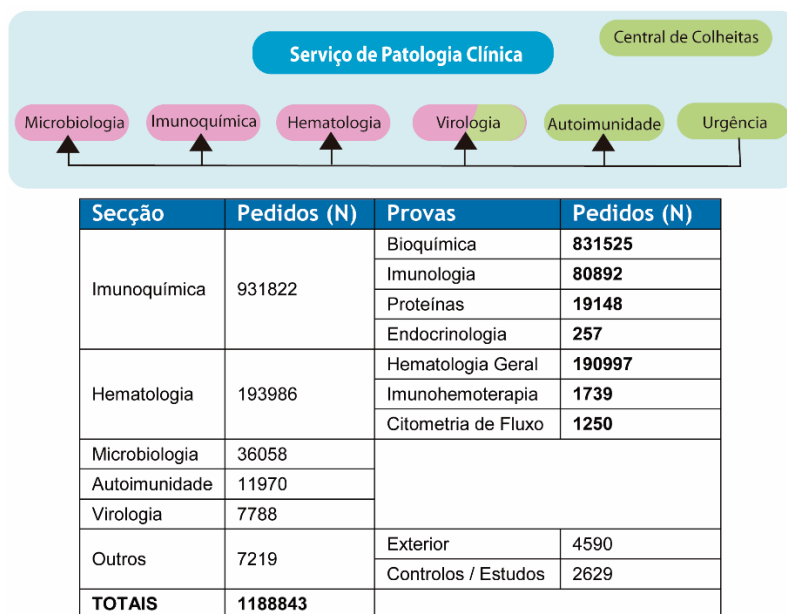


Figura 2. Principais áreas de diagnóstico do Serviço de Patologia Clínica (SPC) e número de análises efetuadas em 2018. A cor-de-rosa, as secções onde decorreu o estágio.

## II - Objetivo Geral

Durante o período de 10 de setembro a 30 de abril (1272 horas) foi desenvolvido o presente trabalho, englobando duas vertentes: a primeira, projeto de investigação - com o objetivo da aquisição de experiência na área da investigação clínica através da elaboração de um estudo a nível hospitalar com a escrita do referido projeto; a segunda, estágio curricular - com o objetivo de permitir o contacto direto e prático na aquisição de competências laborais nas áreas de microbiologia, imunoquímica e hematologia, do qual foi elaborado um relatório descritivo incluído neste documento.

## III - Projeto de Investigação

### 1. Contextualização Teórica

#### 1.1. Sistema Imunitário

O sistema imunológico tem como objetivo combater agressões que comprometam a homeostasia do organismo. É constituído pelos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e linfóides secundários (baço e nódulos linfáticos), assim como por células e moléculas, sendo dividido em imunidade inata e adquirida (2).

A imunidade inata caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente do estímulo, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Os mecanismos da imunidade inata englobam barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. As células que participam neste tipo de imunidade são: fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos), células *natural killer* (NK), mastócitos, basófilos e eosinófilos (2).

Os **neutrófilos** desempenham um papel importante nas fases iniciais das reações inflamatórias. Estas células são as primeiras a migrar dos vasos sanguíneos para os tecidos afetados, atraídos por quimiocinas, como a interleucina (IL)-8, e são ativados por estímulos, como metabolitos bacterianos, proteínas do complemento, imunocomplexos, quimiocinas e citocinas, sofrem desgranulação com o objetivo de destruição rápida e inespecífica de agentes estranhos (2).

Os **monócitos** no tecido conjuntivo ou parênquima dos órgãos dão origem aos **macrófagos** e às células dendríticas mielóides. Além do seu papel na imunidade inata, através da fagocitose de agentes patogénicos ou restos celulares, na inflamação os macrófagos atuam como células apresentadoras de antigénio, potenciando a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas coestimuladoras e libertando citocinas pró-inflamatórias (2).

As **células NK** são uma importante linha de defesa inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais. Além disso, estas células têm a função de recrutar neutrófilos e macrófagos, ativar células dendríticas e linfócitos T e B.

Os **eosinófilos** são recrutados por moléculas de adesão e quimiocinas para locais de infeção parasitária e/ou de reação alérgica, combatendo a infeção por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, com participação do recetor FcεRI. Durante esse processo, aderem aos agentes patogénicos revestidos por anticorpos imunoglobulina (Ig) E (ou IgA) e libertam o conteúdo granular, uma vez ativados induzem inflamação (2).

A resposta adaptativa (imunidade adquirida) é efetuada através da ativação de células especializadas (linfócitos T, B e NKT), e de moléculas solúveis produzidas por estas células. Esta resposta caracteriza-se pela especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Embora as principais células envolvidas na resposta imunológica adquirida sejam os linfócitos,

as células apresentadoras de antígeno desempenham um papel fundamental na sua ativação, apresentando antígenos pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) aos linfócitos T(3).

Os **linfócitos B**, que participam em diferentes mecanismos imunológicos, são células apresentadoras de antígeno e simultaneamente responsáveis pela imunidade humoral que se caracteriza pela produção e libertação de anticorpos capazes de neutralizar, ou até mesmo destruir, os antígenos contra os quais foram gerados (3).

O processo de maturação dos **linfócitos T** envolve a expressão de um recetor de células T (TCR) funcional e dos co-recetores CD4 ou CD8, consoante nos referimos a linfócitos T *helper* (Th) ou citotóxicos (Tc), respetivamente. Os linfócitos T só reconhecem antígenos processados, apresentados por moléculas MHC na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. O TCR é expresso na membrana dos linfócitos T em associação com um complexo denominado CD3. O TCR é responsável pelo reconhecimento do complexo péptido-molécula de MHC e o CD3 pela sinalização celular subsequente. Os **linfócitos T CD4<sup>+</sup>** são responsáveis por recrutar outras células para eliminar agentes patogénicos e importantes na ativação dos linfócitos B, macrófagos ou mesmo linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os **linfócitos T CD8<sup>+</sup>** estão envolvidos principalmente nas respostas antivirais e possuem também atividade antitumoral (3).

A maioria das células que expressam TCR reconhecem o antígeno apenas quando este se encontra associado a moléculas MHC e expressam co-recetores CD4 ou CD8, contudo uma pequena população de linfócitos T expressa marcadores encontrados em células NK, as **células NKT**. Pouco se conhece sobre estas células, no entanto pensa-se que podem ter um papel importante na regulação da resposta imunológica. As células NKT expressam TCR com cadeias  $\alpha$  de especificidade limitada, reconhecendo lípidos ligados a moléculas não polimórficas, denominadas CD1 e semelhantes ao MHC I. Parecem surgir do mesmo precursor dos linfócitos T convencionais, sendo selecionadas positivamente após interações de alta avides com glicolípidos associados a moléculas CD1d expressas por células epiteliais ou medulares do tecido tímico. Estas células apresentam duas estratégias diferentes no reconhecimento de agentes patogénicos. A primeira, observada no reconhecimento de bactérias Gram-negativas pelos lipopolissacarídeos, através da sinalização de recetores *Toll-Like*. A segunda ocorre pelo reconhecimento específico de glicosilceramidas presentes na parede celular bacteriana, apresentadas por CD1d. Devido ao reconhecimento de glicolípidos conservados, tanto endógenos quanto exógenos, estas células estão envolvidas em respostas alérgicas, inflamatórias, tumorais e na autoimunidade, além de participarem na regulação da resposta imune (3).

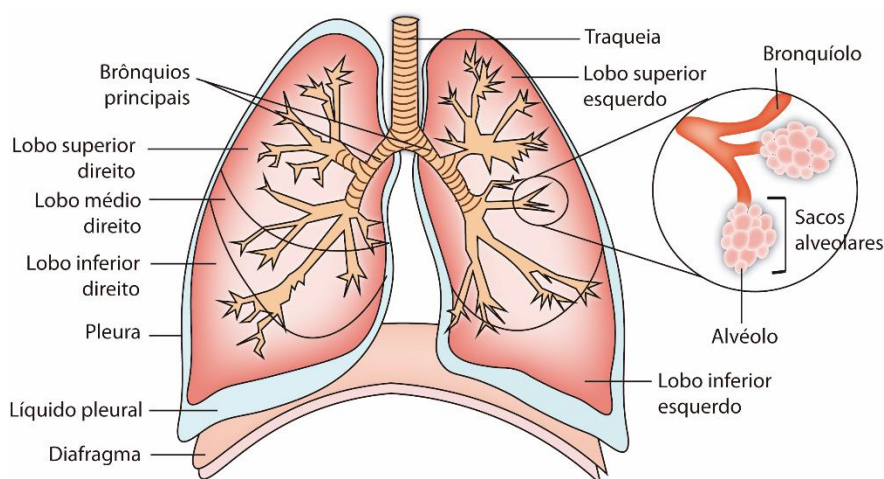
Um dos órgãos continuamente exposto a potenciais agentes patogénicos é o pulmão. Os constituintes do sistema imunitário inato e adaptativo têm a capacidade de migrar para este órgão de modo a protegê-lo da invasão, limitar a inflamação e ajudar na cicatrização de lesões. Existe uma grande variedade de células intersticiais essenciais para a defesa inata e adaptativa do pulmão, sendo os macrófagos intersticiais e alveolares os principais constituintes do sistema imunitário inato do pulmão (4). No tecido linfóide associado aos

brônquios existem linfócitos B, T e NK, que participam na resposta imunológica humoral e celular e ainda granulócitos, que aderem ao endotélio pulmonar (4).

## 1.2. Sistema Respiratório e Anatomia Pulmonar

O sistema respiratório é constituído pelos pulmões revestidos por uma membrana denominada pleura visceral, suportados pela parede torácica e pelo diafragma, compreendendo um conjunto de estruturas cuja função principal é a realização da hematose. A estrutura do aparelho respiratório comporta as fossas nasais, os seios perinasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os pulmões. As estruturas acessórias englobam a pleura, o diafragma, a parede torácica, os músculos torácicos e os músculos da parede ântero-lateral do abdómen (5).

Os pulmões (Figura 3) têm a forma de cone seccionado por um plano vertical, estando separados pelo mediastino. Com base na ramificação da árvore brônquica, convencionou-se subdividir o pulmão em unidades anatómicas que compreendem os lobos, segmentos e lóbulos (5).



**Figura 3. Representação esquemática do pulmão e estruturas associadas.** A traqueia subdivide-se em dois brônquios principais que, por sua vez, se subdividem em brônquios secundários. Estes brônquios secundários dão origem aos bronquíolos, estando os sacos alveolares localizados na sua zona terminal.

As doenças pulmonares afetam a função dos pulmões de diversas formas, com diferentes manifestações, sendo que o seu diagnóstico se baseia essencialmente em exames imagiológicos e funcionais. Além destes exames, o estudo celular e imunológico das doenças pulmonares possibilita novos conhecimentos ao nível da imunidade, inflamação e infeção, fibrinogénese e mecanismos de hipersensibilidade.

## 1.3. Broncoscopia e Lavagem Broncoalveolar

A técnica de broncoscopia é realizada quando as alterações tecidulares estão distribuídas no feixe broncovascular, se existir um distúrbio de enchimento alveolar ou quando há suspeita de doença infecciosa (6). A broncoscopia é um procedimento que permite a visualização direta da árvore traqueobrônquica, nomeadamente o nível subsegmental. O broncofibroscópio

flexível é utilizado na maioria dos casos, permitindo a visualização das vias aéreas e identificação de anomalias endobrônquicas, incluindo tumores e hemorragias (7). É uma técnica bem tolerada, com escassa mortalidade, sensível e facilmente repetível, tornando possível explorar uma ampla extensão de tecido pulmonar, segmento a segmento. Pode realizar-se em qualquer zona do pulmão no decorrer da mesma intervenção, apresentando assim várias vantagens em relação à biópsia pulmonar. As complicações no procedimento ocorrem em cerca de 5% dos casos, sendo que a principal é a hipoxemia durante e após a colheita da amostra. Em alguns pacientes observa-se uma resposta febril tardia de resolução espontânea, como resultado do líquido instilado (8). Através deste procedimento é possível recolher amostras para diagnóstico através de escovagem, biópsia ou lavagem (7).

A lavagem broncoalveolar (Figura 4) envolve a instilação de solução salina estéril através do canal do broncoscópio, sendo parte da solução depois aspirada de volta para o broncoscópio e processada para análise citológica e microbiológica (7). Esta lavagem permite a recolha de células e fluido do espaço aéreo distal (9).

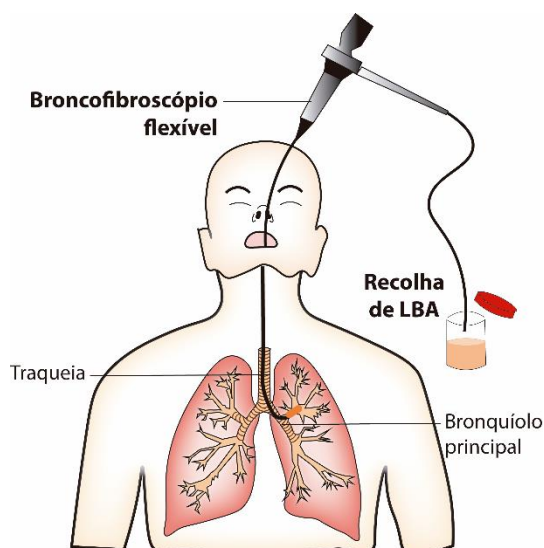


Figura 4. Representação do procedimento de broncofibroscopia flexível para recolha do lavado broncoalveolar.

Em 2007, a *American Thoracic Society* (ATS) publicou recomendações para padronização do procedimento de colheita de LBA por broncofibroscopia. De acordo com esta publicação, deve-se especificar o volume de líquido instilado, o número de seringas utilizado, a percentagem de líquido recolhido e o número de células epiteliais observadas, de modo a possibilitar uma interpretação correta dos resultados obtidos (6).

O principal valor do lavado broncoalveolar (LBA) refere-se à obtenção de amostra representativa das vias aéreas distais que possa conter informação acerca de processos infecciosos ou inflamatórios. Pode ser considerado como método complementar de diagnóstico para várias patologias pulmonares e como tratamento em casos de proteinose alveolar, remoção de aglomerados de muco, coágulos entre outros. A análise do LBA envolve várias abordagens sendo que cada uma nos sugere a presença/ausência de determinado tipo de patologia: aparência, padrão celular, imunofenotipagem, entre outras (9).

## **1.4. Critérios de Diagnóstico de Patologias Pulmonares: Utilidade do Lavado Broncoalveolar**

Recentemente, o LBA tem sido utilizado na investigação de doenças pulmonares, especialmente para o estudo da sua patogenia e como técnica complementar de diagnóstico. O LBA é útil para diagnóstico diferencial das doenças do interstício pulmonar (DIP) podendo, em alguns casos, sugerir o início de uma terapêutica, desde que a clínica, os exames imagiológicos e funcionais revelem alterações substanciais e compatíveis. Esta amostra também é estudada em casos de doenças obstrutivas e infecciosas.

### **1.4.1. Doenças do Interstício Pulmonar**

O interstício pulmonar é o espaço anatómico entre o endotélio e o epitélio alveolar da matriz extracelular, do território peribronquiolar e bainhas broncoalveolares, incluindo, também, os tecidos conjuntivos que circundam os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e as vias aéreas (5).

As DIP são um grupo de mais de 200 doenças caracterizadas por anomalias difusas do parênquima, sendo classificadas em dois grupos principais: doenças associadas a inflamação e fibrose e doenças predominantemente granulomatosas nas áreas intersticiais e vasculares. As DIP não são infecciosas, não estão associadas a neoplasias e são tipicamente crónicas. A sua maioria tem etiologia desconhecida, no entanto, algumas são conhecidas por serem consequência de exposição ambiental a poeiras e outras partículas (10). Os sintomas mais comuns são a dispneia e a tosse não produtiva. O início e a duração dos sintomas podem ajudar no diagnóstico diferencial: os sintomas crónicos (entre meses a anos) são característicos da fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumoconioses, os subagudos (de semanas a meses) podem ser observados em doentes com sarcoidose, bronquiolite obliterante com pneumonia em organização e hemorragia alveolar e os agudos são os menos frequentes, observados na pneumonia intersticial, eosinofílica e pneumonite por hipersensibilidade (PH). Outro dado relevante para o diagnóstico diferencial é a idade do paciente. A maioria dos doentes com FPI apresentam idade superior a 60 anos, enquanto que os doentes com sarcoidose apresentam idades compreendidas entre 20 e 40 anos (10). A exposição ocupacional pode ser um fator de risco para vários tipos de PH, assim como para as pneumoconioses. Outras DIP estão associadas a desordens do tecido conjuntivo e resultam de processos autoimunes sistémicos (síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide) ou são induzidas por fármacos (10). Tendo em conta a diversidade das DIP este trabalho incide no estudo das que possuem maior prevalência: sarcoidose, FPI e PH.

#### **1.4.1.1. Sarcoidose**

A sarcoidose é uma DIP multissistémica de causa desconhecida que se caracteriza pelo aparecimento de lesões granulomatosas, com apresentação de linfadenopatia hilar bilateral e infiltrado pulmonar. Tal como referido anteriormente, afeta principalmente jovens e

adultos de meia-idade, sendo a DIP mais frequente com uma incidência de 16.5/100000 nos homens e 19/100000 nas mulheres, com envolvimento pulmonar em cerca de 90% dos casos (11).

A sarcoidose apresenta-se como uma doença de elevada heterogeneidade, tanto em termos de apresentação como de severidade. A fisiopatologia da sarcoidose não é clara, no entanto sabe-se que é consequência da formação de granulomas em diversos órgãos (mais comum nos pulmões), principalmente em indivíduos com suscetibilidade genética para a doença. A presença de diversos fenótipos dificulta a definição de critérios de diagnóstico claros e concisos. O diagnóstico de sarcoidose é baseado numa combinação de aspetos clínicos, radiográficos e histológicos. Adicionalmente, a exclusão de outras etiologias através de diagnóstico diferencial pode ser essencial para efetuar o diagnóstico correto de sarcoidose (12).

Tendo em conta que a sarcoidose pode ser causada pela exposição a certos agentes tóxicos, deve verificar-se a história ocupacional e ambiental do paciente. Os sintomas extrapulmonares podem incluir erupção cutânea, inflamação nas articulações e alterações na visão. É possível encontrar algumas alterações sugestivas de sarcoidose nos exames analíticos: pancitopenia, elevação do nível de eletrólitos, de transaminases, da fosfatase alcalina, do cálcio (urinário e sérico), da creatinina, de imunoglobulinas ou da enzima conversora de angiotensina, assim como uma diminuição nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no LBA, com consequente aumento da razão CD4/CD8 e baixos níveis de neutrófilos e eosinófilos (12).

Um historial e exame físico com evidências sugestivas de sarcoidose não são suficientes para confirmar o seu diagnóstico, pelo que existe a necessidade fazer uma avaliação histopatológica, de forma a pesquisar a presença de granulomas epitelioides não caseosos. As zonas periféricas são preferenciais para realização de biópsia (linfonodos, pele ou glândula parótida), no entanto quando não há lesão periférica é realizada biópsia transbrônquica. Em último caso, quando nenhuma das anteriores é viável é necessário efetuar uma biópsia de pulmão aberto. O LBA pode evitar a necessidade de biópsia se existir correlação elevada dos resultados com a doença (12). Winterbauer et al., num estudo com aproximadamente 600 LBA, definiram que uma razão CD4/CD8 > 2.1 e níveis baixos de neutrófilos e eosinófilos (<1%) conferem uma especificidade de 94% (95% na biópsia), sensibilidade de 59% (81% na biópsia), valor preditivo positivo de 73% (95% na biópsia) e um valor preditivo negativo de 90% (95% na biópsia) para o diagnóstico diferencial de sarcoidose (13). Segundo as *guidelines* da ATS, uma razão CD4/CD8 ≥ 3.5 tem elevada especificidade para diagnóstico desta patologia (10).

Serrano et al., demonstraram que apesar da contagem de linfócitos no LBA ser superior no estadio radiográfico I (cinco estadios), não se verifica correlação entre a distribuição das populações celulares do LBA e os estadios radiográficos (14). Contudo, quando estudados os estadios de evolução imunológica da doença, verifica-se que estes se refletem no LBA. Assim, é possível identificar três estadios: inflamação difusa (alveolite), proliferação celular com formação de células epitelióides (granuloma) e hipertrofia destas células com formação de agregados celulares localizados (fibrose) (11). Imunologicamente, a sarcoidose caracteriza-se

pela resposta anómala a um antigénio, através do aumento da produção de interferão (IFN)- $\gamma$  (ativador de macrófagos) e de IL-2 (promove a diferenciação de linfócitos Th1). Inicialmente, ocorre um influxo e acumulação de linfócitos Th1 com produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como acumulação de macrófagos ativados, com elevada expressão de MHC II e de várias moléculas co-estimuladoras. Estas moléculas (IL-2, IL-15, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , IL-6) promovem a ativação, proliferação e recrutamento de mais linfócitos e monócitos, contribuindo para a formação do granuloma (11).

#### **1.4.1.2. Fibrose Pulmonar Idiopática**

Esta patologia caracteriza-se como uma DIP crónica e progressiva com génese alveolítica seguida de fibrose pulmonar, podendo ter como causa fatores genéticos, infeções virais e processos inflamatórios de natureza autoimune. A lesão tecidual e celular causada pelos agentes agressores desencadeia uma resposta inflamatória aguda numa fase inicial. Na ausência de doença esta resposta seria autolimitada, no entanto nos casos de FPI torna-se crónica, devido a razões desconhecidas que promovem alterações dos mecanismos de reparação pulmonar, levando a um prognóstico desfavorável. Os macrófagos alveolares e intersticiais desempenham um papel importante na patogenia da doença pela libertação de substâncias oxidantes que atacam o epitélio pulmonar e de fatores quimiotáticos que atraem neutrófilos e eosinófilos. O aumento do número de leucócitos polimorfonucleares e a fibrose generalizada no parênquima pulmonar também são dados relevantes (15).

O diagnóstico de FPI requer a exclusão de pneumonia intersticial não específica e outras doenças que apresentam o mesmo padrão histológico e imagiológico, tais como DIP induzidas por fármacos, PH e doenças autoimunes sistémicas (desordens do tecido conjuntivo). Um raio-X com padrão reticular predominantemente basal, com ou baixos volumes pulmonares é sugestivo de FPI, no entanto estes padrões também são característicos de outras doenças fibróticas (PH, desordens do tecido conjuntivo, ou sarcoidose em estadio IV) e não fibróticas (bronquiectasias, infeções, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC)). Assim, a tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) é essencial para verificar a existência de DIP e iniciar o diagnóstico diferencial. A biópsia pulmonar não pode ser efetuada em todos os pacientes e muitos deles recusam o procedimento. O LBA ou a biópsia transbrônquica apresentam-se como alternativas nestas situações. As descobertas histológicas do LBA na FPI são inespecíficas, sendo que o interesse do LBA reside na deteção de linfocitose (acima de 30% em não fumadores e 20% em fumadores) que, não sendo característica desta doença, direciona o estudo para outro tipo de doenças fibróticas, como a PH (16).

#### **1.4.1.3. Pneumonite por Hipersensibilidade**

A PH resulta da inalação repetida e sensibilização a agentes orgânicos ou químicos de baixo peso molecular promovendo uma reação imunológica. É uma doença granulomatosa de etiologia desconhecida, com envolvimento exclusivamente pulmonar. Tal como noutras DIP, o historial clínico é importante, interligando temporalmente os sintomas e certas atividades

que podem estar relacionadas com a exposição ao antigénio causador (17). Podem ser verificados sintomas resultantes de exposição aguda - reação de hipersensibilidade tipo III, com ativação do complemento e inflamação - ou sintomas resultantes de exposição repetida - reação de hipersensibilidade tipo IV, mediada por células e aparecimento de granulomas (4). Além disso, o exame físico, a TCAR e o doseamento de imunoglobulinas séricas específicas são necessários para confirmar a exposição ao antigénio ou como ferramentas de *screening*, assim como o LBA. O teste de inalação específica pode confirmar a etiologia da doença. A radiografia de tórax identifica padrões diferentes em PH aguda e crónica. Na PH crónica os padrões são semelhantes aos da FPI, porém em casos onde ocorre sobreposição dos padrões da PH aguda e crónica torna-se mais fácil diferenciá-la da FPI.

No que diz respeito à análise celular do LBA, mais de 80% dos pacientes com PH apresentam mais de 20% de linfócitos, todavia este valor pode apresentar-se normal ou até mesmo reduzido em certos pacientes com PH crónica. Apesar da redução da razão CD4/CD8 ser sugestiva de PH, este valor não é específico e é de baixa sensibilidade (18). A proporção entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> varia segundo o tempo decorrido entre a exposição ao antigénio e a realização do LBA (17, 18). Nas 24 horas seguintes à exposição pode-se observar uma neutrofilia, que desaparece rapidamente em poucos dias e a partir do primeiro mês a razão CD4/CD8 tende a normalizar (18). Pacientes assintomáticos mas expostos a certos antigénios causadores de hipersensibilidade (p.e. tratadores de pombos, agricultores) podem apresentar linfocitose com aumento da razão CD4/CD8 (10).

A seguinte Tabela resume as principais características das doenças anteriormente descritas.

**Tabela 1. Apresentação clínica, resultados de tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e diagnóstico diferencial da sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumonite por hipersensibilidade (PH). LBA: lavado broncoalveolar.**

Patologia	Apresentação clínica	TCAR	Padrão Celular no LBA	Utilidade do LBA
Sarcoidose	Linfoadenopatias hilares bilaterais com exame físico normal Uveíte ou eritema nodoso frequentemente presentes	Adenopatia mediastínica/hilar Nódulos ao longo do feixe broncovasculares no lobo médio/superior pulmonar	↑↑ Linfócitos ↑ Neutrófilos	Linfocitose com apresentação clínica e observações radiográficas sugestivas Razão CD4/CD8 ≥ 3,5
FPI	Início gradual de dispneia Paciente com idade	Padrão reticular periférico difuso Bronquiectasias de tração Aspeto de favo de mel	↑ Macrófagos alveolares ↑ Neutrófilos Eosinófilos podem estar ligeiramente aumentados	Sem linfocitose ou eosinofilia eminente
PH	Apresentação aguda ou crónica com historial de exposição	Aguda: padrão de vidro opaco bilateral e nódulos pouco definidos Crónica: Padrão fibrótico reticular, pode-se observar aspeto de favo de mel com bronquiectasias de tração e padrão de vidro opaco	↑↑ Linfócitos ↑ Neutrófilos Macrófagos alveolares com citoplasma espumoso Os mastócitos e plasmócitos podem estar aumentados	Linfocitose marcada com historial de exposição plausível Exclusão de infeção, hemorragia ou neoplasia

Além das DIP, neste trabalho foram estudados outros dois grupos de patologias pulmonares: doenças obstrutivas (DPOC, asma brônquica) e doenças infecciosas (pneumonia).

## **1.4.2. Doenças Obstrutivas**

### **1.4.2.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica**

Esta doença é caracterizada pela obstrução crônica do fluxo de ar, o que torna o teste de função pulmonar a ferramenta de diagnóstico com maior utilidade. A severidade da obstrução do fluxo de ar é determinada pelo nível de redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo:  $\geq 80\%$  corresponde ao estadio I, 50-80% estadio II, 30-50% estadio III e  $< 30\%$  estadio IV. O fumo do cigarro é o maior fator de risco ambiental para a DPOC. É uma doença progressiva, no entanto a taxa de perda de função pulmonar diminui notavelmente após cessação tabágica. Os sintomas somente ocorrem quando a DPOC está numa fase avançada, por isso a detecção precoce necessita de testes de espirometria. Esta doença inclui períodos de agravamento de sintomas respiratórios, definidos como exacerbações. O raio-X pode mostrar hiperinflação, enfisema e hipertensão pulmonar, sendo efetuado para excluir outras doenças durante a avaliação de rotina e pneumonia durante os períodos de exacerbação. A TCAR, apesar de mais sensível para detetar enfisema, é tipicamente reservada para avaliação de doença avançada quando as opções cirúrgicas como redução de volume pulmonar e transplantação são consideradas (19).

A inflamação das vias aéreas é frequente nesta patologia, observando-se um número aumentado de macrófagos e linfócitos. Apesar do LBA ter elevada importância no estudo da inflamação das vias aéreas, não é o procedimento de eleição para estudos de diagnóstico e seguimento nestes doentes, uma vez que a obstrução pode dificultar o procedimento e este por sua vez pode piorar a situação clínica (20). Além disso, é verificada uma recuperação de fluido instilado reduzida nos casos de DPOC, diminuindo com o aumento do grau de enfisema o que pode dificultar a análise de resultados (21).

### **1.4.2.2. Asma Brônquica**

A asma brônquica (AB) é uma síndrome caracterizada pela obstrução reversível do fluxo de ar, contrariamente ao que acontece na DPOC. O grau de obstrução varia espontaneamente ou através de tratamento específico. A inflamação crônica das vias aéreas causa hiperresponsividade a uma variedade de estímulos externos, levando à obstrução do fluxo de ar e consequentes sintomas respiratórios (p.e. dispneia). A maioria dos asmáticos são atópicos e frequentemente têm rinite alérgica e/ou eczema e a doença geralmente tem início na infância. Em indivíduos não atópicos a doença aparece geralmente já na fase adulta, sendo designados como asmáticos intrínsecos. Como mencionado anteriormente, os testes espirométricos dão indicação de obstrução das vias aéreas, porém os resultados de espirometria podem ser normais nestes pacientes quando não se encontram em períodos de crise ou quando os sintomas são adequadamente tratados. Os doseamentos de IgE total e específica e os testes cutâneos podem ajudar na identificação do alérgeno. O raio-X não

apresenta alterações, exceto em períodos de exacerbação aguda nos quais se pode identificar a ocorrência de pneumotórax (19).

Os estudos por broncoscopia nestes pacientes demonstram níveis de eosinófilos aumentados no LBA, podendo verificar-se um aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th2 com consequente produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (22). Estas citocinas aumentam a produção de imunoglobulina (Ig) E e desempenham um papel importante na manutenção da inflamação eosinofílica das vias aéreas (22).

### 1.4.3. Doenças infecciosas

#### 1.4.3.1 Pneumonia

A pneumonia caracteriza-se por uma infeção do parênquima pulmonar e é classificada como adquirida na comunidade ou associada a cuidados de saúde, esta última subdividida em pneumonia adquirida no hospital ou associada a ventilador. Os microrganismos alcançam o trato respiratório inferior via microaspiração pela orofaringe, inalação de gotículas contaminadas e propagação hematológica. A pneumonia clássica (*S. pneumoniae*) apresenta-se como um padrão lobar e tem quatro fases de evolução: edema, hepatização vermelha (eritrócitos e neutrófilos), hepatização cinzenta (neutrófilos e fibrina) e resolução (macrófagos). As bactérias tipicamente causadoras de pneumonia são: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa.*, microrganismos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella spp.* e vírus respiratórios (influenza, adenovírus, vírus sincicial respiratório). Entre 10 a 15% das pneumonias são polimicrobianas envolvem a combinação de organismos típicos e atípicos. Nesta patologia, além do diagnóstico é necessária a confirmação da etiologia. O diagnóstico deve ser efetuado através de culturas microbiológicas de sangue, urina, expectoração, secreções brônquicas, aspirados brônquicos e LBA.

Nas pneumonias adquiridas na comunidade, o LBA assume interesse diagnóstico perante quadros clínicos graves ou insucessos terapêuticos. Nas pneumonias associadas à ventilação, o LBA tem demonstrado pouco valor diagnóstico (19). O estudo do padrão celular do LBA é mais rápido do que o estudo microbiológico e pode ser indicativo do tipo de microrganismo causador de infeção: neutrofilia - bactéria; linfocitose - vírus; eosinofilia - parasita (10).

## 2. Objetivo do Projeto de Investigação

A lavagem broncoalveolar é uma técnica aceite como método de diagnóstico complementar em várias patologias do trato respiratório inferior. Ao longo dos últimos anos vários estudos confirmaram que o LBA reflete a celularidade existente no alvéolo e no interstício pulmonar, sendo o estudo deste produto biológico relevante para o diagnóstico diferencial, prognóstico e seguimento das DIP. No entanto, a utilidade deste líquido biológico ainda não está bem definida para muitas patologias pulmonares e existe alguma controvérsia no que diz respeito ao seu valor de diagnóstico nas DIP e noutras patologias pulmonares. Assim, o estudo

retrospectivo dos resultados da análise dos LBA em contexto hospitalar assume um papel de extrema importância. O CHUCB conta com uma experiência de aproximadamente 13 anos no estudo do LBA por citometria de fluxo (CMF).

Deste modo, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- Revisão bibliográfica da atual aplicação clínica do LBA e ponderação da necessidade de atualização dos protocolos vigentes no CHUCB;
- Estudo retrospectivo da análise dos LBA efetuados no CHUCB no período de 2006 a 2018 e comparação dos resultados obtidos com os descritos na literatura;
- Reanálise dos resultados de CMF dos LBA processados entre 2016 a 2018, de modo a identificar novas populações celulares e estudo da sua relevância clínica;

Esta atualização torna-se imprescindível para melhorar a abordagem analítica deste tipo de líquido biológico, tornando-a mais completa e útil para o clínico nas decisões de diagnóstico.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Receção e Manuseamento de Amostra**

O SPC recebe amostras de LBA de doentes provenientes do CHUCB, Hospital Amato Lusitano (Castelo Branco) e Hospital Sousa Martins (Guarda). A maioria dos LBA chegam ao SPC separados por 3 a 4 frações e são distribuídos pelos respetivos laboratórios, a segunda fração segue para estudos microbiológicos e a terceira fração é utilizada para estudos de análise morfológica e CMF, sendo o volume mínimo aceitável para análise celular entre 10 a 20 mL. A amostra deve ser processada de imediato aquando da sua chegada ao laboratório, caso contrário deve ser refrigerada (4° C), nunca podendo ultrapassar 4 horas entre a colheita e a análise.

#### **3.2. Processamento de Amostra**

##### **3.2.1. Análise Morfológica**

Para um tubo seco são pipetados 2ml de LBA para contagem celular automática no analisador hematológico DxH 800 (Beckman Coulter) em modo de amostra pleural. A partir desta alíquota é preparada uma lâmina por citocentrifugação a 500 rpm durante 5 minutos (Cytopro™ 7320, Wescor). Após secagem da lâmina, esta é corada pela coloração de May-Grunwald/Giemsa na citocentrífuga (Aerospray® Hematology Pro Series 2, Wescor) e visualizada ao microscópio ótico composto. A contagem de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos é efetuada e apresentada como percentagem e caso se observem outras estruturas celulares de relevo são igualmente descritas (Figura 5). Tendo em conta que os macrófagos são a população mais representativa do LBA, é mandatória a sua presença de modo a validar a qualidade da amostra.

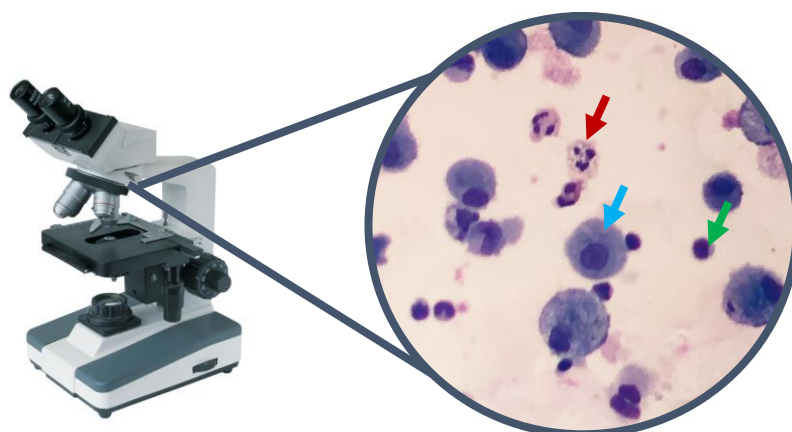


Figura 5. Imagem de microscopia ótica do lavado broncoalveolar (ampliação 1000x). Presença de linfócitos (→), macrófagos (→) e neutrófilos (→).

### 3.2.2. Identificação das Populações Celulares por Imunofluorescência

Para um tubo falcon são pipetados 12 mL de amostra de LBA e esta é centrifugada a 1600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é descartado até aproximadamente 3 mL e o *pellet* celular ressuscitado. Para a identificação das populações celulares em estudo são utilizados os seguintes anticorpos monoclonais multitest: CD3-isotiocianato de fluoresceína (FITC, clone SK7), CD8-ficoeritrina (PE, clone SK1), CD45-proteína peridinina-clorofila (PerCP, clone 2D1), CD4-aloficocianina (APC; clone SK3), CD16+56-PE (clone B73.1 e clone NCAM16.2, respetivamente), CD45-FITC (clone 2D1), CD19-APC (clone SJ25C1), CD14-PE (clone MΦP9) e Anti-HLA-DR-PerCP (clone L243). Todos os anticorpos monoclonais são da BD Biosciences.

A suspensão celular é dividida por 4 tubos secos (500 µL/cada) para os quais foram previamente pipetados 10 µL dos anticorpos monoclonais, segundo o esquematizado na Tabela 2. A incubação decorre à temperatura ambiente durante 15 minutos, no escuro.

Tabela 2. Painel de anticorpos utilizados na marcação das células.

Tubo	Anticorpos monoclonais				Amostra
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC	
1	-	-	-	-	500 µL
2	Anti-CD3	Anti-CD8	Anti-CD45	Anti-CD4	500 µL
3	Anti-CD3	Anti-CD16+56	Anti-CD45	Anti-CD19	500 µL
4	Anti-CD45	Anti-CD14	Anti-HLA-DR	-	500 µL

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: proteína peridinina-clorofila; APC: aloficocianina.

Após incubação são adicionados 2 mL de tampão fosfato-salino isotónico (PBS, BD Biosciences) e procede-se à centrifugação a 1600 rpm durante 10 minutos, após a qual o sobrenadante é desprezado e o *pellet* ressuscitado em 500 µL de PBS. No caso de a amostra ser hemática, após incubação deve-se adicionar solução de lise (10 minutos, no escuro) antes de seguir com o protocolo.

### 3.2.3. Análise por Citometria de Fluxo

A aquisição das amostras foi efetuada no citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson), equipado com o *software* BD CellQuest™ (BD Biosciences). Através da expressão de CD45 e das propriedades celulares intrínsecas, tamanho (FSC) e complexidade (SSC) identificaram-se os linfócitos CD45<sup>++</sup>FSC<sup>baixo</sup>SSC<sup>baixo</sup>. Pela positividade do CD3 são identificados os linfócitos T e dentro desta população os linfócitos TCD4 e TCD8, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, respetivamente. Ainda dentro da população linfocitária, os linfócitos B são identificados pela expressão de CD19, as células NK pela marcação CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> e as NKT pela marcação CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (23). A combinação da expressão de CD14 *versus* HLA-DR permite a identificação dos macrófagos CD14<sup>+++</sup>HLA-DR<sup>+++</sup> e os granulócitos CD14<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> (Figura 6). Os resultados foram apresentados em percentagem e a razão CD4/CD8 calculada a partir da proporção entre a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. As populações celulares foram identificadas utilizando o *software* de análise Infinicyt 1.8 (cytognos).

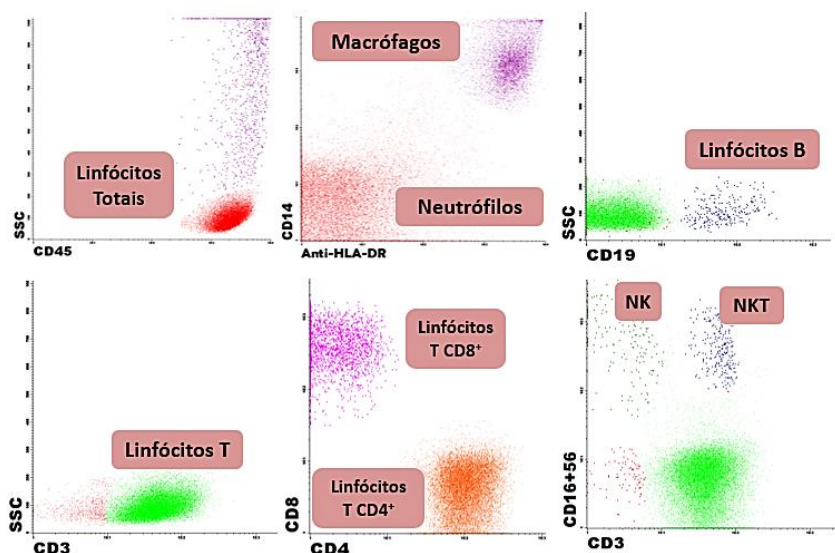


Figura 6. Estratégia utilizada para análise dos dados obtidos por citometria de fluxo. Identificação de subpopulações linfocitárias, macrófagos e granulócitos (maioria neutrófilos). Análise efetuada através do *software* Infinicyt 1.8 (cytognos).

Os resultados de CMF dos LBA realizados entre 2016 e 2018 no SPC do CHUCB foram reanalisados. Além das subpopulações linfocitárias rotineiramente estudadas (linfócitos B e NK), foi estudada a subpopulação de linfócitos NKT.

### 3.3. Recolha de Dados

Os dados referentes às análises dos LBA por CMF e morfologia celular, o número do processo clínico e do pedido, idade, sexo, hospital e suspeita clínica foram retirados a partir do *software* Modulab e posteriormente organizados por data (2006 a 2018). O diagnóstico final e os hábitos tabágicos de cada paciente foram consultados pela Dr.<sup>a</sup> Patrícia Amantegui (patologista clínico) através do SClínico Hospitalar, utilizando o número do processo clínico.

Todos os dados foram tratados anonimamente e sob acordo de confidencialidade, com aprovação pela comissão de ética do CHUCB (estudo nº 85/2018).

### **3.4. População em Estudo**

Foram estudados 732 LBA, 369 (50.4%) do sexo masculino e 363 (49.6%) do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 13 e os 100 anos e idade média de 60 anos. Quanto aos hábitos tabágicos, 340 dos pacientes em estudo são não fumadores (46.4%), 82 fumadores (11.2%) e 76 ex-fumadores (10.4%), não tendo sido possível obter informação acerca dos hábitos tabágicos de 234 pacientes (32%). Dos 732 pacientes, 501 realizaram a(s) colheita(s) no CHUCB (68.4%), 211 na Unidade Local de Saúde da Guarda (28.8%) e 20 na Unidade Local de Saúde de Castelo Branco (2.7%).

A Tabela 3 demonstra a distribuição dos LBA analisados por diagnóstico final (ordem decrescente de número de amostras) e, dentro destes grupos, por hábitos tabágicos.

Alguns pacientes a quem foi efetuada colheita de LBA não apresentaram qualquer patologia pulmonar (n=22), sendo este grupo denominado a partir de agora por indivíduos saudáveis (informação recolhida a partir do processo clínico). Não se conseguiu obter o diagnóstico final de 222 pacientes ou por não ser possível aceder ao processo clínico (n=217) ou por não existir informação suficiente no mesmo (n=5). A pneumonia apresenta-se como uma doença infecciosa e, por esse motivo, este grupo (n=37) foi subdividido pelo tipo de microrganismo causador da infeção. Desta forma, 15 casos dizem respeito a infeção bacteriana, 5 a infeção vírica e 2 a infeção fúngica, sendo que não foi possível obter esta informação em 15 dos casos ou por no pedido estudado só constar análise por CMF (sem microbiologia) ou por não ter sido detetado nenhum microrganismo no LBA.

**Tabela 3. Distribuição populacional por diagnóstico final e hábitos tabágicos.**

	Total	Hábitos Tabágicos			SI
		Não Fumador	Fumador	Ex-Fumador	
Sarcoidose	72	58	4	2	8
Fibrose Pulmonar Idiopática	67	54	6	7	0
Asma Brônquica	46	36	8	2	0
Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica	40	8	14	18	0
Pneumonia	37	21	9	6	1
Pneumonite por Hipersensibilidade	27	20	4	3	0
Saudáveis	22	19	1	2	0
Nódulo Pulmonar	17	12	3	2	0
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono	16	8	4	4	0
Bronquiolite Obliterante com Pneumonia em Organização	16	13	2	1	0
Silicose	15	7	3	5	0
Pneumonia Intersticial	12	8	0	3	1
Tuberculose	12	9	2	1	0
Pneumonia Eosinofílica	7	3	1	2	1
Bronquiectasias	7	2	1	3	1
Doença do Interstício Pulmonar Indiferenciada	6	5	0	1	0
Vírus da Imunodeficiência Humana	3	2	1	0	0
Tosse convulsa	2	1	0	1	0
<hr/>					
Doenças autoimunes (41)					
Esclerodermia	17	14	3	0	0
Artrite Reumatóide	12	11	1	0	0
Síndrome de Sjögren	10	8	0	0	2
Lúpus Eritematoso Sistémico	2	2	0	0	0
<hr/>					
Neoplasia (36)					
Benigna	14	9	2	3	0
Adenocarcinoma	11	6	3	2	0
Linfoma	5	3	1	1	0
Primária	2	2	0	0	0
Secundária	4	3	0	1	0
<hr/>					
Condições Clínicas (40)					
Adenopatias	27	12	6	8	1
Outros	13	8	3	2	0
<hr/>					
SI	222	0	0	0	222
Total	763	364	82	80	237

SI: sem informação.

### 3.5. Critérios de Seleção das Amostras

Das patologias representadas na Tabela 3, somente os grupos com número de casos superior a 20 foram consideradas para este estudo, nomeadamente sarcoidose, FPI, PH, DPOC, AB e pneumonia. Os casos em que não se chegou a nenhum diagnóstico final, bem como casos onde

só se descreveram condições clínicas ou sintomas foram excluídos do estudo. Estas condições foram cumpridas por 311 LBA, número de LBA considerados nos resultados deste trabalho.

### 3.6. Definição de Valores de Referência

De modo a definir valores normais e patológicos para a distribuição das populações celulares do LBA, foram seguidas as *guidelines* publicadas em 2012 pela ATS (10). Os intervalos definidos foram: a) percentagem de linfócitos, sendo considerada baixa (0-10%), normal (10-15%), moderadamente elevada (15-30%) e elevada (> a 30%); b) razão CD4/CD8, dividida em baixa (< a 0.9), normal (0.9-2.5), moderadamente elevada (2.5-3.5) e elevada (> a 3.5); c) percentagem de macrófagos baixa (< a 85%) e normal ( $\geq$  a 85%); d) percentagem de neutrófilos normal ( $\leq$  a 3%) e elevada (> a 3%); e) percentagem de eosinófilos normal ( $\leq$  a 1%) e elevada (> a 1%).

### 3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com recurso ao *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 25 (IBM Statistics). As diferenças entre grupos testados foram consideradas significativamente estatísticas quando  $P < 0.05$  e foram obtidas através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados são representados como mediana (percentis 25-75).

## 4. Resultados

### 4.1. Casuística dos Lavados Broncoalveolares

Entre 2006 e 2018, no SPC do CHUCB foram estudados 763 LBA por CMF com respetiva análise morfológica. Destes 763 LBA, 31 são repetições respetivas a 20 pacientes: 13 pacientes com 2 análises, 5 pacientes com 3 análises, 1 paciente com 4 análises e 1 paciente com 6 análises. A Figura 7 representa o aumento acentuado do número de análises de LBA ao longo dos anos.

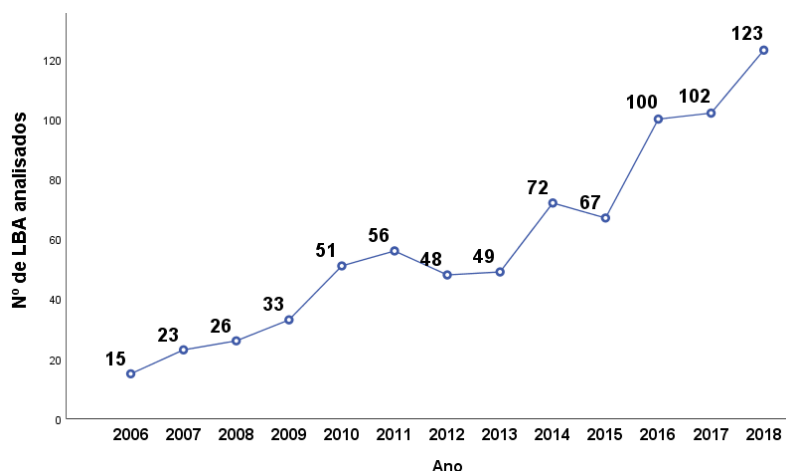


Figura 7. Número de lavados broncoalveolares analisados por citometria de fluxo ao longo dos anos no Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira.

Com base nos critérios de seleção já referidos ( $n > 20$ ), para o estudo em questão foram considerados 311 LBA distribuídos pelos seguintes grupos (Tabela 4): sarcoidose ( $n=72$ ), FPI ( $n=67$ ), AB ( $n=46$ ), DPOC ( $n=40$ ), pneumonia ( $n=37$ ), PH ( $n=27$ ) e sem patologia pulmonar ( $n=22$ ).

Tabela 4. Análise de frequências das patologias em estudo, discriminadas por sexo.

Diagnóstico	Sexo	Total
Sarcoidose ( $n=72$ )	Masculino	20
	Feminino	52
Fibrose Pulmonar Idiopática ( $n=67$ )	Masculino	33
	Feminino	34
Asma Brônquica ( $n=46$ )	Masculino	10
	Feminino	36
Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica ( $n=40$ )	Masculino	34
	Feminino	6
Pneumonia ( $n=37$ )	Masculino	22
	Feminino	15
Pneumonite por Hipersensibilidade ( $n=27$ )	Masculino	9
	Feminino	18
Saudáveis ( $n=22$ )	Masculino	7
	Feminino	15
Total ( $n=311$ )	Masculino	135
	Feminino	176

A idade da maioria dos pacientes em estudo encontra-se entre os 40 e os 80 anos, com idade mínima de 13 anos e máxima de 87 anos, com mediana de 61 anos e média de 50 anos (Figura 8).

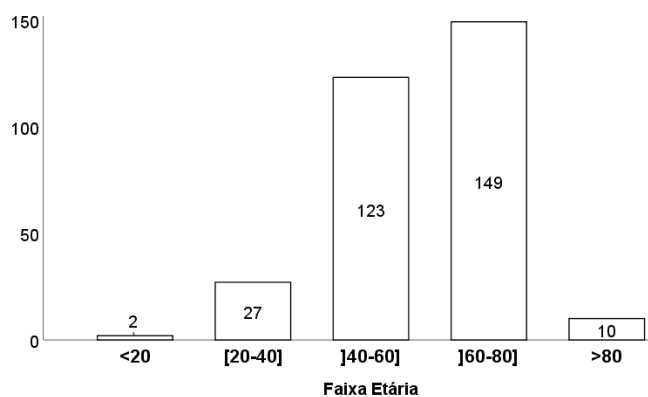


Figura 8. Distribuição da amostra em estudo por faixas etárias.

## 4.2. Padrão Celular dos Lavados Broncoalveolares

Com base na literatura, as células mais representativas do LBA são os linfócitos e macrófagos, no entanto também é descrita a presença de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (10, 24).

Em cada um dos sete grupos estudados determinou-se a percentagem mediana de linfócitos totais, linfócitos T, dentro destes a razão CD4/CD8, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (Tabela 5).

**Tabela 5. Padrão celular dos lavados broncoalveolares nas patologias pulmonares estudadas. Dados apresentados em mediana (percentis 25-75).**

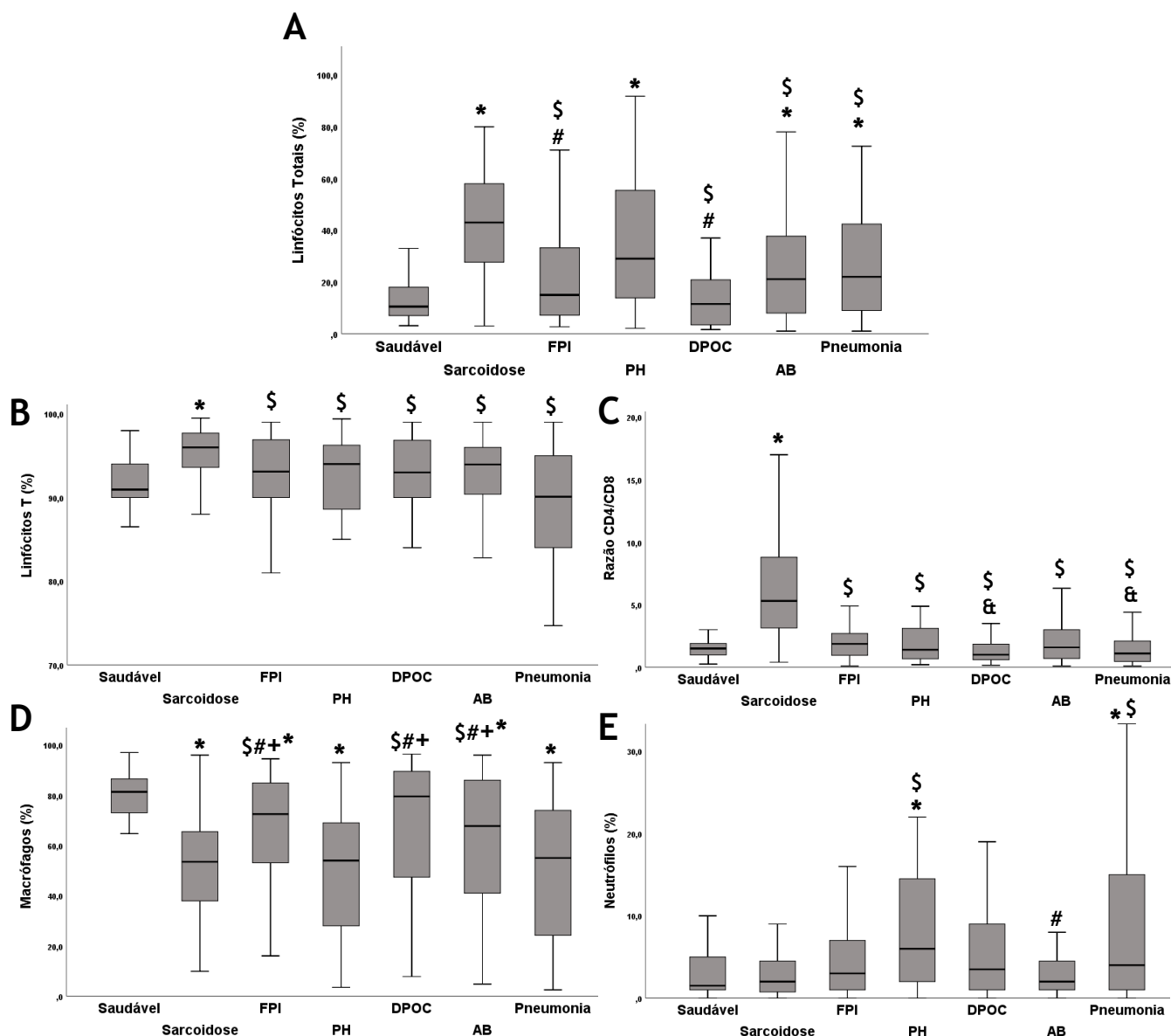
Diagnóstico	Linfócitos	Linfócitos T	Razão	Neutrófilos	Macrófagos	Eosinófilos
	Totais (%) #	(%) #	CD4/CD8 #	(%) *	(%) #	(%) *
Saudáveis	10.5 (7.0-18.0)	91.0 (89.5-94.3)	1.4 (0.7-3.2)	1.5 (1.0-5.0)	81.4 (72.8-86.6)	0.0 (0.0-1.0)
<b>DIP</b>						
Sarcoidose	43.0 (27.5-58.0)	96.0 (93.6-97.8)	5.3 (3.1-8.8)	2.0 (0.6-4.8)	53.5 (37.9-65.8)	0.0 (0.0-1.0)
FPI	15.0 (7.1-34.0)	93.1 (90.0-97.0)	1.9 (0.9-2.7)	3.0 (1.0-7.0)	74.0 (53.2-85.0)	0.5 (0.0-2.0)
PH	29.0 (1.3-57.8)	94.0 (87.5-96.5)	1.4 (0.7-3.2)	6.0 (2.0-15.0)	54.0 (26.5-70.0)	0.5 (0.0-3.0)
<b>Doenças Obstrutivas</b>						
DPOC	11.5 (3.4-21.9)	93.0 (90.0-96.9)	1.0 (0.6-1.9)	3.5 (1.0-9.0)	79.6 (44.3-89.8)	0.0 (0.0-1.0)
AB	21.1 (7.8-38.0)	94.0 (90.3-96.0)	1.6 (0.7-3.1)	2.0 (1.0-4.6)	67.8 (40.8-86.3)	0.0 (0.0-1.0)
<b>Doenças Infeciosas</b>						
Pneumonia	22.0 (9.0-45.7)	90.1 (83.7-95.0)	1.1 (0.4-2.1)	4.0 (1.0-15.0)	55.0 (27.8-74.5)	0.0 (0.0-1.0)

FPI: fibrose pulmonar idiopática; AB: asma brônquica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica; PH: pneumonite por hipersensibilidade; (\*) análise morfológica; (#) análise por citometria de fluxo.

Após recolha de dados de cada uma das populações analisadas, verificou-se que a percentagem de linfócitos totais se encontra significativamente aumentada na sarcoidose em relação a todos os grupos, à exceção da PH (Tabela 5, Figura 9A). De forma menos acentuada, também foi observado um aumento de linfócitos na PH, pneumonia e AB em relação a indivíduos saudáveis. Os linfócitos T são a população linfocitária que contribui para o aumento dos linfócitos totais na sarcoidose, uma vez que esta população se encontra significativamente aumentada quando comparada com os restantes grupos em estudo, com uma razão CD4/CD8 também aumentada (Tabela 5, Figura 9B e C).

Relativamente à percentagem de macrófagos, observa-se uma diminuição significativa em todas as condições patológicas comparativamente aos indivíduos saudáveis, à exceção da DPOC (Tabela 5, Figura 9D). A percentagem de macrófagos dos pacientes com sarcoidose foi a mais reduzida, seguida do grupo da PH e da pneumonia sendo estatisticamente significativa em relação à AB, FPI e DPOC.

Nos grupos da PH e da pneumonia foi verificado um aumento estatisticamente significativo na percentagem de neutrófilos em comparação aos indivíduos saudáveis e com sarcoidose. No caso da PH este aumento também foi significativo em relação à AB (Tabela 5, Figura 9E).



**Figura 9.** Percentagem de linfócitos totais (A), linfócitos T (B), razão CD4/CD8 (C), macrófagos (D) e neutrófilos (E) distribuídas pelas patologias em estudo. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil ( $P < 0.05$ ). Diferenças significativamente estatísticas vs. (\*) indivíduos saudáveis, (\$) sarcoidose, (#) pneumonite por hipersensibilidade (PH), (&) fibrose pulmonar idiopática (FPI) e (+) pneumonia. AB: asma brônquica, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica.

Uma vez que a literatura descreve a influência da idade (25, 26) e do sexo (27, 28) dos pacientes no LBA, estas variáveis foram avaliadas. No entanto, não foram observadas diferenças com significado estatístico (dados não apresentados). Outros estudos referem ainda alterações no padrão celular do LBA em função dos hábitos tabágicos (24), tendo sido encontradas alterações com significância estatística, descritas mais à frente. De seguida são apresentados os resultados da caracterização dos LBA pela sua distribuição celular por patologia e tendo em conta os hábitos tabágicos.

#### 4.2.1. Indivíduos Saudáveis

Nos indivíduos saudáveis, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 40.9% dos casos (n=9), normal em 31.8% (n=7), moderadamente elevada em 18.2% (n=4) e elevada em 9.1% (n=2). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 9.1% dos casos (n=2), normal em 77.3% (n=17), moderadamente elevada em 9.1% (n=2) e elevada em 4.5% (n=1). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 45.5% dos casos (n=10) e baixa em 54.5% (n=12). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 72.7% dos casos (n=16) e elevada em 27.3% (n=6). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 95.5% dos casos (n=21) e elevada em 4.5% (n=1, Figura 10).

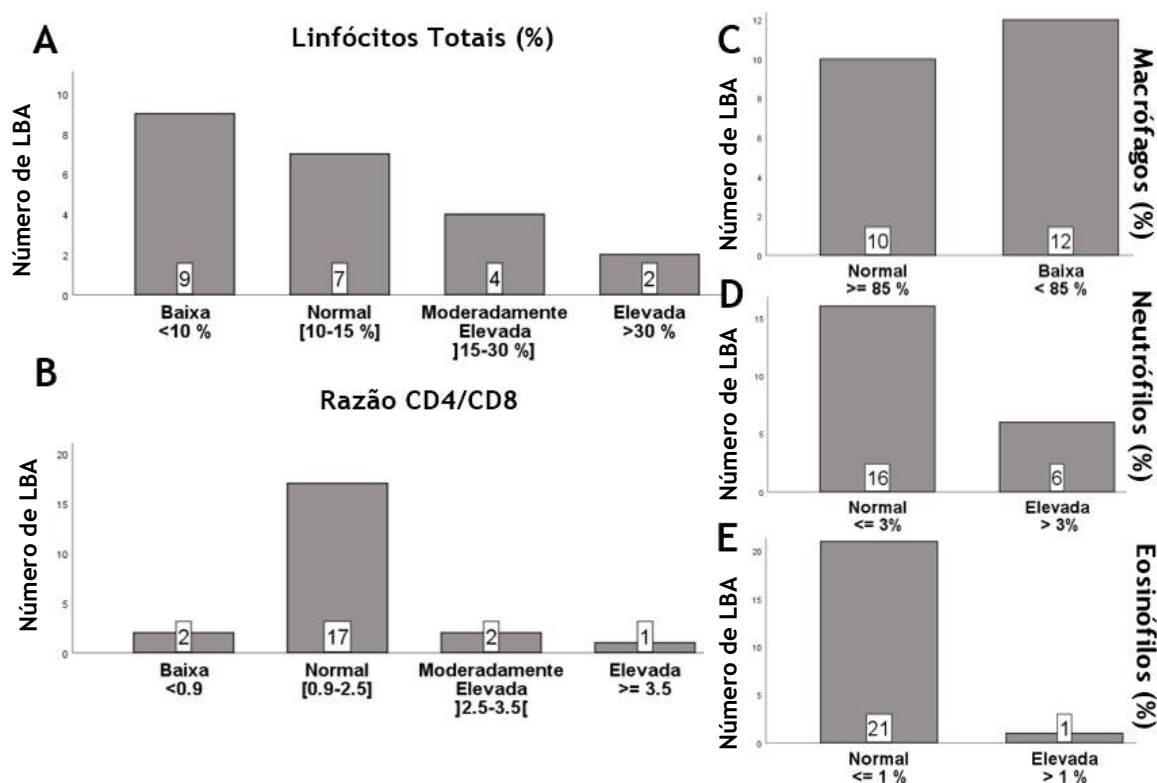


Figura 10. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B), macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) em indivíduos saudáveis. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

Heron M. et al (24), estudaram o padrão celular de indivíduos saudáveis adultos e não fumadores, mostrando os resultados da percentagem de cada uma das células anteriormente referidas em mediana (percentis 10-90). A Tabela 6 compara os resultados do estudo anteriormente referido com os do presente estudo (dados de fumadores e ex-fumadores excluídos da análise), verificando-se uma grande semelhança entre estes resultados.

Tabela 6. Comparação de resultados entre estudos. Dados apresentados em mediana (percentis 10-90).

	Estudo de Heron M. et al (n=34)	Presente Estudo (n=19)
Linfócitos	11.7 % (3.0-32.4)	11.0 % (4.0-33.0)
Razão CD4/CD8	1.5 (0.6-5.5)	1.5 (0.8-2.4)
Macrófagos	85.4 % (65.3-95.4)	81.7 % (64.7-94.8)
Neutrófilos	1.3 % (0.2-4.3)	1.5 % (0.5-10)
Eosinófilos	0.3 % (0.1-3.5)	0.0 % (0.0-1.0)

#### 4.2.2. Sarcoidose

Na sarcoidose, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 4.2% dos casos (n=3), normal em 4.2% (n=3), moderadamente elevada em 20.8% (n=15) e elevada em 70.8% (n=51). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 2.8% dos casos (n=2), normal em 15.3% (n=11), moderadamente elevada em 12.5% (n=9) e elevada em 69.4% (n=50). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 8.3% dos casos (n=6) e baixa em 91.7% (n=66). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 66.7% dos casos (n=48) e elevada em 33.3% (n=24). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 84.7% dos casos (n=61) e elevada em 15.3% (n=11, Figura 11).

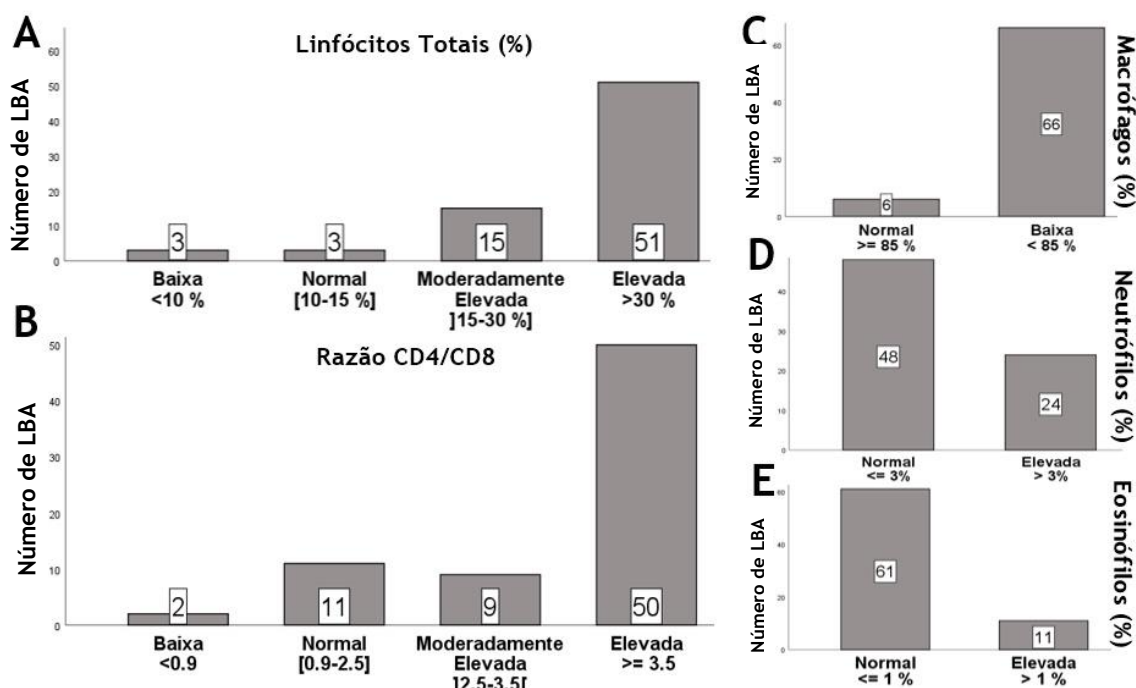


Figura 11. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B) macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na sarcoidose. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

Nesta patologia, a percentagem de linfócitos totais e a razão CD4/CD8 no grupo dos fumadores (n=4) apresentou-se ligeiramente diminuída em relação aos não fumadores (n=58), no entanto sem significância estatística, observando-se o inverso quanto à percentagem de macrófagos. Verificou-se ainda uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de neutrófilos nos fumadores [0.0% (0.0-0.0) vs. 2.0% (0.8-5.5) nos não fumadores, Figura

12]. Devido ao reduzido número de casos (n=2), não foi possível incluir o grupo de pacientes ex-fumadores.

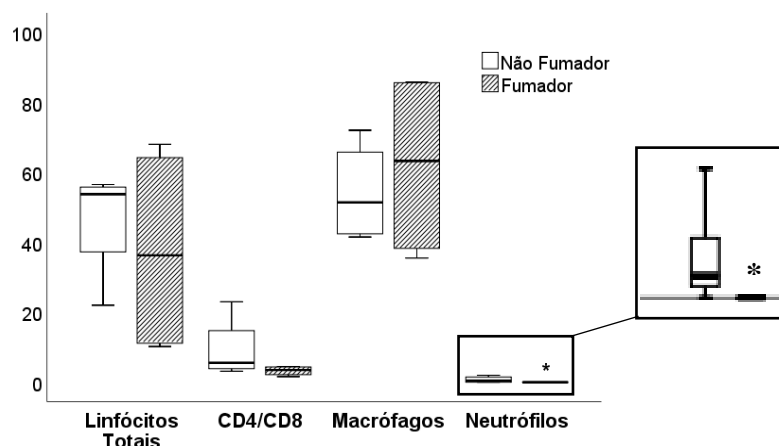


Figura 12. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores e fumadores com sarcoidose. Resultados da percentagem de neutrófilos demonstrados em modo ampliado. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significativas vs. (\*) não fumadores ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.3. Fibrose Pulmonar Idiopática

No caso da FPI, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 31.3% dos casos (n=21), normal em 20.9% (n=14), moderadamente elevada em 20.9% (n=14) e elevada em 26.9% (n=18). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 23.9% dos casos (n=16), normal em 47.8% (n=32), moderadamente elevada em 16.4% (n=11) e elevada em 11.9% (n=8). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 25.4% dos casos (n=17) e baixa em 74.6% (n=50). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 56.7% dos casos (n=38) e elevada em 43.3% (n=29). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 70.1% dos casos (n=47) e elevada em 29.9% (n=20, Figura 13).

Na Figura 14 é possível observar uma ligeira diminuição da percentagem de macrófagos nos ex-fumadores (n=7) e da razão CD4/CD8 nos fumadores (n=6). Constatou-se uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de neutrófilos dos LBA dos fumadores em comparação com os dos não fumadores [0.5 % (0.0-1.3) vs. 3.5 % (1.5-8.1), n=54]. No que diz respeito à percentagem de linfócitos totais, macrófagos e à razão CD4/CD8 não se verificaram diferenças significativas entre os grupos em estudo.

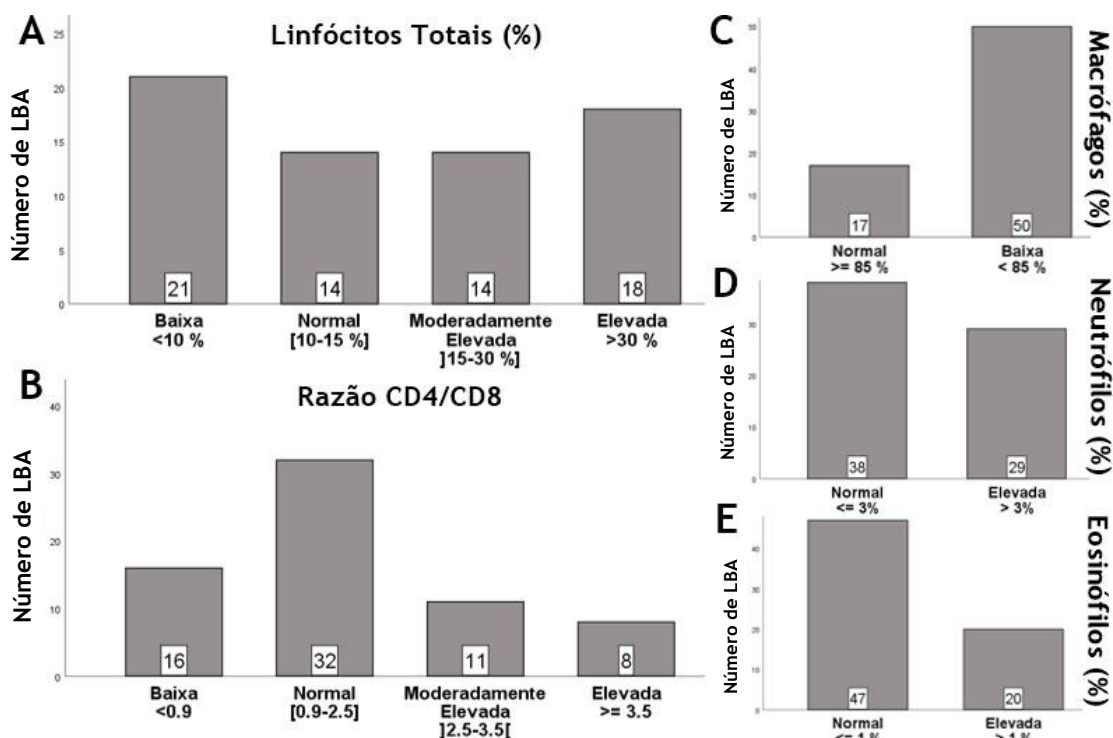


Figura 13. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B) macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na fibrose pulmonar idiopática. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

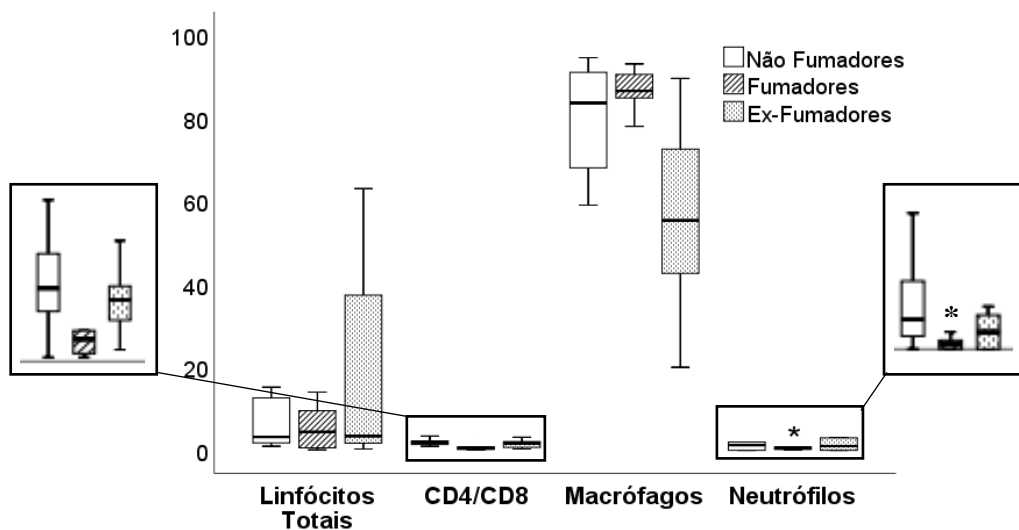


Figura 14. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com fibrose pulmonar idiopática. Resultados da razão CD4/CD8 e da percentagem de neutrófilos demonstrados em modo ampliado. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significantes vs. (\*) não fumadores ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.4. Pneumonite por Hipersensibilidade

Nesta patologia, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 14.8% dos casos ( $n=4$ ), normal em 18.5% ( $n=5$ ), moderadamente elevada em 18.5% ( $n=5$ ) e elevada em 48.1% ( $n=13$ ). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 40.7% dos casos ( $n=11$ ), normal em 29.6% ( $n=8$ ), moderadamente elevada em 7.4% ( $n=2$ ) e elevada em 22.2% ( $n=6$ ). A percentagem de

macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 7.4% dos casos (n=2) e baixa em 92.6% (n=25). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 37.0% dos casos (n=10) e elevada em 63.0% (n=17). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 70.4% dos casos (n=19) e elevada em 29.6% (n=8, Figura 55).

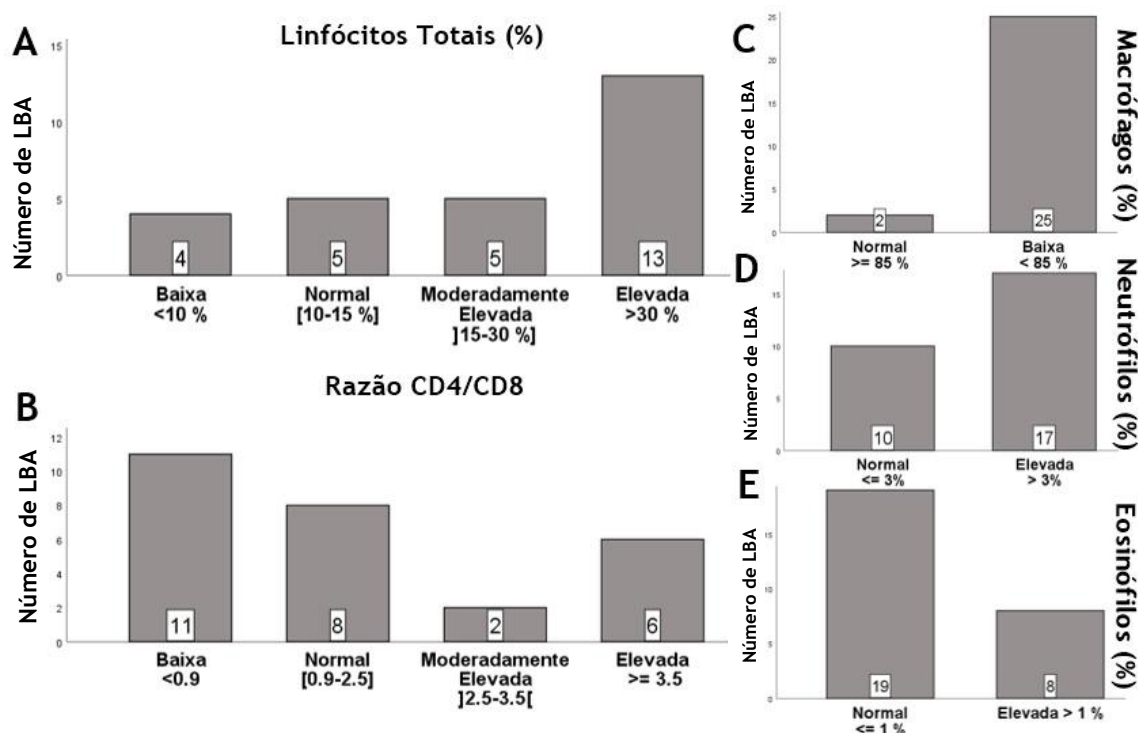


Figura 15. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B) macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na pneumonite por hipersensibilidade. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

Neste grupo, quando distribuído por hábitos tabágicos, apenas se observou uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de linfócitos totais nos LBA dos fumadores (n=4) em comparação com os dos não fumadores [33.5% (16.3-62.5) vs. 6.1% (2.6-13.0), n=20, Figura 16].

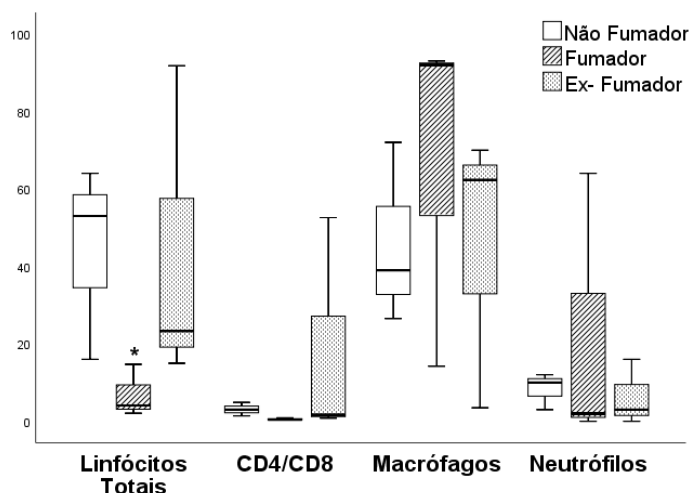


Figura 16. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores com pneumonite por hipersensibilidade. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significantes vs. (\*) não fumadores (P<0.05).

#### 4.2.5. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

Na DPOC, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 47.5% dos casos (n=19), normal em 17.5% (n=7), moderadamente elevada em 15.0% (n=6) e elevada em 20.0% (n=8). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 42.5% dos casos (n=17), normal em 40.0% (n=16), moderadamente elevada em 12.5% (n=5) e elevada em 5.0% (n=2). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 40.0% dos casos (n=16) e baixa em 60.0% (n=24). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 47.5% dos casos (n=19) e elevada em 52.5% (n=21). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 82.5% dos casos (n=33) e elevada em 17.5% (n=7, Figura 17).

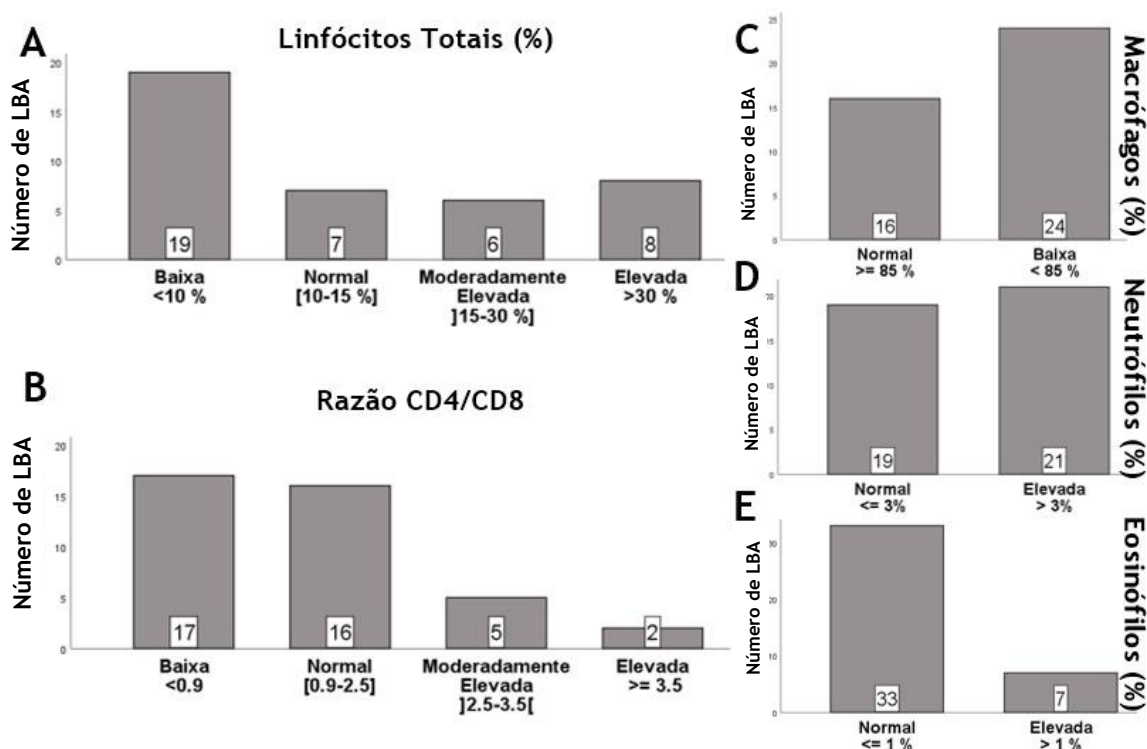


Figura 17. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B) macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na doença pulmonar obstrutiva crónica. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

Verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na percentagem de linfócitos totais dos LBA dos fumadores (n=14) em comparação com os dos não fumadores [14.5% (13.0-18.4) vs. 3.0% (2.5-8.9), n=8] e com os dos ex-fumadores [15.2% (5.8-40.8) vs. 3.0% (2.5-8.9), n=18]. No que diz respeito à percentagem de neutrófilos, de macrófagos e à razão CD4/CD8 não se identificaram diferenças significativas entre os grupos em estudo. No entanto, na Figura 18 é possível observar um aumento da percentagem de neutrófilos nos não fumadores em relação aos restantes grupos.

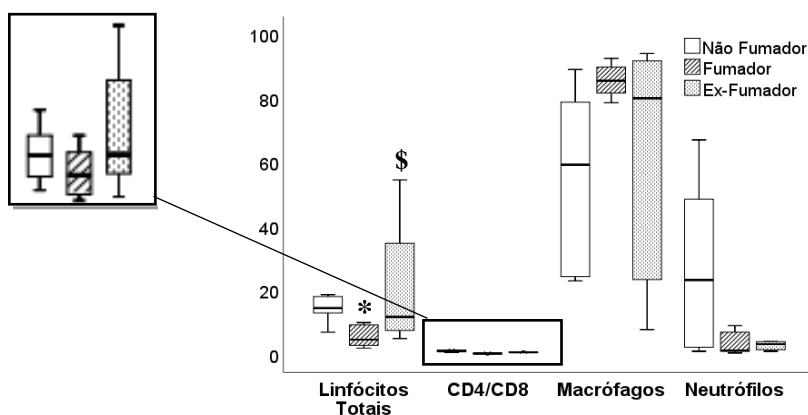


Figura 18. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores na doença pulmonar obstrutiva crónica. Resultados da razão CD4/CD8 demonstrados em modo ampliado. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significantes vs. (\*) não fumadores e (\$) fumadores ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.6. Asma Brônquica

No caso da AB, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em 30.4% dos casos ( $n=14$ ), normal em 10.9% ( $n=5$ ), moderadamente elevada em 19.6% ( $n=9$ ) e elevada em 39.1% ( $n=18$ ). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em 32.6% dos casos ( $n=15$ ), normal em 39.1% ( $n=18$ ), moderadamente elevada em 8.7% ( $n=4$ ) e elevada em 19.6% ( $n=9$ ). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em 30.4% dos casos ( $n=14$ ) e baixa em 69.6% ( $n=32$ ). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em 65.2% dos casos ( $n=30$ ) e elevada em 34.8% ( $n=16$ ). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em 73.9% dos casos ( $n=34$ ) e elevada em 26.1% ( $n=12$ , Figura 19).

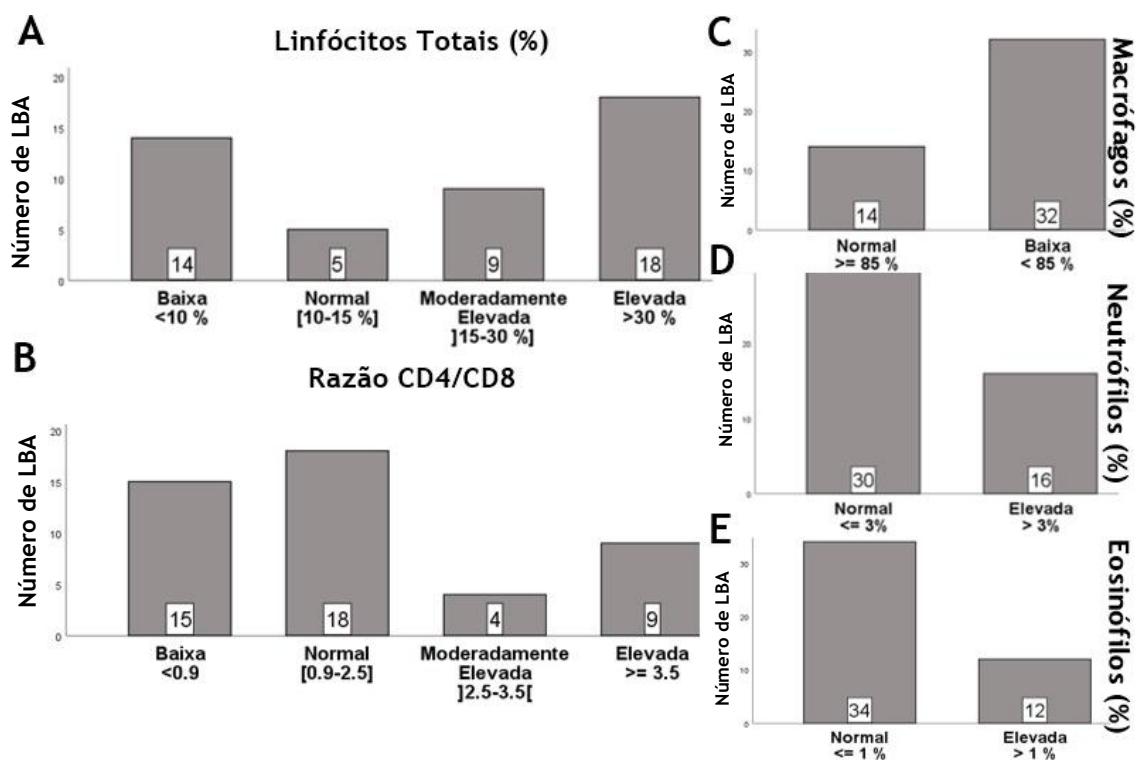


Figura 19. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B) macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na asma brônquica. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

Nos fumadores com AB a percentagem de linfócitos apresenta uma diminuição, apesar de esta não ser estatisticamente significativa. Não foi possível estudar o grupo de pacientes ex-fumadores (N=2), pelo que este grupo não é representado na Figura 20.

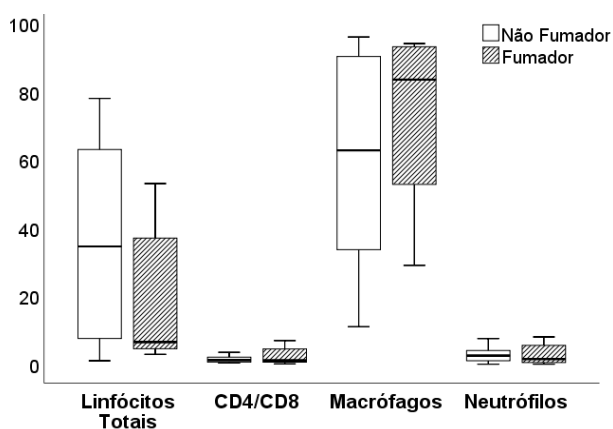


Figura 20. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores e fumadores na asma brônquica. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

#### 4.2.7. Pneumonia

Na pneumonia, a percentagem de linfócitos totais apresentou-se baixa em **29.7%** dos casos (n=11), normal em **8.1%** (n=3), moderadamente elevada em **21.6%** (n=8), elevada em **40.5%** (n=15). A razão CD4/CD8 apresentou-se baixa em **48.6%** dos casos (n=18), normal em **35.1%** (n=13), moderadamente elevada em **5.4%** (n=2) e elevada em **10.8%** (n=4). A percentagem de macrófagos demonstrou estar dentro da normalidade em **13.5%** dos casos (n=5) e baixa em **86.4%** (n=32). A percentagem de neutrófilos apresentou-se normal em **45.9%** dos casos (n=17) e elevada em **54.1%** (n=20). A percentagem de eosinófilos apresentou-se normal em **78.4%** dos casos (n=29) e elevada em **21.6%** (n=8, Figura 21).

Observou-se uma diminuição da percentagem de linfócitos totais no grupo dos fumadores (n=9) em relação aos restantes (Figura 22), com significância estatística quando comparada com a do grupo de ex-fumadores [**11.5%** (0.2-1.9) vs. **3.5%** (2.1-5.3), n=6]. A razão CD4/CD8 segue a mesma tendência, sendo que aqui o grupo de ex-fumadores apresenta um aumento significativo em relação aos restantes grupos [**3.5%** (2.1-5.3) vs. **0.8%** (0.4-1.7) nos não fumadores (n=21) e **0.5%** (0.2-1.9) nos fumadores]. No caso da percentagem de macrófagos, não se verificaram diferenças significativas entre os grupos em estudo. A percentagem de neutrófilos dos LBA dos fumadores demonstrou-se aumentada em comparação com os restantes grupos, sendo significativa em relação aos ex-fumadores [**0.5%** (0.0-1.3) vs. **3.5%** (1.5-8.1)].

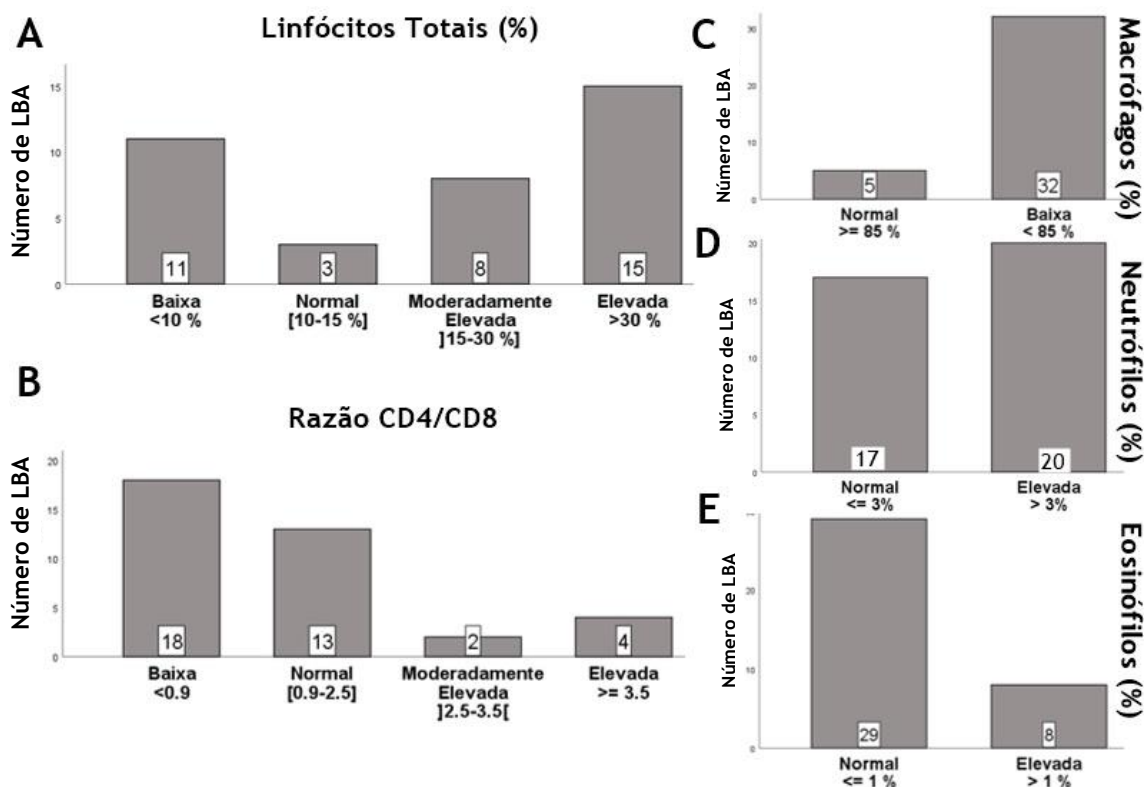


Figura 21. Distribuição da casuística por percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B), macrófagos (C), neutrófilos (D) e eosinófilos (E) na pneumonia. Cada variável está segmentada de acordo com os intervalos definidos pela *American Thoracic Society*. LBA: lavados broncoalveolares.

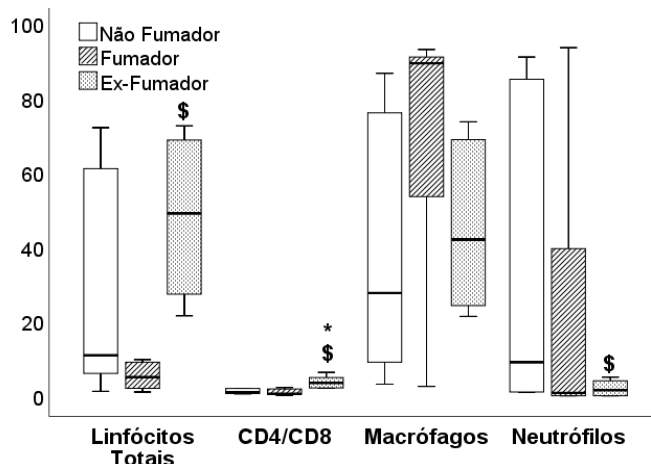


Figura 22. Percentagem de linfócitos totais, razão CD4/CD8, macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de não fumadores, fumadores e ex-fumadores na pneumonia. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significativas em relação a não fumadores (\*) e a fumadores (\$,  $P < 0.05$ ).

### 4.3. Hábitos Tabágicos no Diagnóstico Diferencial

Tal como descrito na literatura e demonstrado pelos presentes resultados, para além das alterações inerentes à fisiopatologia de cada doença, os hábitos tabágicos parecem influenciar a celularidade do parênquima pulmonar. Neste sentido, os dados contidos na Figura 9 quando separados em função dos hábitos tabágicos relevam alterações entre patologias, podendo condicionar a interpretação dos resultados da análise do LBA.

Os fumadores apresentam uma redução geral na população linfocitária, à exceção da sarcoidose que é o único grupo com linfócitos aumentados [36.3% (10.7-66.1) vs. FPI, PH e DPOC [9.7% (3.5-17.3), 9.6% (6.4-11.0), 6.1% (2.6-13.0) e 3.0% (2.5-8.9), respetivamente, Figura 23A2]. É importante referir que nos indivíduos não fumadores, apesar de os linfócitos estarem de igual forma aumentados na sarcoidose, este aumento também se verifica noutras patologias. A diferença mais evidente é observada no grupo da PH, sendo que nos não fumadores esta tem valores próximos da sarcoidose e nos fumadores apresenta valores bastante reduzidos.

Em pacientes não fumadores, a razão CD4/CD8 demonstrou-se elevada na sarcoidose [5.6 (3.1-8.9)] em relação a todos os outros grupos, sendo a diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo da DPOC e pneumonia [1.2 (0.7-1.9) e 0.8 (0.4-1.7), respetivamente,]. A razão CD4/CD8 mais reduzida foi verificada nos pacientes com pneumonia [0.8 (0.4-1.7)] sendo estatisticamente significativa em comparação com a FPI, AB e PH [1.9 (1.3-2.8), 1.7 (0.7-3.2) e 1.7 (0.7-4.5), respetivamente, Figura 23B1]. Nos pacientes fumadores verificou-se a mesma tendência [sarcoidose: 3.5 (1.9-4.4) vs. DPOC: 0.8 (0.3-1.3), FPI: 0.6 (0.2-1.8), PH: 0.6 (0.4-0.9) e pneumonia: 0.5 (0.2-1.9), Figura 23B2]. Da análise comparativa dos resultados de fumadores e não fumadores é perceptível que a razão CD4/CD8 se altera de modo semelhante entre patologias.

No que diz respeito à percentagem de macrófagos, em pacientes não fumadores esta demonstrou-se significativamente diminuída na PH [53.5% (31.4-67.1)] em relação aos indivíduos saudáveis e aos pacientes com FPI [81.7% (73.0-86.5) e 71.9% (52.2-82.6), respetivamente, Figura 23C1]. Nos fumadores não se verificaram diferenças significantes, no entanto o grupo da DPOC apresenta valores de macrófagos elevados relativamente aos verificados nos não fumadores (Figura 23C2).

Nos fumadores a percentagem de neutrófilos demonstrou-se significativamente diminuída na sarcoidose e na FPI [0.0% (0.0-0.0) e 0.5% (0.0-1.3), respetivamente] em relação aos pacientes com pneumonia, PH, DPOC e AB [33.0% (0.5-74.5), 11.5% (0.8-52.3), 3.3% (0.9-9.0) e 1.5% (0.3-6.8), respetivamente, Figura 23D1]. Curiosamente, comparando os pacientes não fumadores com os fumadores parece verificar-se uma inversão de resultados entre a DPOC e a PH. A primeira patologia com uma neutrofilia nos não fumadores e a segunda nos fumadores.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das percentagens celulares estudadas no que diz respeito aos ex-fumadores (dados não apresentados).

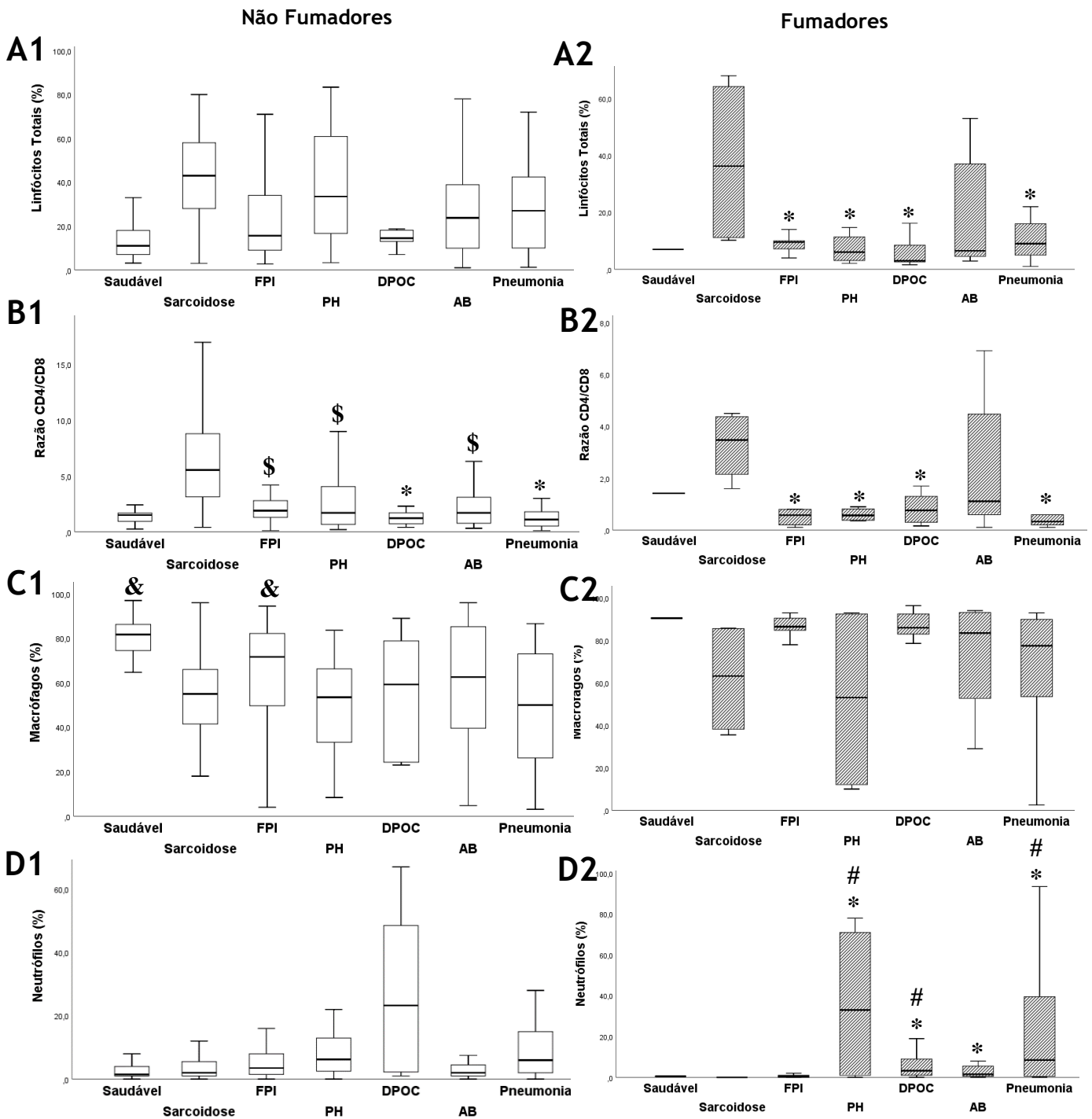


Figura 23. Percentagem de linfócitos totais (A), razão CD4/CD8 (B), macrófagos (C) e neutrófilos (D) em pacientes não fumadores (A1, B1, C1, D1) e fumadores (A2, B2, C2, D2) nas patologias em estudo. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil ( $P < 0.05$ ). Diferenças significativamente estatísticas vs. (\*) sarcoidose, (\$) pneumonia, (&) pneumonite por hipersensibilidade (PH) e (#) fibrose pulmonar idiopática (FPI). AB: asma brônquica, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica.

#### 4.4. Células B, NK e NKT no Lavado Broncoalveolar

Tradicionalmente, os linfócitos mais estudados e descritos nos LBA são os linfócitos T, contudo neste líquido biológico também são identificados linfócitos B, células NK e células NKT. As populações acima referidas foram avaliadas apenas nos LBA processados entre 2016 e 2018 (n=118, Tabela 7).

**Tabela 7. Populações linfocitárias dos LBA nas patologias pulmonares estudadas.** Dados apresentados em mediana (percentis 25-70).

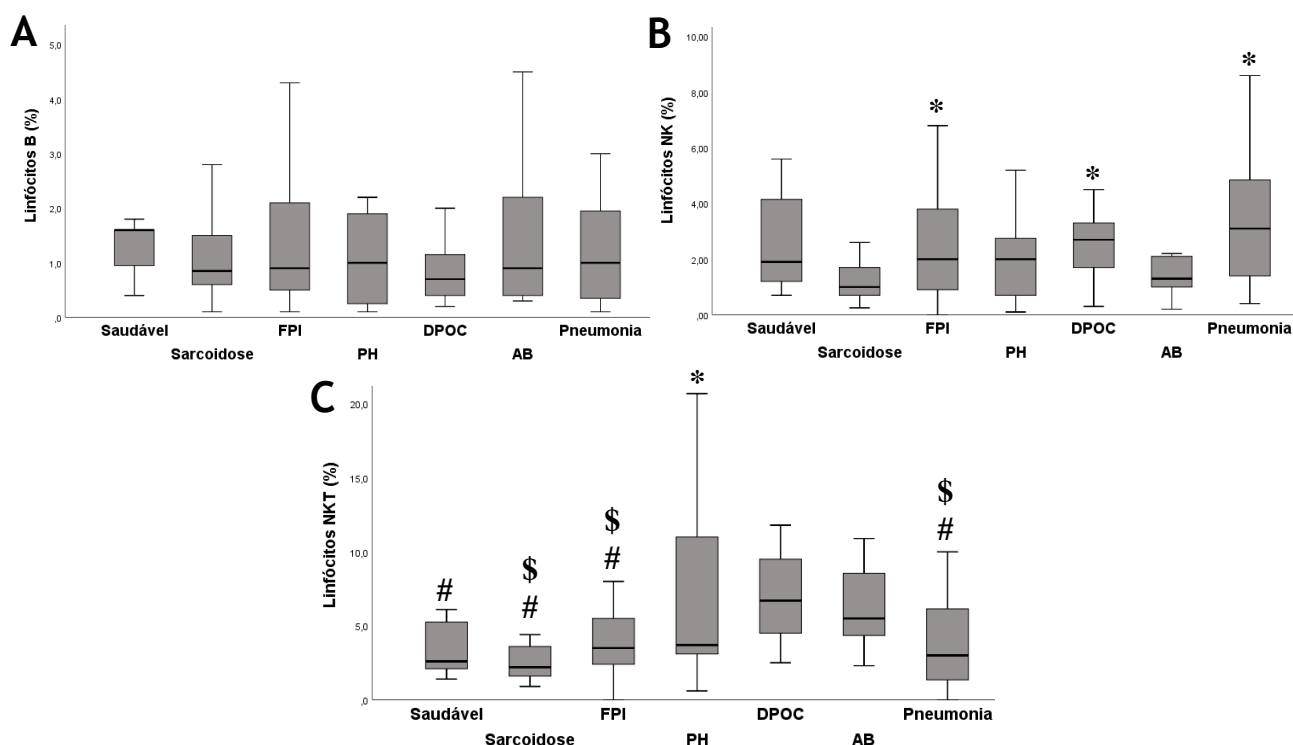
	Saudável (n=7)	Sarcoidose (n=22)	FPI (n=25)	PH (n=11)	DPOC (n=19)	AB (n=15)	Pneumonia (n=19)
Linfócitos	1.6	0.9	0.9	1.0	0.7	0.9	1.0
B (%)	(0.9-1.6)	(0.6-1.5)	(0.5-2.3)	(0.2-2.2)	(0.4-1.2)	(0.4-2.7)	(0.7-2.0)
Linfócitos	1.9	1.0	2.0	2.0	2.7	1.3	3.1
NK (%)	(0.8-4.5)	(0.7-1.8)	(0.8-4.5)	(0.4-2.8)	(1.7-3.5)	(1.0-2.2)	(1.0-4.9)
Linfócitos	2.6	2.2	3.5	3.7	6.7	5.5	3.0
NKT (%)	(1.9-6.1)	(1.6-3.6)	(2.4-5.7)	(3.1-12.0)	(4.3-9.6)	(3.7-8.7)	(1.2-6.9)

FPI: fibrose pulmonar idiopática; AB: asma brônquica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica; PH: pneumonite por hipersensibilidade.

No caso dos linfócitos B não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo (Tabela 7, Figura 24A).

Relativamente aos linfócitos NK, a percentagem mais baixa foi observada no grupo da sarcoidose, sendo esta diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo da FPI, DPOC e pneumonia (Tabela 7, Figura 24B).

A percentagem de linfócitos NKT apresentou-se significativamente elevada na DPOC e na AB em comparação com a FPI, pneumonia e sarcoidose. A DPOC também apresentou um aumento quando comparada com os indivíduos saudáveis e a PH quando comparada com a sarcoidose (Tabela 7, Figura 24C).



**Figura 24. Percentagem de linfócitos B (A), NK (B) e NKT (C) nas patologias em estudo. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil ( $P < 0.05$ ). Diferenças significativamente estatísticas vs. (\*) sarcoidose, (#) doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e (\$) asma brônquica (AB). FPI: fibrose pulmonar idiopática, PH: pneumonite por hipersensibilidade.**

## 5. Discussão

O aumento do número de pedidos de análise de LBA por citometria de fluxo ao longo dos anos (Figura 7) reflete a crescente valorização da referida técnica no que diz respeito ao diagnóstico diferencial de patologias pulmonares.

Os valores de referência utilizados durante toda a análise de resultados foram os definidos pela ATS para indivíduos adultos saudáveis e não fumadores (10). Dentro dos LBA estudados foi possível definir um grupo no qual os indivíduos não apresentavam qualquer patologia pulmonar, com idades compreendidas entre os 37 e os 82 anos e somente 1 paciente fumador e 2 ex-fumadores. Assim, tendo em conta que o grupo de indivíduos saudáveis é utilizado ao longo do estudo como um hipotético controlo, é pertinente verificar se os LBA deste grupo se enquadram nos valores de referência da ATS. Na maioria dos indivíduos considerados saudáveis, as populações estudadas encontram-se dentro do considerado normal pela ATS (Figura 10). Além disso, pela comparação com o estudo de Heron M. et al (24) é possível verificar um elevado grau de semelhança com o grupo de indivíduos saudáveis definido no presente estudo (Tabela 6).

Numa abordagem geral, quando a percentagem de cada população celular é comparada entre as patologias estudadas é perceptível um aumento de linfócitos na sarcoidose, na PH, pneumonia e AB (Figura 9A). Na sarcoidose, os linfócitos T  $CD4^+$  são a subpopulação linfocitária que mais contribui para este aumento, sendo representada pelo aumento da razão  $CD4/CD8$ . No caso da PH, pneumonia e AB o aumento de linfócitos não se deve ao aumento

dos linfócitos T (Figura 9B e 9C). A quantificação celular foi efetuada de modo relativo, justificando o facto de que quando os linfócitos estão aumentados, os macrófagos estão diminuídos e vice-versa, uma vez que estas células são as mais representativas (Figura 9A e Figura 9D).

Na pneumonia e na PH foi verificada uma percentagem de neutrófilos aumentada (Figura 9E). O aumento destas células é expectável em pacientes com pneumonia, devido à sua função biológica no combate a infeções (29, 30). A migração e ativação neutrofílica também se verifica em pacientes com desordens pulmonares fibróticas, sendo normalmente mais elevada em pacientes com maior agressividade e pior prognóstico, como é o caso da PH crónica (31). Apesar de neste estudo a fase da PH não ter sido avaliada, a idade dos pacientes sugere que a doença provavelmente tem alguns anos de evolução, o que nos leva a supor que a PH poderá estar numa fase crónica, justificando assim o aumento dos neutrófilos observado neste grupo. Por outro lado, a ativação continuada dos neutrófilos pode ser consequência, e não necessariamente a causa, do dano tecidual associado à doença (31).

Além da análise comparativa do perfil celular entre patologias, é importante caracterizar os LBA dentro de cada patologia.

Na sarcoidose, 66 dos 72 pacientes estudados demonstraram linfócitos acima de 15% no LBA, de forma concordante com o descrito na literatura (12-14). A razão CD4/CD8 estava aumentada na maioria dos pacientes, o que está descrito como tendo elevada especificidade para o diagnóstico desta patologia (12). No entanto, os valores de razão CD4/CD8 normais ou baixos verificados em alguns pacientes podem ter várias explicações, tais como: a baixa sensibilidade deste parâmetro (12), o estadio imunológico da doença e os hábitos tabágicos do paciente (32). A alveolite linfocitária é o primeiro estadio de evolução no envolvimento pulmonar, caracterizando-se pelo aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (32). Com a evolução da doença a razão CD4/CD8 tende a diminuir, verificando-se que indivíduos com menor razão CD4/CD8 desenvolvem lesões permanentes com maior frequência (estadio de fibrose) (32). Além disso, a alveolite é menos pronunciada em fumadores e por isso estes doentes apresentam uma razão CD4/CD8 mais reduzida (32).

A utilidade clínica da razão CD4/CD8 é questionada por alguns autores, baseando-se na observação de que esta razão pode ser variável. Kantrow et al. observaram que somente 42% dos 86 pacientes com sarcoidose comprovada por biópsia demonstraram razão CD4/CD8 > 4, e que 12% demonstravam uma razão com valores abaixo de 1 (33). Recentemente, têm sido investigados novos marcadores celulares na sarcoidose, nomeadamente a expressão da integrina  $\alpha E\beta 7$  (CD103) pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no LBA, verificando-se a ausência/diminuição da expressão desta molécula (34). Kolopp-Sarda et al. definiram que a razão CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> < 0.45 é um possível marcador de diagnóstico para a sarcoidose, mesmo em casos onde a razão CD4/CD8 apresenta valores inferiores a 3.5 (35).

Apesar dos neutrófilos e eosinófilos se apresentarem normais na sarcoidose (13), estas células podem estar elevadas em estadios avançados da doença (36), o que foi observado em 33.3% e em 15.3% dos indivíduos em estudo, respetivamente (Figura 11).

Na FPI seria de esperar que não se verificassem casos de linfocitose (16), contudo metade dos casos apresentaram linfócitos acima de 15% e dentro destes alguns dos pacientes apresentaram linfócitos acima de 30%, o que em contexto clínico direciona o estudo para outro tipo de doenças fibróticas, como a PH. Deste modo, é possível concluir que o padrão celular dos LBA estudados demonstra inespecificidade para o diagnóstico de FPI, tal como descrito noutros estudos (16). Na razão CD4/CD8 e na percentagem de neutrófilos e eosinófilos verificou-se uma distribuição heterogénea (Figura 13).

A maioria dos pacientes com PH apresentaram níveis elevados de linfócitos no LBA (> a 15%, Figura 15). Nesta patologia está descrito que mais de 80% dos pacientes apresentam linfócitos acima de 20%, no entanto este valor pode apresentar-se normal ou até mesmo reduzido numa fase crónica da doença (18). Além disso, foi possível verificar percentagens de linfócitos acentuadamente reduzidas nos fumadores em relação aos não fumadores (Figura 16). Dos 9 LBA com percentagem de linfócitos baixa ou normal, 5 são provenientes de indivíduos fumadores, sendo os hábitos tabágicos uma possível razão para a diminuição dos linfócitos. Dentro dos linfócitos T é expectável uma diminuição da razão CD4/CD8 (18), porém esta redução verificou-se em menos de metade dos casos. As alterações na proporção entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> podem depender do tempo decorrido entre a exposição ao antigénio e a realização do LBA (17, 18), o que reflete a variabilidade deste parâmetro (18). Os LBA onde a razão CD4/CD8 está aumentada, tal como já foi referido podem corresponder a pacientes assintomáticos mas expostos continuamente aos antigénios causadores de hipersensibilidade (p.e. tratadores de pombos, agricultores) (10).

Na DPOC foi observada uma diminuição acentuada na percentagem de linfócitos em pacientes fumadores em relação aos não fumadores, seguindo os ex-fumadores a mesma tendência. Em aproximadamente metade dos casos, verificou-se uma percentagem de linfócitos e uma razão CD4/CD8 baixas (Figura 17). Tendo em conta que a maioria dos indivíduos nesta patologia são fumadores (14/40) ou ex-fumadores (18/40), os resultados refletem que a distribuição celular do LBA sofre mais influência dos hábitos tabágicos do que da própria DPOC. Em consonância com os resultados suprarreferidos, um estudo demonstrou o aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em fumadores mais velhos que desenvolveram DPOC (37).

Ao contrário do que era esperado, na maioria dos casos de AB não se verificou o aumento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nem da percentagem de eosinófilos. Além disso, não se constataram diferenças em função dos hábitos tabágicos. Os pacientes deveriam ser subdivididos em asma alérgica e asma não alérgica, devido à diferente resposta imunológica associada e de forma a minimizar a heterogeneidade do grupo, fator que pode justificar a ausência de um padrão definido nestes resultados.

Ao contrário do observado nas outras patologias, na pneumonia as alterações mais notórias são o aumento de neutrófilos e de linfócitos em mais de metade dos casos (Figura 21), o que já foi explicado pela etiologia da doença. Nas amostras em estudo, 9 dos 15 casos de infeção bacteriana apresentaram neutrofilia no LBA e 4 dos 5 casos de infeção vírica apresentaram linfocitose (dados não apresentados).

Neste trabalho, além das alterações na celularidade do LBA associadas às patologias, também se estudaram outros fatores como a idade, sexo e hábitos tabágicos.

Segundo alguns estudos, a razão CD4/CD8 aumenta com a idade em indivíduos saudáveis, provavelmente devido à acumulação de células de memória na superfície das mucosas (26, 38). Nestes resultados não se verificaram alterações significativas no padrão celular do LBA em função da idade (dados não apresentados). Contudo, tendo em conta que a maioria dos indivíduos incluídos neste estudo se encontra acima dos 50 anos, seria interessante aumentar o grupo de indivíduos com menor idade para podermos estudar de que forma este fator influencia a distribuição celular no LBA.

Quanto à influência do sexo na distribuição das populações celulares do LBA, existem estudos que demonstram que níveis elevados de estrogénio aumentam a inflamação das vias aéreas mediada pelas células Th2 e níveis elevados de testosterona diminuem (27, 39). No sexo feminino a resposta mediada por IL-17 e IFN- $\gamma$  está aumentada, tal como a função das células dendríticas e macrófagos (27, 40). No presente trabalho não foi possível definir se existe ou não influência do sexo dos pacientes no padrão celular devido ao facto da grande maioria dos LBA serem provenientes de indivíduos doentes, sobrepondo-se assim as alterações causadas pela doença às relacionadas com o sexo do paciente. No caso da sarcoidose e da AB verificou-se uma maior incidência no sexo feminino, estando esta associação amplamente descrita na literatura (39-42). A maioria dos pacientes com DPOC são homens, o que não se justifica pela fisiopatologia da doença mas sim pela prevalência do tabagismo em indivíduos do sexo masculino, apresentando-se este como o maior fator de risco para a DPOC (19, 23).

O padrão celular do LBA nas diferentes patologias depende dos hábitos tabágicos (Figura 23). A percentagem de macrófagos é mais elevada nos fumadores, verificando-se inversamente uma diminuição nos linfócitos. Estes resultados são corroborados por vários estudos (24, 43, 44). Os macrófagos têm um papel fulcral na defesa contra partículas estranhas, tais como as que existem no fumo do cigarro, assim é expectável o aumento desta população celular nos pulmões dos fumadores (24).

As alterações nos linfócitos T e a redução da atividade das células NK em fumadores suportam a ideia de que o fumo do cigarro tem um efeito supressor na resposta imunológica pulmonar (43). Esta imunossupressão pode levar a uma maior predisposição dos fumadores para o desenvolvimento de doenças infecciosas e neoplásicas. Por outro lado, a diminuição dos linfócitos T provocada pelo tabaco pode ser responsável pelo facto da menor prevalência de sarcoidose e PH nos fumadores (43). Estes resultados reforçam a ideia de que os hábitos tabágicos do paciente devem ser considerados para a interpretação dos resultados do LBA. A impossibilidade de estudar o grupo de ex-fumadores prende-se com o facto de que se trata de um grupo extremamente heterogéneo, do qual não se sabe o tempo que decorreu desde a cessação tabágica, durante quantos anos foram fumadores e qual o grau de dependência.

Uma vez que as células B, NK e NKT têm sido pouco estudadas nestas situações patológicas, é importante verificar se existem alterações nestas populações linfocitárias e se estas alterações podem estar associadas a alguma patologia. Com base nos resultados verifica-se

um aumento de células NK na FPI, DPOC e pneumonia (Figura 24). Nos primeiros dias de infecção (p.e. pneumonia), ou nas primeiras horas de inflamação (p.e. FPI), as células NK são recrutadas em elevado número do sangue periférico para o pulmão, tornando-se ativas e secretando citocinas, particularmente IFN- $\gamma$  (45). Apesar da principal via efetora na patogénese da FPI ser a das citocinas do tipo Th2, recentemente foi descrita uma depleção das células NK do sangue periférico, o que pode sugerir o seu recrutamento pelo pulmão e possível envolvimento nesta patologia (45).

O aumento das células NK na pneumonia pode estar relacionado com a sua capacidade citotóxica e de produção de citocinas pró-inflamatórias, tendo um papel importante no combate a infeções tanto bacterianas como virais (46). Em pacientes com DPOC, o recrutamento excessivo destas células pode estar relacionado com infeções bacterianas e virais recorrentes nestes pacientes (47). Outro estudo demonstrou que o valor de linfócitos NK em pacientes com DPOC não normaliza, mesmo após deixarem de fumar, indicando que esta população celular pode desempenhar um papel importante na progressão contínua da doença, independentemente do tabagismo (23).

A percentagem de linfócitos NKT demonstrou-se aumentada nas doenças obstrutivas, AB e DPOC, em relação às restantes (Figura 24). Alguns estudos demonstram uma percentagem aumentada de células T CD8<sup>+</sup>, NK e NKT na expetoração de pacientes com DPOC sendo que, dentro destas, as NK e NKT são significativamente mais citotóxicas nestes pacientes, verificando-se números reduzidos destas células no sangue periférico (48). No entanto, não é plenamente compreendido se o aumento destas células se deve à patologia ou aos hábitos tabágicos do paciente, fator relevante nesta patologia. Um outro estudo propõe que o aumento das células NK no LBA está associado com a DPOC, enquanto que o aumento de células NKT está relacionado com os hábitos tabágicos (23). A AB trata-se de uma doença com múltiplos fenótipos inflamatórios e clínicos, apresentando como característica comum a hiperresponsividade das vias aéreas a estímulos não específicos. Tem sido proposto que esta resposta necessita da ação das células NKT (49). Apesar das células NKT e Th2 possuírem semelhanças fenotípicas (p.e. expressão de CD4 e produção de citocinas Th2), estas apresentam atividade complementar, efetuando a produção de citocinas Th2 sob diferentes estímulos e possuindo diferente sensibilidade a corticosteróides e responsividade a diferentes antigénios (49). Desta forma, propõe-se que os linfócitos Th2 e NKT atuam na indução asmática, mas que diferentes formas de AB resultam de um diferente balanço entre estas células pelo facto de estas possuírem diferentes funções (49).

Resumindo, estes resultados realçam o papel importante do LBA no estudo de pacientes com sarcoidose, demonstrando um padrão característico com linfócitos e razão CD4/CD8 elevados. No caso da PH o LBA também pode ser útil quando associado a um bom historial clínico, visto que é necessário ter em conta fatores como a frequência de exposição e o tempo decorrido desde a exposição ao antigénio. Das doenças do interstício pulmonar estudadas, a única onde se verificou um padrão indefinido foi a FPI. Quanto às doenças obstrutivas, a possível utilidade clínica do LBA evidenciou-se pelo aumento das células NKT, sendo que na DPOC

ainda se verificou o aumento das células NK. Ainda dentro deste grupo e especificamente na DPOC, os hábitos tabágicos são um fator com grande influência nos resultados. Apesar das alterações devidas ao tabaco serem mais notórias nesta patologia, este fator afeta os resultados da análise do LBA de um modo geral, devendo os mesmos ser interpretados tendo em conta esta influência. Por último, apesar da etiologia da pneumonia ser completamente diferente das outras doenças estudadas, o LBA demonstrou-se útil pela identificação de neutrofilia, linfocitose e aumento de células NK.

## 6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este estudo vem reforçar a hipótese de que as alterações dos perfis celulares encontrados no LBA refletem transformações patológicas no parênquima pulmonar. Após revisão bibliográfica foi possível verificar que os resultados obtidos estão de acordo com o descrito. Ainda assim, o número de indivíduos em cada grupo deve ser aumentado de modo a reforçar os resultados e retirar conclusões mais sólidas.

O crescente interesse na descoberta de novos marcadores celulares com maior precisão para diagnóstico de certas patologias pulmonares motivou a investigação neste sentido, tanto pela pesquisa bibliográfica como pela identificação de novas populações celulares por CMF e estudo da sua relevância clínica. Os resultados desta análise sugerem que pode ser importante acrescentar o estudo da expressão de CD103 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> do LBA, sendo que uma razão CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> reduzida é um bom marcador de diagnóstico para a sarcoidose, mesmo em casos onde a razão CD4/CD8 apresenta valores inferiores a 3.5 (34, 35). Além disso, no presente estudo identificaram-se células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e, comparando os resultados com a literatura, é perceptível que estas células podem ter importância na patogénese das doenças obstrutivas estudadas (23, 48, 49). Deste modo, apesar do seu significado clínico ainda não estar bem definido, é importante incluir esta população celular nos resultados da análise do LBA de forma a possibilitar a identificação de padrões indicativos e úteis no diagnóstico diferencial.

Ao longo da elaboração do presente estudo as várias fases e abordagens foram apresentadas sob a forma de póster em eventos científicos. O póster intitulado: “*Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Diseases: Smokers versus Non-Smokers*” foi apresentado na 11<sup>a</sup> Reunião Científica da Sociedade Portuguesa de Medicina Laboratorial (5-6 de abril, Coimbra), tendo o *abstract* sido aceite para publicação na revista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, com fator de impacto de 3.556; o póster intitulado: “*Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of Pulmonary Diseases: Flow Cytometry Findings. A 2-Year Study*” foi apresentado no XVI Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria (9-11 de maio, Salamanca). Estes e outros trabalhos realizados podem ser consultados em anexo.

Com a realização deste estudo tornou-se perceptível que existe um conjunto de fatores que podem influenciar os resultados da análise do LBA e a sua interpretação, no entanto alguns deles atualmente não são tidos em conta. O volume e a quantidade de amostras que chegam

ao laboratório devem ser registados, referindo a literatura que quanto maior o volume recuperado melhor é a tradução dos fenómenos existentes no pulmão (10, 50). Além deste motivo, o registo do volume recuperado pode ser útil para normalizar o valor da contagem de células nucleadas, tornando-o mais indicativo. Amostras com um reduzido número de células, um número excessivo de células epiteliais (> 5%) e artefactos que dificultem a identificação celular não são adequadas para análise (10, 51).

Futuramente devem ser reunidos esforços de forma a desenvolver novas diretrizes para o estabelecimento de critérios de representatividade e de exclusão de amostras. Outro aspeto crucial é a uniformização dos valores de referência para LBA de indivíduos saudáveis não fumadores e fumadores.

Concluindo, a atualização dos protocolos vigentes no CHUCB torna-se imprescindível para melhorar a abordagem analítica deste tipo de líquido biológico tendo em vista a identificação de novas populações celulares com interesse clínico e o registo de alguns pormenores que podem influenciar os resultados e a sua interpretação. Esta atualização tornará a análise do LBA mais completa e útil para o clínico nas decisões de diagnóstico.

## IV - Trabalho Desenvolvido no Estágio

### 1. Procedimento Analítico

O laboratório garante rigor nas 3 fases que antecedem o envio do resultado analítico ao clínico: fase pré-analítica, analítica e pós-analítica (Figura 25). A colheita dos produtos biológicos é efetuada de acordo com o estipulado pelo manual de colheitas e todo o processo analítico rege-se pelo manual de segurança biológica da instituição, que tem como objetivo diminuir os riscos associados à exposição a materiais biológicos e agentes infecciosos. Este manual contempla as noções básicas de segurança num laboratório: práticas de risco e sua evicção, procedimentos caso ocorra algum incidente e regras de tratamento de resíduos perigosos.

Toda a documentação e regulamentação é disponibilizada para qualquer pessoa autorizada na intranet do hospital (<http://intranet.chcbeira.pt>). Este sistema intranet engloba todos os computadores e equipamentos de processamento de amostras. Estes equipamentos estão ligados ao *software* Modulab, permitindo o acesso a todas as informações acerca das amostras.

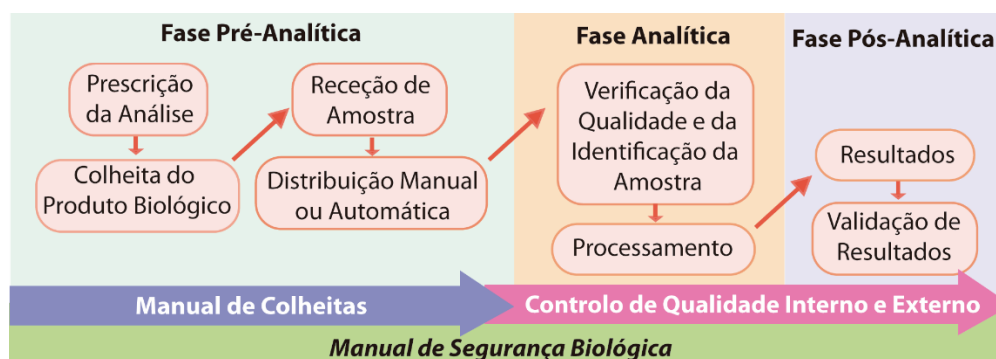


Figura 25. Fases do processo analítico.

## 2. Controlo de Qualidade

O SPC participa em Programas de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ) e de Controlo de Qualidade Interno (CQI).

Os programas de AEQ consistem na receção de uma amostra externa para ser processada como uma amostra de rotina. Dependendo do programa de AEQ, estes podem ter diferentes periodicidades. Os resultados são enviados para a entidade responsável até ao prazo estabelecido pela mesma. Esta entidade recebe resultados de vários laboratórios, analisa os resultados interlaboratoriais, compara-os e regista possíveis erros. A partir desta análise é efetuado um relatório, posteriormente reencaminhado para todos os laboratórios participantes. A AEQ serve para o laboratório avaliar a sua metodologia e tomar medidas corretivas se necessário. Existem vários programas de avaliação de qualidade externa com os quais o SPC tem protocolo: *United Kingdom National External Quality Assessment* - NEQAS, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - INSA, Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratório - SEQC<sup>ML</sup>, Sociedade Espanhola de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica entre outros.

O CQI permite a verificação da qualidade dos procedimentos internos, técnicas, material utilizado e equipamentos e consiste na realização de um controlo diário fornecido pela casa comercial, processado antes de qualquer amostra dos utentes. Na maioria das provas é efetuado mais do que um nível de controlo, o mesmo controlo poderá ser utilizado para uma ou mais provas. Cada controlo é acompanhado da média e desvio padrão aceitável e, caso o valor do controlo esteja fora do desvio padrão, são aplicadas as diferentes regras do CQI, descritas no procedimento operativo interno. As **regras de rejeição** aplicadas são a de 1 resultado fora dos 3 desvios padrão e de 2 resultados consecutivos fora dos 2 desvios padrão. As **regras de advertência** aplicadas são a de 1 resultado fora dos 2 desvios padrão e de 4 resultados consecutivos entre 1 e 2 desvios padrão. A violação de uma regra de rejeição obriga uma ação corretiva, tal como proceder à calibração do equipamento, verificar a estabilidade do controlo ou do reagente. A violação de uma regra de advertência sugere uma ação preventiva, tal como ponderar calibração, intervenção técnica ou mudança de reagente. Nalguns parâmetros, por exemplo iões séricos, após obter um mínimo de 20 resultados para

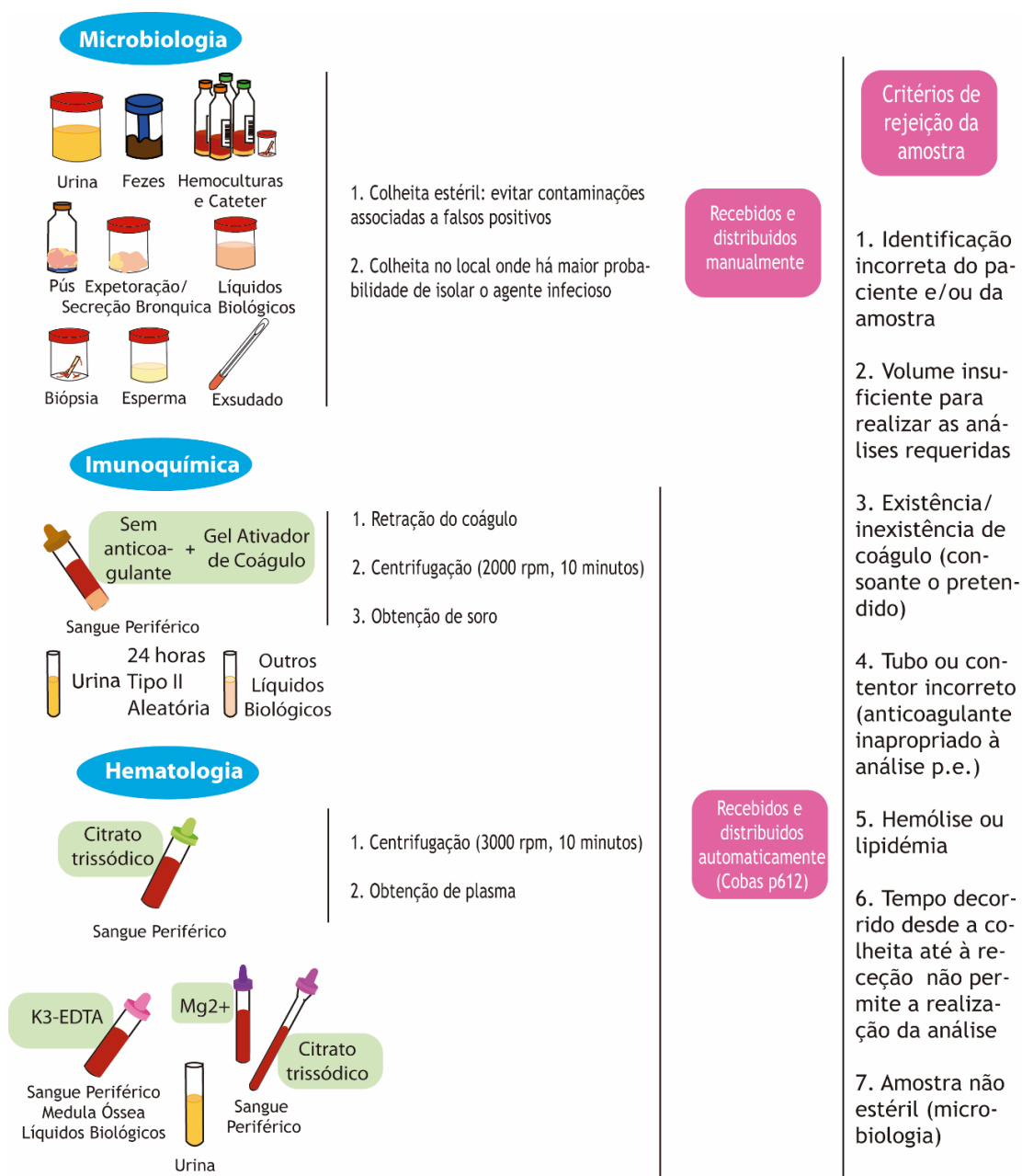
cada nível de controlo, serão calculados a média e o desvio padrão do laboratório, diminuindo o intervalo de aceitação dos controlos. Todos os controlos são transferidos de forma automática ou manual para o *software* Modulab, permitindo a sua consulta e análise.

A calibração é efetuada para estabelecer uma relação entre os valores medidos (p.e. absorvância) e os resultados correspondentes (p.e. concentração de um analito). Este processo poderá envolver a definição completa de uma nova curva de calibração ou apenas a atualização de parâmetros da curva de calibração já existente. A calibração é recomendada quando há mudança de reagente ou lote, em intervalos de tempo regulares, como ação preventiva e devido ao controlo estar fora do intervalo de confiança.

### **3. Produtos Biológicos e Distribuição**

Aquando do pedido de análises pelo clínico é gerado um código de barras único que contém toda a informação acerca do doente, assim como as análises requeridas e a data de colheita. Este código de barras é colocado no respetivo contentor de colheita, sendo que nenhum contentor é colhido sem a correta identificação do doente, que deve ser verificada nas várias fases de processamento de amostra. Os produtos biológicos são recebidos no SPC e posteriormente distribuídos para as secções onde vão ser analisados (Figura 26).

O sistema pré-analítico do SPC é gerido pelo Cobas® p612 (Roche *Diagnostics*), este está programado de modo a que as amostras sejam recebidas (registo da hora da entrada do contentor no laboratório) e separadas para suportes diferentes consoante os testes que constam no pedido (Figura 27). Em função dos pedidos para cada utente, o sistema pré-analítico realiza alíquotas de forma automática a partir do tubo primário, desta forma a amostra é rentabilizada permitindo o doseamento de diferentes parâmetros simultaneamente e em equipamentos diferentes, assim como efetuar uma alíquota da amostra para congelar antes desta ser manipulada. Após todos os testes serem efetuados, as amostras são então reintroduzidas no aparelho e arquivadas, sendo-lhe atribuída uma posição no arquivo permitindo o rastreamento da amostra. O cobas® p612 está associado a um *software* (cobas® infinity) que permite rastrear amostras, controlando assim de forma mais eficiente o fluxo de amostras. Os tubos pediátricos são processados manualmente.



**Figura 26. Produtos biológicos analisados no serviço de patologia clínica (SPC) e critérios de rejeição de amostra.** Principais produtos biológicos recebidos em cada secção do SPC e tipos de contentores/tubos. A cor da tampa de cada tipo de tubo dá indicação do anticoagulante presente (caixas de texto verdes). Os produtos biológicos para a secção de microbiologia são recebidos e distribuídos manualmente, enquanto que os produtos biológicos para as secções de imunoquímica e hematologia são recebidos e distribuídos automaticamente pelo aparelho cobas® p612 (Roche Diagnostics).

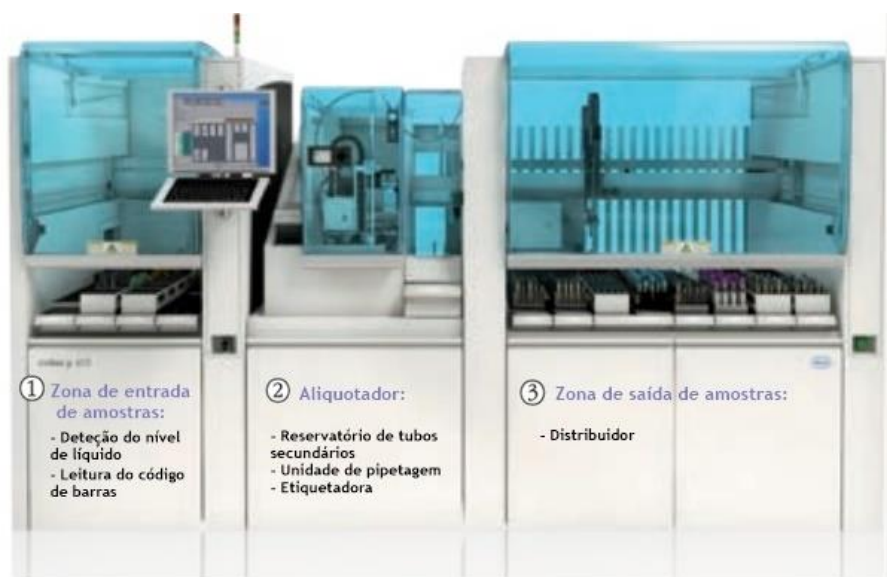


Figura 27. Cobas® p612. Representação dos 3 principais constituintes do aparelho: zona de entrada de amostras, aliquotador e zona de saída de amostras. Adaptada de (52).

## 4. Validação de Resultados

A validação de resultados compreende a validação analítica e a validação biopatológica. A validação analítica baseia-se em procedimentos definidos pelo laboratório e pressupõe a verificação do bom funcionamento do equipamento, qualidade dos reagentes e a análise dos resultados do controlo da qualidade interno. A validação biopatológica, por sua vez, deve verificar a compatibilidade dos resultados com o histórico do doente (quando possível), tendo sempre em consideração o seu estado clínico atual e/ou terapêutica. Assim, o histórico do doente constitui um dado fundamental para a correta interpretação dos seus resultados e estudo posterior. Este procedimento verifica a concordância e compatibilidade dos resultados.

## 5. Laboratório de Microbiologia

O Laboratório de Microbiologia tem como principal objetivo o diagnóstico e orientação no tratamento de doenças infecciosas. A rapidez e assertividade de resposta são imperativas para impedir a disseminação da doença e permitir que o paciente receba a terapêutica adequada. Além da componente bacteriológica, este laboratório também efetua estudos micológicos e parasitológicos.

### 5.1. Análise Microscópica

A observação microscópica é um procedimento crucial no laboratório clínico, além de ser importante para a validação da amostra, direciona o estudo que deve ser feito para isolar e identificar os microrganismos de interesse.

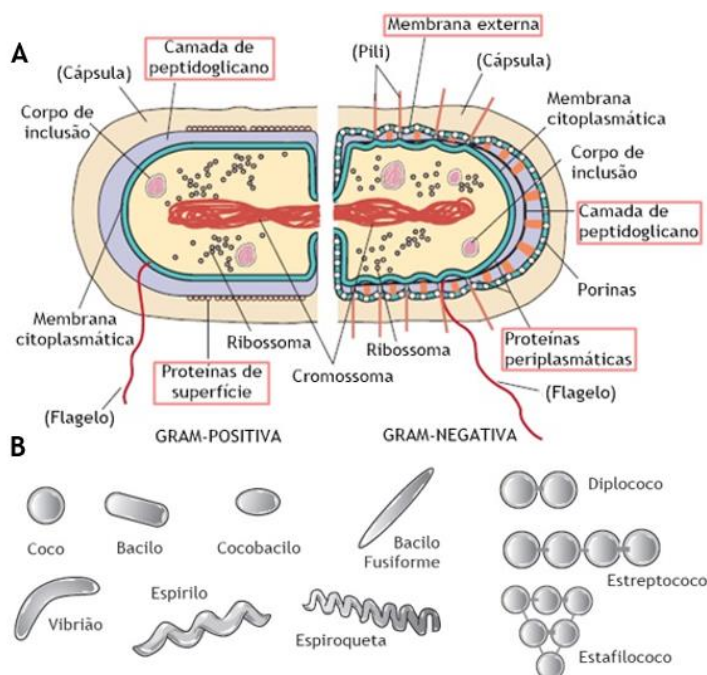
Existem dois métodos diretos utilizados na preparação de amostras microbiológicas:

❖ Exame a Fresco: observação direta da amostra ao microscópio, preservando a forma natural dos microrganismos. É frequentemente utilizada para analisar o sedimento urinário e a presença de fungos ou parasitas (diluição com água ou com um corante de contraste).

❖ Exame pós-coloração: possibilita a fixação e coloração dos microrganismos presentes, para posterior observação microscópica. A maioria das observações microscópicas é feita pós-coloração, sendo que os microrganismos e as restantes células são facilmente identificadas pelo uso de corantes.

### 5.1.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é o método de coloração mais importante utilizado no laboratório de microbiologia, indispensável para o diagnóstico e identificação de diversos microrganismos. Esta coloração classifica os microrganismos com base nas suas características morfológicas (tamanho e forma) e tintoriais (coloração) (53). Estas características e respetiva classificação estão representadas na Figura 28.



**Figura 28. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (A) e morfologia das bactérias (B).** As Gram-positivas (esquerda) têm uma camada espessa de peptidoglicano (representado a púrpura). As Gram-negativas (direita) tem uma camada fina de peptidoglicano (representado pela linha negra) e uma membrana externa. As estruturas em parênteses não são comuns a todas as bactérias. É ainda possível observar as diferentes morfologias que as bactérias podem apresentar: esférica (coco), bastonete (bacilo), oval (cocobacilo), vírgula (vibrião), ondulada (espirilo) ou espiral (espiroqueta). Algumas bactérias formam ainda agregados podendo dispor-se em pares (diplococo), cachos (estafilococo) ou cadeias (estreptococo). Adaptada de (53)

As bactérias Gram-positivas quando tratadas por um corante básico de pararosanilina (violeta de cristal, p.e.), e seguidamente pelo iodo (lugol), fixam o corante de tal modo que este não é removido pelo diferenciador álcool-acetona, corando de púrpura (53). Este facto deve-se à parede destas bactérias ser constituída por uma camada espessa de peptidoglicano suficientemente porosa para permitir a passagem de metabolitos para a membrana

plasmática (53). As bactérias Gram-negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano na constituição da sua parede celular, perdendo a cor quando é aplicado o diferenciador álcool-acetona (53). Para que se possam ver mais facilmente quando observadas ao microscópio, aplica-se um corante de contraste, geralmente vermelho (safranina) (53).

Algumas bactérias não podem ser classificadas pela coloração de Gram por possuírem uma cápsula exterior cerosa, incluindo as micobactérias e os micoplasmas, que não possuem peptidoglicano (53).

### 5.1.2. Coloração Álcool-Ácido Resistente (Ziehl-Neelsen)

Alguns microrganismos possuem a particularidade da sua parede celular ser constituída por ácidos gordos de cadeia longa (ácido micólico), que conferem impermeabilidade ao violeta de cristal e a outros corantes básicos (53). No entanto, a exposição a altas temperaturas permite a entrada de corantes primários, deixando de ser possível a sua remoção (53). Na presença do solvente álcool-acido, estes microrganismos mantêm a cor púrpura, denominando-se assim de coloração álcool-ácido-resistente (53). As restantes bactérias, descoradas pelo solvente, são novamente coradas por um corante de contraste, o azul-de-metileno (53). O principal grupo de bactérias diferenciado por esta coloração é o *Mycobacterium spp.* (53).

## 5.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura (Tabela 8) fornecem os nutrientes necessários para o crescimento de diversos microrganismos. Sendo que cada microrganismo tem exigências metabólicas específicas, estes meios podem ser divididos em três categorias:

- ❖ **Não seletivos:** favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos;
- ❖ **Seletivos:** permitem o crescimento de microrganismos específicos, inibindo os restantes;
- ❖ **Diferenciais:** permitem que as colónias exibam determinadas características, diferenciando os microrganismos que crescem nesse meio.

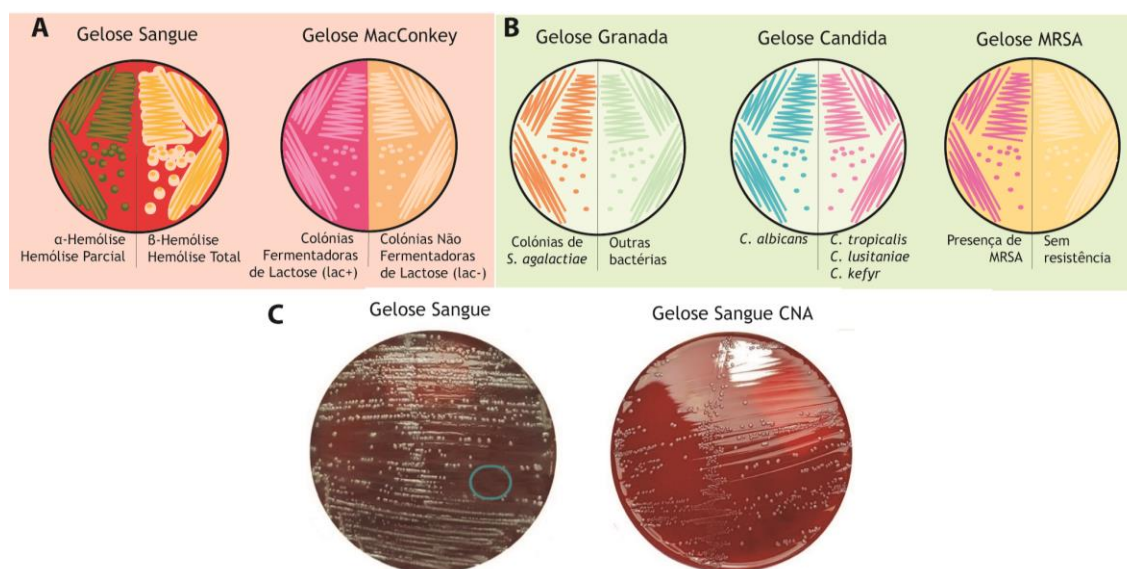
Tabela 8. Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira. MRSA: *S. aureus* resistente à meticilina

Meio	Categoria	Principais características	Utilidade	Ref.
Gelose sangue	Diferencial não seletivo	Sangue de carneiro (5%) Mistura de peptonas altamente nutritiva	Crescimento de microrganismos não fastidiosos ( <i>Streptococci</i> , <i>Listeria spp.</i> entre outros) Diferenciação do tipo de hemólise Isolamento de colónias	(54)
Gelose sangue CNA	Seletivo	Ácido nalidixico e colimicina (inibidores de Gram-negativas)	Crescimento de Gram-positivas	
Gelose MacConkey	Diferencial seletivo	Cristal violeta e sais biliares (inibidores de Gram-positivas)	Crescimento de Gram-negativas Deteção de <i>Enterobacteriaceae spp.</i> Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose	(54)

Meio	Categoria	Principais características	Utilidade
Gelose MacConkey com sorbitol	Diferencial	Sorbitol	Identificação e isolamento de colónias de <i>Escherichia coli</i> O157:H7
Gelose Chocolate PolyviteX™	Diferencial não seletivo	Fator X (hemina) Fator V (dinucleótido de nicotinamida e adenina)	Crescimento de microrganismos fastidiosos ( <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus spp.</i> e <i>S. pneumoniae</i> ) Isolamento de colónias
Gelose Chocolate PolyviteX™ VCAT3	Seletivo	Vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim	Isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>
Gelose Chocolate <i>Haemophilus</i>	Seletivo	Bacitricina	Isolamento de <i>Haemophilus spp.</i>
Gelose SS	Diferencial e seletivo	Cristal violeta e sais biliares (inibidores de Gram-positivas)	Isolamento de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella spp.</i> Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose/redutoras e não redutoras de tiosulfato
Gelose Campyloset	Seletivo	Sangue de carneiro Agentes redutores Antibióticos e antifúngicos específicos	Isolamento de <i>Campylobacter spp.</i> intestinal ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> )
Gelose <i>Yersinia</i>	Diferencial e seletivo	Cefsulodina, Irgasan, Novobiocina (CIN) Manitol e vermelho neutro Cristal violeta, colato, desoxicolato (inibidores de Gram-positivas)	Isolamento de <i>Yersinia spp.</i>
Gelose <i>Pylori</i>	Seletivo	Plasma de cavalo PolyviteX™ Antibióticos específicos	Isolamento de <i>Helicobacter pylori</i>
Gelose Manitol Salgado	Diferencial e seletivo	Manitol Elevado teor em cloreto de sódio (inibe outras bactérias)	Isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i> Diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras de manitol
Gelose Müller-Hinton	Não seletivo	Concentração em iões bivalentes ajustada Baixa concentração de timina-timidina	Antibiogramas por difusão em discos Crescimento de bactérias não fastidiosas
Gelose Granada	Diferencial e seletivo	Granadaene Metotrexano	Isolamento de <i>Streptococcus</i> do grupo B ( <i>S. agalactiae</i> )
Gelose Candida	Diferencial e seletivo	Hexosaminidase Antibióticos específicos (inibição do crescimento bacteriano)	Crescimento de leveduras Identificação de <i>Candida albicans</i>
Gelose Sabouraud	Seletivo	Gentamicina Cloranfenicol Níveis elevados de peptonas e dextrose pH ligeiramente ácido	Isolamento de leveduras e fungos
Gelose Sabouraud para dermatófitos	Seletivo	Semelhante ao Sabouraud Adição de actidiona (cicloheximida)	Crescimento de dermatófitos ( <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i> e <i>Epidermophyton spp.</i> )

Meio	Categoria	Principais características	Utilidade
Meio para pesquisa de MRSA	Diferencial e seletivo	Cefoxitina Outros antibióticos	Deteção de MRSA
Caldo de Carne (líquido)	Não seletivo	Azoto, vitaminas, hidratos de carbono Baixa concentração de dextrose Partículas de carne Cloreto de sódio	Diferenciação de <i>Clostridium spp.</i> Determinação da atividade proteolítica de anaeróbios
Todd-Hewitt (líquido)	Seletivo	Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Peptonas e Dextrose	Isolamento de <i>Streptococcus</i> do grupo B
Meio líquido de Tetrationato	Seletivo	Azoto, carbono, vitaminas e aminoácidos Tiosulfato de sódio e tetrationato Saís biliares e carbonato de cálcio	Crescimento de <i>Salmonella spp.</i>
Meio de Lownstein (semi-sólido)	Seletivo	Glicerol, fécula de batata, saís, ovos e verde malaquita	Isolamento de micobactérias

A seguinte Figura exemplifica alguns dos meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia do CHUCB e a respetiva aparência das colónias.



**Figura 29. Meios de cultura utilizados no laboratório de microbiologia. Gelose Sangue e Gelose MacConkey (A).** Representação da aparência de colónias α-hemolíticas (coloração esverdeada em volta da colónia, *S.pneumoniae* p.e.) e β-hemolíticas (transparência/coloração clara em volta das colónias, *S.pyogenes*, p.e.) em Gelose Sangue (esquerda) e de colónias fermentadoras (cor-de-rosa) e não fermentadoras de lactose (bege/incolor) em Gelose MacConkey (direita). **Meios seletivos e diferenciais (B).** Representação das colónias de *S. agalactiae* (laranja) em meio Granada (esquerda), as outras bactérias não apresentam cor. Representação das colónias de *C. albicans* (azul) e de outras espécies deste género (cor-de-rosa) em Gelose *Candida* (centro). Meio cromogénico (direita) para identificação rápida de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) através da coloração rosa das colónias, na ausência de resistência estas não apresentam cor. **Gelose Sangue e Gelose Sangue CNA (C).** Sementeira em Gelose Sangue (esquerda) e sementeira em Gelose Sangue CNA (direita) do mesmo produto biológico (urina). Em Gelose Sangue, o *Proteus spp.* (Gram-negativo) apresenta na maioria das vezes um “véu” resultante da sua mobilidade (círculo) podendo dificultar o isolamento de outras bactérias presentes. A Gelose Sangue CNA é importante nestes casos, pois só permite o crescimento de bactérias Gram-positivas, facilitando assim o seu isolamento.

Além dos meios descritos na Tabela 8, chegam ao laboratório garrafas de hemocultura. Estas garrafas são desenhadas especificamente para incubação no sistema de deteção microbiana BACT/ALERT® 3D. Podem conter dois tipos de meio, um para cultura em anaerobiose e outro para aerobiose. Estes meios são baseados num líquido tríptico de soja suplementado com aminoácidos complexos, hidratos de carbono e 0,035% de polissulfato pentosano de sódio (anticoagulante), de modo a garantir o crescimento e a produção ótima de CO<sub>2</sub> (58). Estas garrafas contêm um indicador da produção de CO<sub>2</sub> na sua base, separado do meio por uma membrana semipermeável. Além destes constituintes, contêm resinas em suspensão que permitem fixar os antibióticos presentes na amostra (pacientes a efetuar terapêutica antimicrobiana) inativando-os (58).

### 5.3. Condições de cultura

Os microrganismos atingem condições ótimas de crescimento quando se encontram reunidas as condições nutricionais fornecidas pelo meio de cultura e as condições físicas a que são expostos (temperatura, atmosfera e pH). Alguns microrganismos crescem otimamente a valores de pH aproximadamente neutros (neutrófilos), a valores de pH inferiores a 5.5 (acidófilos) e a valores de pH superiores a 8 (alcalifílicos) (53). A temperatura de incubação que possibilita o crescimento mais rápido é chamada de temperatura ótima, sendo específica para cada tipo de bactéria. As bactérias psicotófilas conseguem crescer a temperaturas baixas (entre os 0 e os 15 °C), as mesófilas crescem entre 20 e 40 °C (maioria dos microrganismos) e as termófilas crescem a temperaturas altas (entre os 40 e os 60 °C, *Campylobacter* p.e.) (53). A necessidade ou não de atmosfera específica, nomeadamente rica em O<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> permite classificar as bactérias em (a) aeróbias obrigatórias: 21% de O<sub>2</sub> e pequena quantidade de CO<sub>2</sub> (0.03%); (b) anaeróbias obrigatórias: não crescem na presença de oxigénio livre, esta atmosfera pode ser obtida através de geradores de anaerobiose com 5 a 10% de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, 80 a 90% de azoto e 0% de O<sub>2</sub>; (c) anaeróbias facultativas: crescem na presença ou ausência de oxigénio livre e (d) microaerófilas: concentrações menores de oxigénio livre (5 a 10%) e mais elevadas de CO<sub>2</sub> (8 a 10%) (53). Para criar estas atmosferas o laboratório utiliza saquetas de papel que absorvem determinados gases e produzem outros, devendo ser adequadas ao objetivo de utilização. A incubação ocorre em sacos ou jarras devidamente selados.

### 5.4. Produtos Biológicos

#### Urina

A colheita é efetuada em frascos específicos fornecidos pelo laboratório, após lavagem cuidadosa dos genitais externos com solução neutra e nunca com antissépticos. O jato inicial e final são desprezados e o jato intermédio é recolhido num frasco estéril, de forma a eliminar contaminantes da uretra. A colheita pode também ser efetuada utilizando um saco

coletor (mais comum para crianças) ou por punção supra-púbica, sendo este último o método mais fidedigno em que qualquer bactéria encontrada é significativa. No doente algaliado a colheita é feita com agulha e seringa a partir da própria sonda, após a sua desinfeção. O envio da urina para o laboratório deve ser feito o mais rápido possível e esta deve ser conservada no frigorífico (4 °C) para reduzir a multiplicação bacteriana.

1. **Urocultura:** Elemento fundamental para diagnóstico laboratorial de infeções urinárias, a urina é semeada utilizando uma ansa calibrada de 1 µL, de forma a permitir a contagem do número de colónias por mL em Gelose Sangue, Gelose MacConkey (18 a 24 h, 35 °C) e Gelose Candida, no caso de suspeita de candidíase (24 a 48 h, 30 °C). Assim, no caso da contagem ser inferior a 10<sup>4</sup> Unidades Formadoras de Colónias/mL é considerado que estamos perante uma contaminação, ente 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> Unidades Formadoras de Colónias/mL é considerado um resultado duvidoso e quando a contagem é superior a 10<sup>5</sup> Unidades Formadoras de Colónias/mL estamos perante a presença de um agente causador de infeção urinária. A urocultura é o método de referência para deteção de bacteriúria, no entanto, o resultado só é obtido 24 ou 48 h após incubação.

2. **Exame citológico:** Este exame pode ser realizado de forma automática, através do aparelho SediMAX (A. Menarini Diagnostics, Itália, no caso do CHUCB) ou manualmente, através de análise microscópica. O exame citológico consiste na avaliação da presença de elementos figurados (**leucócitos**, eritrócitos e células epiteliais) na urina e, em caso afirmativo, se a contagem é significativa. Além disso é avaliada a presença de cilindros (hialinos, hemáticos, granulosos ou serosos), a presença de cristais (oxalato de cálcio, ácido úrico, fosfato amónio-magnésiano) e a presença de **bactérias ou leveduras**. O SediMAX utiliza imagem digital e um módulo de avaliação de imagem automático para detetar, contar e classificar elementos presentes na urina, reportando resultados quantitativos (59). A análise é realizada numa cuvette especificamente desenhada para o aparelho, para a qual este pipeta 200 µL de urina, sendo de seguida centrifugada a 260 g durante 10 s de forma a formar o sedimento (59). O microscópio automático através da câmara digital integrada recolhe até 15 imagens de diferentes zonas da cuvette com uma ampliação próxima de 400 vezes (59).

3. **Testes rápidos para deteção de antígenos urinários para diagnóstico de infeção por *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae*:** Cada teste possui uma linha revestida com anticorpos anti- *L. pneumophila* ou anti- *S. pneumoniae*, respetivamente conjugados com partículas de latex coloridas (linha de teste), e uma linha revestida com anticorpos anti-IgG (linha de controlo).

## Fezes

As fezes são recolhidas num contentor específico e enviadas de imediato ao laboratório para pesquisa de antígenos bacterianos, virais, cultura bacteriana ou exame parasitológico, consoante a requisição do médico.

1. **Coprocultura:** A sementeira é realizada por quadrantes nos seguintes meios: Gelose MacConkey, Gelose SS, Gelose *E. coli* (O:157) em crianças com idade inferior ou igual a 5 anos (24 h, 35 °C), Gelose *Yersinia* (24 h, 30 °C), Gelose *Campyloset* (48 h, 42 °C, em atmosfera de

microaerofilia). Coloca-se também amostra em meio líquido de tetracionato e lugol (6 h, 35 °C), sendo depois semeado em Gelose SS (24 h, 35 °C).

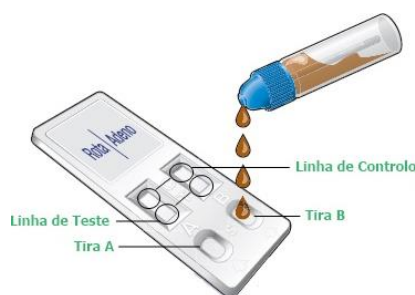
## 2. Testes rápidos parasitológicos

❖ **Mini Parasep® SF:** concentrador de amostra para posterior análise microscópica da presença de larvas ou ovos de helmintas e cistos ou oocistos de protozoários. O Mini Parasep® SF torna-se vantajoso pelo facto de não necessitar de adição de solventes e pela elevada nitidez da amostra quando observada ao microscópio (60).

❖ **Rapid-VIDITEST *Crypto-Giardia*:** imunoensaio de fluxo lateral para deteção qualitativa de antígenos de *Cryptosporidium* e de *Giardia lamblia* (61). A amostra reage com as partículas revestidas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* e/ou com anticorpos anti-*Giardia* previamente fixados nas respetivas linhas de teste (61). De seguida, a mistura ascende na membrana por ação capilar, sendo que a linha de controlo serve como verificação de que foi adicionado volume suficiente, o fluxo foi adequado e como controlo interno dos reagentes (61).

## 3. Testes rápidos para deteção vírica

❖ **CerTest *Rotavírus*+*Adenovírus*:** O princípio básico da técnica está representado na Figura 30.



**Figura 30. Representação da cassete de teste.** Membrana de nitrocelulose fixada previamente com anticorpos monoclonais de rato anti-Rotavírus (Tira A) e anti-Adenovírus (Tira B) na linha de teste. Ambas as tiras contêm anticorpos policlonais de coelho anti-proteína específica na linha de controlo. Além disso, as linhas de teste e de controlo estão conjugadas com látex de poliestireno vermelho e de poliestireno verde, respetivamente, formando assim dois complexos conjugados coloridos. Adaptada de (62).

❖ **RIDA®QUICK Norovírus:** método simples e sensível para detetar antígenos dos genogrupos de Norovírus I e II em amostras de fezes e assim servindo como auxílio no diagnóstico de gastroenterite (63). Este teste utiliza anticorpos anti-Norovírus biotinilados ou marcados a ouro e sempre que uma amostra seja positiva para Norovírus estes anticorpos formam imunocomplexos que passam pela membrana (63). A estreptavidina existente na linha de teste liga os imunocomplexos afluentes através da biotina acoplada ao anticorpo anti-Norovírus, aparecendo uma coloração vermelha/roxa na linha de teste (63). Na linha de controlo ligam-se os anticorpos sem complexo, marcados a ouro. Nas amostras negativas, a ligação de imunocomplexos marcados a ouro não se realiza na linha de teste, mas apenas na linha de controlo, servindo esta para validar o teste (63).

## 4. Testes rápidos para deteção bacteriana

❖ **CerTest *Clostridium difficile* Toxina A+B:** teste imunocromatográfico qualitativo para deteção diferencial das toxinas do *C. difficile* (A e B). As linhas de teste consistem numa

membrana de nitrocelulose pré-revestida com anticorpos monoclonais de rato anti-toxina A e B, respetivamente (64). A linha de controlo está revestida com anticorpos policlonais de coelho anti-proteína específica de ligação (64). Se a amostra for positiva os antigénios reagem com o complexo de conjugados coloridos (anticorpos monoclonais anti-toxina (A ou B) + microesferas de poliestireno vermelhas) (64).

❖ ***Pylori-Strip***: membrana de nitrocelulose revestida com anticorpos monoclonais anti-*Helicobacter pylori* conjugados com microesferas de latex na linha de teste (65). A amostra fecal deve ser diluída em tampão de diluição (fornecido pelo teste) (65).

**5. Teste rápido para pesquisa de sangue oculto nas fezes:** imunoensaio cromatográfico para deteção de hemorragias causadas por várias doenças do trato gastrointestinal, tais como cancro do colón, úlceras, pólipos, colites, diverticulites e fissuras (66). Os resultados deste teste não são afetados pela dieta do paciente. A membrana, previamente revestida com anticorpos anti-hemoglobina na região da linha de teste, permite que a amostra reaja com o colóide revestido de ouro que contém os anticorpos anti-hemoglobina (66). A mistura migra ascendentemente na membrana cromatográfica por ação capilar de forma a reagir com os anticorpos e formar a linha colorida, indicando um resultado positivo (66). Este teste contém ainda uma linha de controlo de procedimento que aparece sempre que é adicionado o volume apropriado de amostra e sempre que a reação com a membrana ocorre, ou seja, se esta não aparecer o teste não é válido (66).

### Hemoculturas e Catéter

A colheita é efetuada por punção venosa para frascos apropriados, sendo que a pele e a zona do frasco onde se injeta a amostra devem ser desinfetadas com etanol 70% (solução antisséptica). A colheita deve ser de 10 mL para cada garrafa, no caso de ser uma colheita pediátrica deve-se colher entre 1-3 mL, de modo a eliminar falsos negativos. São colhidas 4 garrafas de hemocultura (2 de cada braço), 2 para aerobiose e 2 para anaerobiose. A incubação é feita a 35/37 °C durante 5 a 7 dias, no caso de suspeita de endocardite ou brucelose incubam durante 28 dias no aparelho BACT/ALERT® 3D (BioMérieux, Portugal, no caso do CHUCB). Quando a hemocultura fica positiva é repicada após desinfeção da tampa e semeada nos meios de cultura sólidos, simultaneamente preparando-se um esfregaço para coloração de Gram. A sementeira é efetuada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>) e Gelose MacConkey (24 a 48 h, 35 °C), no caso das hemoculturas aeróbias e pediátricas, e em Gelose Sangue (48 h, 35 °C, em atmosfera de anaerobiose), Gelose Chocolate PVX (24 a 48 h, 35 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub>), no caso das hemoculturas anaeróbias. O catéter deve vir sempre acompanhado da hemocultura concomitante, caso contrário deve ser rejeitado. A sementeira é realizada por rolamento da ponta do catéter em Gelose Sangue (técnica de Maki, 24 h, 35 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub>).

O BACT/ALERT® 3D é um sistema que, através da alteração da cor do indicador presente no fundo da garrafa de hemocultura, deteta a presença de bactérias e leveduras no sangue (58). Além desta deteção, este sistema funciona como incubadora (35 a 37 ± 0.5 °C) e como agitador (60 rpm) (58). As garrafas de hemocultura são introduzidas nos poços do aparelho,

sendo que cada poço contém um detetor colorimétrico (58). O CO<sub>2</sub> produzido pelos microrganismos presentes no meio difunde-se através da membrana semipermeável adjacente ao indicador e, após atravessar essa membrana, reage com a água formando iões de hidrogénio (58). Assim, quando a concentração de iões hidrogénio aumenta, o indicador que normalmente apresenta cor azul ou verde escura no seu estado alcalino, altera a cor para verde claro ou amarelo (58). A luz vermelha, emitida por um díodo, é refletida pelo fundo da garrafa para o fotodíodo, produzindo um sinal com voltagem proporcional à intensidade da luz refletida e conseqüentemente, à concentração de CO<sub>2</sub> no meio (58).

### Soro

O laboratório de microbiologia efetua três tipos de testes serológicos.

❖ **Teste de Rosa Bengala:** A brucelose trata-se de uma infeção sistémica com um espetro clínico muito heterogéneo, sendo causada por um cocobacilo Gram-negativo do género *Brucella spp.* (67). O teste de Rosa Bengala é um teste de *screening* com elevada sensibilidade para deteção de *Brucella spp.* por aglutinação (67). Neste teste, o soro do paciente é colocado em contacto com o antigénio Rosa Bengala e no caso de a amostra possuir anticorpos específicos para *Brucella spp.*, desenvolve-se uma reação de aglutinação visível a olho nu em intensidade variável (67). Os casos positivos devem ser confirmados com técnicas mais específicas (67). Assim, concomitantemente a este teste realiza-se o teste de Widal-Wright, mais específico, mas menos sensível.

❖ **Teste de Widal-Wright:** A reação de Widal trata-se de um teste serológico presuntivo, consistindo na aglutinação de anticorpos na presença de antigénios do tipo O (somático) e H (flagelar), sendo que o primeiro é uma IgM que aparece no caso de infeção recente (febre aguda) e o segundo é uma IgG que aparece mais tarde, permanecendo positivo durante mais tempo (68). Este teste não é só utilizado para deteção de brucelose, mas também para deteção de febre tifóide (*Salmonella spp.*) (68). Em casos de infeção por *Salmonella spp.*, a aglutinação ocorre na presença dos antigénios O e H e em casos de infeção por *Brucella spp.*, a aglutinação apenas ocorre com o antigénio O (68). É efetuada uma titulação de modo a verificar a concentração de soro a partir da qual há aglutinação (68). Ou seja, a iguais volumes de suspensão de antigénio são adicionadas várias diluições do soro do paciente (68). Nos casos positivos, o soro do doente deve ser titulado e os resultados devem referir até que diluição se mantem a positividade. Assim, os possíveis resultados são 1:20, 1:40, 1:80 ou sem aglutinação (68).

❖ **VDRL e RPR:** A sífilis é diagnosticada, na maioria dos casos, com base em testes serológicos. Os dois tipos de teste utilizados são os biologicamente não específicos (não treponémicos) e os específicos (treponémicos) (53). Os não treponémicos são utilizados como testes de *screening* e quando positivos são confirmados por testes treponémicos (53). Os testes não treponémicos doseiam a IgG e a IgM desenvolvidas contra os lípidos libertados pelas células danificadas durante a fase inicial da doença, (53). O antigénio utilizado para estes testes é a cardiolipina, sendo os dois testes mais comuns o VDRL, em inglês *Venereal Disease Research Laboratory* e o RPR, em inglês *Rapid Plasma Reagin* (53). Ambos medem a floculação

do antígeno cardiolipina pelo soro do paciente (53). Somente o VDRL é utilizado para efetuar esta análise em líquido cefalorraquidiano (neurosífilis) (53). A sensibilidade destes testes está entre 70 e 85% para doença primária, 100% para doença secundária e entre 70 a 75 % para sífilis avançada, com especificidade entre 98 e 99% (53).

### **Aparelho respiratório**

A expectoração ou secreção brônquica devem ser colhidas após higienização oral de forma a diminuir a contaminação pela flora orofaríngea. A primeira amostra da manhã é a mais concentrada, no caso da pesquisa de *M. tuberculosis* devem ser colhidas 3 amostras em dias consecutivos.

❖ **Expectorações e Secreções Brônquicas:** O primeiro passo consiste na verificação do aspeto macroscópico, e na realização de um esfregaço para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, de forma a verificar se a qualidade da amostra e a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), respetivamente. A sementeira é realizada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose Chocolate *Haemophilus*, e Gelose MacConkey (no caso dos doentes de internamento), 24 a 48 h a 35 °C. Separa-se alíquota para análise no setor de micobactérias, quando solicitado.

❖ **Aspirados Brônquicos e LBA:** A cultura bacteriana para o aspirado é efetuada nas mesmas condições que para as expectorações. Do LBA chegam 3 a 4 frações da amostra ao laboratório: a primeira, correspondente à fração brônquica, é utilizada para cultura de BAAR; a partir da segunda é efetuado o exame cultural e microscópico; a terceira é analisada por citometria de fluxo (secção de hematologia). A sementeira é realizada para contagem com uma ansa calibrada de 10 µL em Gelose Chocolate PVX (em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 24 a 48 h, 35 °C). O volume mínimo aceitável para exame direto e cultural é de aproximadamente 5 mL, após centrifugação, prepara-se uma lâmina para Gram e outra para Ziehl-Neelsen a partir do sedimento por citocentrifugação. Uma colónia equivale a 10<sup>2</sup> Unidades Formadoras de Colónias/mL, no caso da contagem ser superior a 10<sup>5</sup> Unidades Formadoras de Colónias/mL estamos perante a presença de um agente causador de infeção respiratória.

### **Produtos em zaragatoa**

❖ **Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em grávidas:** As duas zaragatoas (retal e vaginal) são colocadas em meio líquido Todd-Hewitt (24 h, 35 °C). Após incubação, o meio líquido é repicado para Gelose Granada (coloca-se uma lamela sobre a sementeira), incubando durante 24 h, a 35 °C, em atmosfera de anaerobiose.

❖ **Pesquisa de *Acinetobacter baumannii* em exsudado retal:** A sementeira é realizada por quadrantes em Gelose MacConkey e caldo de carne (24 h, 35 °C). No caso de a cultura ser negativa, o caldo de carne deve ser passado para Gelose MacConkey (24 h, 35 °C).

### **Outros líquidos biológicos**

Quando o produto é recebido deve-se registar se foi colhido para garrafa de hemocultura ou para outro contentor assético. Sempre que chegue quantidade suficiente, ou que o produto seja demasiado fluído, este deve ser centrifugado de forma a ser concentrado. Efetua-se

esfregação para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen e, se pedido, separa-se alíquota para exame cultural de BAAR.

❖ **Sinovial/Articular:** A sementeira é realizada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose MacConkey, Gelose Chocolate PVX (em atmosfera de CO<sub>2</sub>) e em garrafa de hemocultura pediátrica, no caso de se conseguir recolher um volume entre 1 e 3 mL, se não for possível é semeado em Caldo de Carne (24 a 48 h, 35 °C).

❖ **Pleural e Ascítico:** A sementeira é realizada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose MacConkey, Gelose Chocolate *Haemophilus*, e em garrafa de hemocultura pediátrica, no caso de se conseguir recolher um volume entre 1 e 3 mL, se não for possível é semeado em Caldo de Carne (24 a 48 h, 35 °C).

❖ **Cefalorraquidiano (LCR):** A colheita é efetuada por punção lombar e a amostra deve ser enviada de imediato ao laboratório, tendo em especial atenção que este produto não deve ser refrigerado. A sua refrigeração pode levar à perda da viabilidade de alguns microrganismos. O exame citológico é efetuado em câmara de contagem Nageotte. Após centrifugação, a sementeira é realizada em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose Chocolate PVX (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose MacConkey (24 a 48 h, 35 °C), Gelose Sabouraud (48 h, 30 °C) e em garrafa de hemocultura pediátrica, no caso de se conseguir recolher um volume entre 1 e 3 mL, se não for possível é semeado em caldo de carne (24 a 48 h, 35 °C). Este produto é também semeado em meio Lowenstein (3/4 gotas) para cultura de BAAR. É ainda efetuada a pesquisa de antigénios capsulares no caso de suspeita de meningite bacteriana, por testes de aglutinação.

#### **Pús**

A pele em volta da ferida deve ser lavada com água destilada ou soro fisiológico e o produto deve ser colhido, quando possível, por aspiração com agulha e seringa. Deve-se evitar o uso de zaragatoas e a contaminação da flora circundante da pele. O produto é geralmente recebido em meio de portagerm, que mantém viabilidade das bactérias por 24 h e apresenta um indicador que se torna azul em casos de contaminação por oxigénio. Nestes casos não é justificável efetuar cultura em anaerobiose. Antes de semear, deve-se desinfetar a tampa com etanol 70%, e semear por quadrantes em Gelose Sangue (uma em atmosfera de CO<sub>2</sub> e outra em atmosfera de anaerobiose - 48 h), Gelose MacConkey e Caldo de Carne (24 a 48 h, 35 °C) e ainda esfregação para coloração de Gram. Este produto também pode ser recebido em zaragatoa, geralmente duas, uma seca e outra em meio de transporte. A zaragatoa seca é colocada em Caldo de Carne e a zaragatoa em meio de transporte é semeada em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>) e Gelose MacConkey (24 a 48 h, 35 °C).

#### **Esperma**

A sementeira é realizada para contagem com uma ansa calibrada de 10 µL em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose MacConkey (24 a 48 h, 35 °C), Gelose Chocolate VCAT (em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 48 h, 35 °C) e Gelose Candida (24 a 48 h, 30 °C). Efetua-se uma alíquota de 100 µL para pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e pipeta-se 200 µL para meio de transporte

para pesquisa de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. Prepara-se um esfregaço para coloração de Gram e outro para exame a fresco, onde se efetua a contagem celular, leucocitária e avalia a presença de *Trichomonas vaginalis*.

#### **Exsudado Vaginal/Uretral**

A amostra deve ser transportada de imediato e em caso de demora deve ser conservada a 35 °C. A partir da zaragatoa em meio de Stuart a sementeira é efetuada por quadrantes em Gelose Sangue e Gelose Chocolate VCAT (em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 48 h, 35 °C) e Gelose Candida (24 a 48 h, 30 °C). A zaragatoa em meio de Stuart deve permanecer a 35 °C durante pelo menos 30 minutos antes de se efetuar a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. Pressiona-se a zaragatoa contra uma lâmina, observando-se ao microscópio numa ampliação de 400 vezes para avaliar o número de células epiteliais e polimorfonucleares e efetuar a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. Consoante pedido, pode ser necessário efetuar um teste rápido para *Clamidia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em tempo real ou efetuar a pesquisa de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*.

#### **Exsudado Orofaringeo, Ocular, Auricular e Nasal**

A colheita é efetuada com zaragatoa de dacron ou alginato de cálcio nos locais com pus.

❖ **Orofaringeo:** Pesquisa de *Streptococcus* β-hemolíticos do grupo A. A zaragatoa é colocada em Caldo de Carne (24 h, 35° C) e de seguida em Gelose Sangue (48 h, 35 °C).

❖ **Nasal:** Pesquisa de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente (MRSA). A sementeira é realizada por quadrantes em meio cromogénico MRSA (24 h, 35 °C), e a zaragatoa é colocada no meio Todd-Hewitt, que após 24 h de incubação a 35°C é passado para o meio cromogénico MRSA (24 h, 35 °C). Pode ser pedida uma análise rápida por PCR em tempo real.

❖ **Ocular e Auricular:** Recolhido em 2 zaragatoas; a primeira é semeada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 24 a 48 h, 35 °C), Saboraud (24 h, 30 °C), Gelose Chocolate *Haemophilus* e em Caldo de Carne (24 a 48 h, 35 °C); a segunda é utilizada para realizar o esfregaço coloração de Gram. No caso do exsudado ocular, em recém-nascidos semeia-se também em Gelose Chocolate VCAT (em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 24 a 48 h, 35 °C). O exsudado auricular é também semeado em Gelose MacConkey (24 a 48 h, 35 °C).

#### **Biópsias**

A amostra é reduzida em pequenas frações com a utilização de bisturi, sendo semeada por quadrantes em Gelose Sangue (em atmosfera de CO<sub>2</sub>), Gelose MacConkey e Caldo de Carne (24 a 48 h, 35 °C). Efetua-se esfregaço para coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen. Para pesquisa de *H. pylori* semeia-se 2 placas de Gelose *pylori* (em atmosfera de microaerofilia, a 35 °C), que incubam durante 14 dias, sendo que a atmosfera deve ser mudada ao 3º, 7º e 9º dia de incubação.

#### **Unhas, Cabelos, Pelos e Raspado de Pele**

Efetua-se o exame micológico para pesquisa de dermatófilos e a sementeira é realizada em Gelose para dermatófilos e Gelose Sabouraud (30°C, durante 28 dias). As placas devem ser observadas a cada 7 dias para verificar se há crescimento.

A Figura 31 resume o processamento dos produtos biológicos recebidos no laboratório de microbiologia.










Produto	Cultura	Testes Rápidos	Análise Microscópica	Real-Time PCR	Análise Micobacteriológica	
 Urina	Gelose Sangue MacConkey Candida (**)	<i>L. pneumophila</i> <i>S. pneumoniae</i>	Aparelho SediMax (Automático) Fresco (Manual)	✓ (*) (***) Deteção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	✓ (*)	
 Fezes	<i>Campyloset</i> <i>Yersinia</i> SS MacConkey <i>E. coli</i> (<5 anos) Tetracionato	<i>Criptosporidium</i> <i>Giardia</i> Adeno/Rotavirus Norovirus <i>C. difficile</i> <i>H. pylori</i> Sangue Oculcto	Suspensão do concentrador parasitológico	✗	✗	
 Hemoculturas e Cateter	Gelose Sangue (todos) Aeróbias Pediátricas MacConkey Anaeróbias Chocolate PVX	✗	Coloração de Gram	✗	✗	
 Expetoração/ Secreção Bronquica	Gelose Sangue <i>Haemophilus</i> MacConkey	✗	Coloração de Gram	✓ (*) Deteção de <i>M. tuberculosis</i> resistente à rifampicina	✓ (*)	
 Aspirado Brônquico (AB) Lavado Broncoalveolar (LBA)	AB: Gelose Sangue <i>Haemophilus</i> MacConkey LBA: Chocolate PVX	✗	Coloração de Gram	AB: ✓ (*) Deteção de <i>M. tuberculosis</i> resistente à rifampicina	✓ (*)	
 Líquidos	Sinovial Articular	Gelose Sangue Chocolate PVX MacConkey Garrafa de hemocultura	✗	Coloração de Gram	✗	✓ (*)
	Pleural Ascítico	Gelose Sangue <i>Haemophilus</i> MacConkey	✗	Coloração de Gram	✗	✓ (*)
	Cefalorraquidiano	Gelose Sangue Chocolate PVX MacConkey Sabouraud Garrafa de hemocultura	Antígenos Capsulares	Contagem: Câmara de Nageotte Coloração de Gram	✗	✓ (*)
 Pús	Gelose Sangue Gelose Sangue (anaeróbia) MacConkey Caldo de Carne	✗	Coloração de Gram	✗	✗	
 Biópsia	Gelose Sangue MacConkey Caldo de Carne <i>pylori</i> (*)	✗	Coloração de Gram Coloração de Ziehl-Neelsen (*)	✗	✗	
Exsudados	Vaginal Uretrat	Gelose Sangue Chocolate VCAT	<i>U. urealyticum</i> <i>M. hominis</i> (****)	Fresco	Deteção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> ✓ (*)	✗
	Orofaringeo	Caldo de Carne Gelose Sangue	✗	Coloração de Gram	✗	✗
	Nasal	MRSA	✗	Coloração de Gram	Deteção de <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (*) ✓	✗
	Ocular (O) Auricular (A)	Gelose Sangue <i>Haemophilus</i> Sabouraud	Caldo de Carne Chocolate VCAT (O) MacConkey (A)	Coloração de Gram	✗	✗
 Esperma	Gelose Sangue MacConkey Chocolate VCAT Candida	<i>U. urealyticum</i> <i>M. hominis</i> (****)	Fresco Coloração de Gram	✗	✗	

Figura 31. Principais produtos biológicos analisados no laboratório de microbiologia. (\*) Quando pedido; (\*\*) Suspeita de candidíase; (\*\*\*) urina do primeiro jato; (\*\*\*\*) Não é teste rápido, mas sim teste colorimétrico (48 horas). Na Figura não constam os seguintes testes: serologia, exames micológicos, pesquisa de *S. agalactiae* em grávidas e *A. baumannii* em exsudado retal. MRSA: *S.aureus* resistente à meticilina.

## 5.5. Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos

Na secção de microbiologia, os testes qualitativos de diagnóstico *in vitro* que utilizam análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real são realizados através do sistema de instrumentos GeneXpert®. Neste sistema a preparação da amostra, a extração e amplificação de ácidos nucleicos e a deteção da sequência-alvo ocorrem de forma automatizada (69). É necessária a utilização de cartuchos descartáveis (Figura 32), de utilização única, que contêm os reagentes da PCR e onde decorre todo o processo (69). Cada teste inclui um controlo de processamento de amostra e um controlo de verificação de sonda, funcionando como controlos de qualidade (69). O controlo de processamento de amostra contém esporos de *Bacillus globigii* (esfera seca) para verificar o processamento adequado da amostra e se ocorreu a lise da bactéria, caso esteja presente (69). Adicionalmente, este controlo deteta a inibição do ensaio associada à amostra, assegura que as condições de temperatura e tempo são adequadas para a reação de amplificação e que os reagentes da PCR estão funcionais (69). O controlo de processamento de amostra deve ser positivo em amostras negativas e pode ser negativo ou positivo em amostras positivas (69). Por sua vez, o controlo de verificação de sonda (controlo interno) consiste na medição do sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante (69).



**Figura 32. Cartucho e sistema GeneXpert®.** O processamento é efetuado de acordo com o tipo de amostra, geralmente é concentrada por centrifugação e misturada com o reagente presente no kit (15 minutos de atuação). De seguida é pipetada para o cartucho, que é inserido no sistema. Este sistema está associado a um computador e *software* pré-carregado para a execução de testes e visualização dos resultados. Fotografias retiradas de (69).

### 5.5.1. Detecção de *M. tuberculosis* e Resistência à Rifampicina

O tratamento da tuberculose envolve a administração de vários fármacos, no entanto as estirpes de *M. tuberculosis* podem adquirir resistência a um ou mais fármacos tornando a cura muito mais difícil de alcançar (70). A deteção molecular da *M. tuberculosis* e das mutações do gene *rpoB* associadas à resistência à rifampicina acelera o diagnóstico (70). O ensaio Xpert MTB/RIF é um teste concebido para: (a) deteção do ácido desoxirribunucleico (DNA) do complexo *M. tuberculosis* em amostras de expectoração ou em sedimentos concentrados destas, positivas ou negativas para esfregaço de BAAR; (b) deteção de mutações do gene *rpoB*, associadas à resistência à rifampicina, através da amplificação deste gene pelos

*primers* que contêm a região *core* com 81 pares de bases (70). As sondas têm a capacidade de diferenciar entre a sequência conservada do *wild-type* e mutações na região *core* que estão associadas com a resistência à rifampicina (70).

### 5.5.2. Detecção de Gram-negativos não Suscetíveis a Carbapenemos

A disseminação global de espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* é um problema de saúde pública grave (71). Estas bactérias são normalmente resistentes a todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos e frequentemente co-resistentes a diversas classes de antibióticos, verificando-se uma grande limitação nas opções de tratamento (71). O ensaio Xpert Carba-R é um teste concebido para a deteção e diferenciação rápida das sequências dos genes *bla<sub>KPC</sub>* (carbapenemase *Klebsiella pneumoniae*), *bla<sub>NDM</sub>* (Nova Deli metalo- $\beta$ -lactamase), *bla<sub>VIM</sub>* (Verona metalo- $\beta$ -lactamase codificada por integrões), *bla<sub>OXA-48</sub>* (oxacilinase de classe D) e *bla<sub>IMP-1</sub>* (imipenemase) associados à não suscetibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativas obtidas a partir de amostras de zaragatoas retais em doentes em risco de colonização intestinal com bactérias não suscetíveis a carbapenemos (71).

### 5.5.3. Detecção de *S. aureus* Resistente à Meticilina

A aquisição e propagação de plasmídeos codificadores de  $\beta$ -lactamases comprometem a eficácia da penicilina no tratamento de infeções por *S. aureus* (72). Assim, a meticilina (penicilina semissintética) tornou-se o fármaco de eleição para o tratamento deste tipo de infeção (72). No entanto, a resistência é conferida quando esta bactéria adquire um complexo de gene *mec* que contém o gene *mecA* ou *mecC* denominado cassette cromossómica estafilocócica (72). O ensaio Xpert MRSA inclui reagentes para a deteção de MRSA diretamente a partir de zaragatoas nasais em pacientes com risco de colonização nasal (72). Os iniciadores e as sondas detetam sequências exclusivas de resistência à meticilina/oxacilina (genes *mecA* e *mecC*) e *SCCmec*, que é inserida no cromossoma do *S. aureus* no local *attB* (72).

### 5.5.4. Detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

Ao contrário dos testes anteriormente referidos, este teste deteta a presença de bactérias e não a sua resistência a antibióticos. Serve para diagnóstico rápido de doenças sexualmente transmissíveis (clamídia e gonorreia)(73). O ensaio Xpert CT/NG é um teste para deteção e diferenciação de DNA genómico de *C. trachomatis* (bactéria Gram-negativa causadora da clamídia) e/ou de *N. gonorrhoeae* (diplococo Gram-negativo causador da gonorreia). Pode ser utilizado para testar as seguintes amostras de indivíduos assintomáticos e sintomáticos: urina do jato inicial, zaragatoa endocervical e zaragatoa vaginal colhida por pacientes (73). É detetado um alvo para *C. trachomatis* e são detetados dois alvos diferentes para *N.*

*gonorrhoeae*, neste último caso, ambos têm de ser positivos para o ensaio indicar um resultado positivo para *N. gonorrhoeae* (73).

## 5.6. Testes de Identificação e de Sensibilidade aos Antibióticos

### 5.6.1. Testes Manuais

❖ **Oxidase (53):** Este teste serve para determinar a presença da enzima intracelular Citocromo C Oxidase em bactérias. O transporte de eletrões que ocorre nas principais vias metabólicas da maioria das *Pseudomonas spp.* é catalisado por esta enzima, permitindo assim diferenciar bacilos Gram-negativos oxidase positivos (*Pseudomonas spp.*) dos oxidase negativos.

❖ **Catalase (53):** Consiste na deteção da presença de catalase, tendo como objetivo a distinção de cocos Gram-positivos. A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  e  $O_2$ . A efervescência verificada na realização do teste, deve-se à libertação de  $O_2$  resultante da hidrólise de  $H_2O_2$ .

❖ **Coagulase (53):** Verifica a capacidade de um microrganismo formar um coágulo na presença de plasma, por ação da enzima coagulase. Um teste de coagulase positivo é um critério de diagnóstico presuntivo para *S. aureus*, distinguindo *Staphylococcus* coagulase positivos de *Staphylococcus* coagulase negativos, sendo que na presença de coagulase o fibrinogénio presente no plasma causa agregação da bactéria.

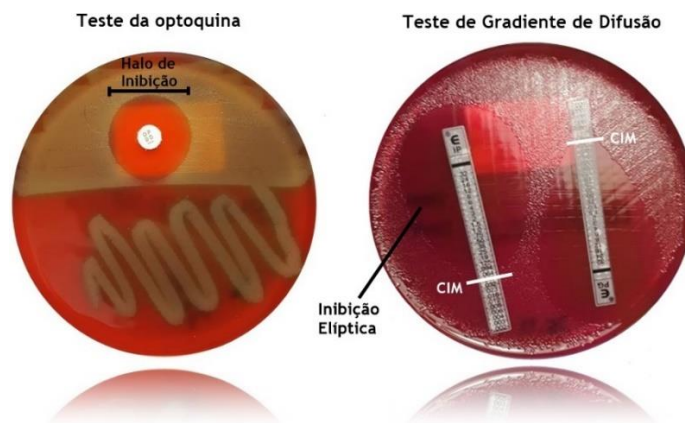
❖ **Urease (53):** Deteta a presença da enzima urease que, quando presente, hidrolisa a ureia e a amónia, aumentando o pH do meio e sendo facilmente detetada por um indicador. Este teste ajuda na identificação de certas espécies de *Enterobacteriaceae* (ex: *Proteus spp.*).

❖ **Fator X e V (53):** Teste diferenciador de *Haemophilus spp.*. São utilizados 3 discos, o primeiro contém fator X (hemina), o segundo contém fator V (dinucleótido adenina nicotinamida), e o terceiro contém os dois fatores. Consoante a necessidade diferencial da presença dos fatores para crescer, consegue-se fazer uma identificação presuntiva da espécie de *Haemophilus spp.* presente.

❖ **Optoquina (74):** Utiliza-se um disco de optoquina em meio Gelose Sangue, para diagnóstico presumível de *S. pneumoniae*. Normalmente, os pneumococos são sensíveis à optoquina, enquanto que os estreptococos, especialmente os estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos, não o são. Assim, mede-se o halo de inibição tendo em conta que uma zona de inibição maior que 12 mm permite a identificação presuntiva de *S. pneumoniae* (Figura 33). Um exemplo de um microrganismo resistente é o *S. pyogenes*.

❖ **Difusão em disco (75):** Neste teste utiliza-se uma suspensão bacteriana padronizada que é semeada em meio sólido apropriado ao método utilizado (gelose Müller-Hinton, p.e.). Os discos com antibiótico são colocados na sementeira e após incubação são medidos os tamanhos dos halos de inibição de crescimento, obtendo-se um resultado qualitativo que pode ser classificado como: sensível, intermédio ou resistente.

❖ **Gradiente de difusão (Etest) (75):** Este teste é quantitativo e baseia-se numa tira com um gradiente de concentração de antibiótico pré-definido. Esta tira é inoculada em meio sólido, havendo imediata difusão do antibiótico para o meio. Após incubação, é possível visualizar uma inibição elíptica em volta da tira, a qual nos permite quantificar a concentração mínima inibitória em  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 33).

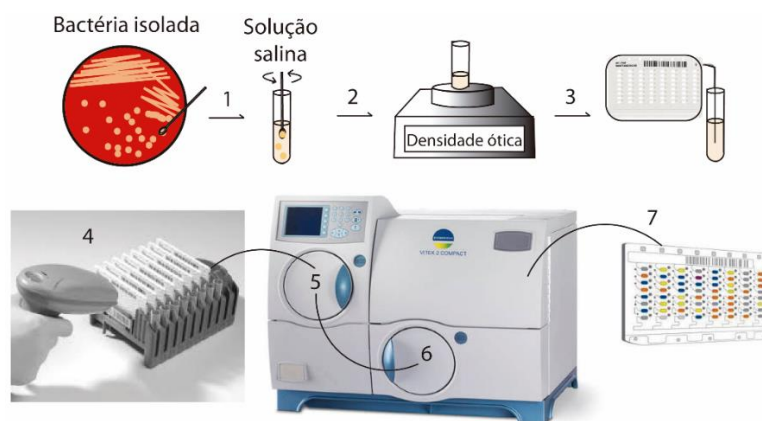


**Figura 33. Teste da optoquina e teste de gradiente de difusão (Etest).** No teste da optoquina (esquerda) observa-se um halo de inibição, indicando sensibilidade a este antibiótico. O teste de difusão em disco segue o mesmo princípio que este último. No teste de gradiente de difusão (direita), além da observação do halo de inibição elíptico, a tira tem o valor da concentração que delimita este halo - a concentração mínima inibitória.

### 5.6.2. Testes Automáticos

Na grande maioria dos casos, a identificação e o teste de sensibilidade aos antibióticos do microrganismo isolado são realizados de forma automatizada (Figura 34). Para isso, neste laboratório é utilizado o sistema Vitek® 2 Compact (BioMérieux). Este sistema inclui um conjunto de cartas de identificação com vários poços onde ocorrem reações bioquímicas que, consoante o consumo ou não do substrato pelo microrganismo, apresentam uma cor diferente (76). Este código de cores é então interpretado pelo aparelho e comparado com a base de dados, de forma a identificar qual o microrganismo com maior correspondência, apresentando um resultado probabilístico em percentagem (76).

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos são a inativação enzimática, a alteração da permeabilidade da membrana, o efluxo ativo do antibiótico e a alteração do alvo do antibiótico (53). Esta resistência resulta de mutações cromossómicas e/ou transferência de genes de resistência por elementos genéticos móveis através de diferentes processos, como por exemplo conjugação, transformação e transdução (53). Para o antibiograma, são utilizadas outras cartas que permitem avaliar o padrão de sensibilidade das bactérias perante diferentes concentrações de diferentes antibióticos (presentes nos poços), classificando-as como resistentes, intermédias e sensíveis (76). A interpretação de resultados é feita através de bases de dados padronizadas por organizações especializadas (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), p.e.).



**Figura 34. Testes automáticos de identificação e de suscetibilidade a antibióticos.** Após isolamento da bactéria a estudar, algumas colónias são recolhidas e ressuspendidas em solução salina (1) até atingir a densidade ótica específica da carta a utilizar (2). De seguida, o tubo da carta é inserido no tubo da ressusensão bacteriana (3), os códigos das cartas são lidos (4), identificando-as no *software* associado ao aparelho Vitek® 2 Compact, no qual são inseridas (5). Após aspiração do conteúdo da suspensão para a carta, o tubo é cortado e a carta é selada (5), sendo depois colocada na zona onde ocorrem as reações colorimétricas (identificação) ou a turvação (teste de suscetibilidade a antibióticos) (6). Fotografia do aparelho e das cartas retiradas de (76).

## 5.7. Principais Microrganismos Identificados

O nosso organismo é colonizado por milhares de microrganismos, que em condições normais não provocam doença e são essenciais à sobrevivência, interferindo no metabolismo do hospedeiro e na defesa contra potenciais microrganismos patogénicos (1). Esta população é numerosa e diversificada, coloniza a pele, mucosas, aparelho respiratório, intestinal, reprodutor e urinário (1). O conhecimento da flora comensal humana é muito importante na análise dos produtos biológicos que chegam ao laboratório, para que se possam eliminar falsos positivos (1). No entanto, existem regiões do corpo que são estéreis e onde a presença de qualquer microrganismo é de extrema importância, devendo ser alvo de estudo (1). Assim, podemos classificar os microrganismos como patogénicos oportunistas, que causam infeção caso haja alterações da flora, ou como patogénicos obrigatórios, cuja presença origina sempre danos no hospedeiro (1). Existe uma grande variedade de microrganismos com capacidade de causar doenças em humanos. Neste subcapítulo serão descritos os agentes infecciosos identificados com mais frequência no laboratório de microbiologia.

### Cocos Gram-negativos

Neste grupo incluem-se os diplococos Gram-negativos do género *Neisseria spp* (53). São microrganismos de crescimento difícil e oxidase positivos (53). Os mais frequentes e que causam infeção apenas no Homem são a *N. gonorrhoeae*, agente causador da gonorreia, e a *N. meningitidis*, um dos agentes causadores da meningite bacteriana aguda (53).

### Bacilos Gram-negativos

**Família de *Enterobacteriaceae* (Fermentadores):** Microrganismos constituintes da flora intestinal comensal, sendo os mais frequentemente isolados no laboratório (53). As *Enterobacteriaceae* estão associadas a infeções gastrointestinais, urinárias e respiratórias,

atuando como patogénicos oportunistas (53). São exemplos de microrganismos pertencentes a esta família: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Citrobacter koserii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens*, *Providencia spp.*, *Morganella morganni* (53). Todos os microrganismos pertencentes a esta família são: Gram-negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativos e fermentadores da glicose (53).

**Não Fermentadores:** Estas bactérias diferenciam-se das *Enterobacteriaceae*s pelo facto de não fermentarem a glicose e serem oxidase positivas (53). Nesta família incluem-se os géneros *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Stenotrophomonas spp.*, não fazem parte da flora saprófita habitual humana, mas apresentam alta prevalência em meio hospitalar (*Acinetobacter spp.* principalmente), colonizando frequentemente a pele e o aparelho respiratório dos doentes hospitalizados (53). A *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie encontrada com mais frequência nas amostras clínicas, seguida da *Acinetobacter baumannii* (53).

#### **Cocos Gram-positivos**

**Estafilococos:** Os principais géneros pertencentes a esta família são: *Staphylococcus spp.* e *Gemella spp.*, diferenciando-se das outras famílias de cocos Gram-positivos por serem catalase positivos (53). Os mais estudados em laboratório são os pertencentes ao género *Staphylococcus* (53). Estes microrganismos são geralmente comensais ou patogénicos oportunistas, sendo que a maioria das espécies são anaeróbias facultativas, catalase positivas e apresentam-se frequentemente como cocos em forma de cacho (53). A espécie mais encontrada é o *S. aureus* que, sendo coagulase positivo, produz esta enzima e distingue-se assim dos demais estafilococos que são coagulase negativos (53). O estafilococo coagulase negativo mais frequentemente encontrado é o *S. epidermidis* e, na maioria dos casos, apresenta-se como um contaminante (53).

**Streptococos:** Os microrganismos desta família dispõem-se normalmente aos pares ou em cadeia, são aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase negativa (53). Os géneros que fazem parte desta família são: *Streptococcus spp.* e *Lactococcus spp.* (53). Destes microrganismos, os mais encontrados em infeções humanas são os *Streptococcus spp.*, nomeadamente: *S. pyogenes* (ou estreptococos do grupo A de Lancefield), *S. agalactiae* (ou estreptococos do grupo B de Lancefield), *S. pneumoniae* e *S. viridans* (53). O *S. pyogenes* (β-hemolítico) é um patogénico que causa amigdalite bacteriana em crianças entre os 5 e os 10 anos de idade (53). O despiste de *S. agalactiae* (γ- ou β-hemolítico) é importante no 3º trimestre de gravidez para prevenir a infeção neonatal que pode ocasionar quadros graves de septicémia e meningite (53). O *S. pneumoniae* (α-hemolítico), é a principal causa de pneumonia da comunidade e frequente causa de meningite, otite e sinusite, contudo o microrganismo pode ser colonizador sem provocar danos nas vias respiratórias superiores (53). O *S. viridans*, (γ- ou α-hemolítico), considera-se em geral patogénico oportunista de baixa virulência frequentemente envolvidos em endocardite bacteriana (53).

**Enterococos:** O género pertencente a esta família mais comumente identificado em infeções humanas é o *Enterococcus spp.* (53). As espécies mais frequentemente isoladas são *E.faecalis* e *E.faecium*, anaeróbios facultativos e catalase negativa (53).

### **Bacilos Gram-positivos**

Os microrganismos mais frequentemente isolados pertencem aos géneros: *Listeria spp.* e *Corynebacterium spp.* (53). Este último é anaeróbio facultativo, fermentador de glicose e outros hidratos de carbono e, na sua maioria catalase positivo (53). Estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza (solo e água) e fazem parte da flora da pele e mucosas do homem (53). O isolamento de bactérias deste género a partir de produtos biológicos é geralmente considerado como contaminante (53). No entanto, no contexto clínico (imunodepressão p.e.) e/ou o seu repetido isolamento podem sugerir a sua implicação na etiologia do processo infeccioso (53).

### **Fungos**

Além dos microrganismos anteriormente mencionados o SPC efetua pesquisa de leveduras, sendo o género *Candida spp.*, mais especificamente *Candida albicans*, o mais frequentemente identificado.

## **6. Laboratório de Imunoquímica**

O Laboratório de Imunoquímica engloba as áreas da bioquímica e da imunologia clínica. Tem como principal objetivo a orientação do clínico para o diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção de patologias associadas a alterações do sistema imunitário e dos seus componentes a nível molecular, assim como de parâmetros bioquímicos.

### **6.1. Química Analítica**

#### **6.1.1. Aparelhos utilizados**

Neste laboratório são avaliados vários metabolitos de modo automático, através dos aparelhos cobas® série 6000 (Roche *Diagnostics*) e architect i2000SR (Abbott *Core Laboratory*). Estas análises bioquímicas e imunoensaios são comumente efetuadas em amostras de soro, urina, LCR e outros líquidos biológicos, tais como plasma, sangue total e líquidos serosos.

O analisador cobas® 6000 (Figura 35) é um sistema integrado totalmente automatizado que possui três módulos analíticos: 1 módulo c 501 (química) e 2 módulos e 600 (imunologia) (52). O módulo c 501 tem duas unidades de medição: a fotométrica, onde se inclui a imunoturbidimetria, e a de determinação de elétrodos seletivos de iões através de potenciometria indireta (52). Este módulo realiza cerca de 1000 testes/hora, sendo que a unidade de elétrodos seletivos de iões pode processar até 200 amostras/hora (52). O módulo e 601 utiliza a técnica analítica de eletroquimioluminescência e realiza até 170 testes/hora (52). Entre o primeiro módulo e 601 e o módulo c 501 existe um módulo de segundo rotor que

encaminha as *racks* da unidade *core* para os módulos e 601 e vice-versa, atuando também como unidade intermédia para repetição automática (52). Além dos módulos anteriormente referidos, o laboratório tem um módulo e 411 com o mesmo princípio de funcionamento que o e 601, mas para uma menor carga de trabalho, efetua até 86 testes/hora.



**Figura 35. Cobas® 6000.** Representação dos diferentes módulos e unidades. 1 - Monitor; 2 - Teclado; 3 - PC; 4 - Entrada/saída de amostras; 5 - Entrada de reagentes. Adaptada de (52).

O analisador architect *i2000SR* (Figura 36) tem um funcionamento semelhante ao módulo e 601 do cobas® 6000, efetuando até 200 exames/hora (77).

### 6.1.2. Técnicas e Parâmetros Analisados

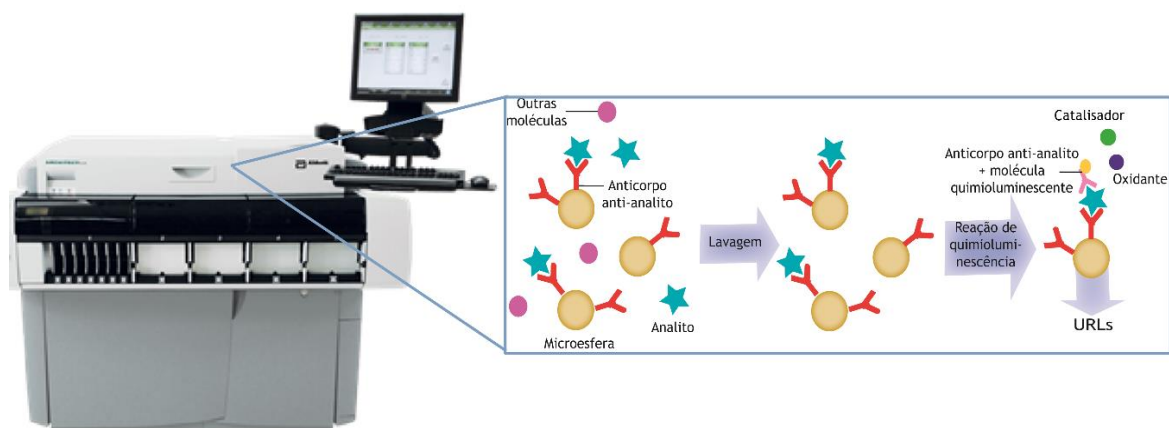
A fotometria consiste na mistura de um reagente líquido com a amostra numa *cuvette* de reação, produzindo diferente intensidade de cor consoante a concentração do analito em estudo (52). A luz da lâmpada do fotómetro passa através do conteúdo da *cuvette* de reação e entra no fotómetro, incidindo numa grelha de difração que separa a luz nos comprimentos de onda que a constituem (52). As diferentes frações são então refletidas para uma matriz fixa de 12 fotodíodos, em que cada fotodíodo deteta luz de comprimento de onda diferente (52). Assim, os diferentes comprimentos de onda e os tempos a que a absorvância é lida permitem calcular a concentração do analito (52). A imunoturbidimetria também utiliza o fotómetro, a intensidade da luz diminui devido à dispersão, reflexão e absorção que sofre ao atingir os imunocomplexos presentes na amostra (52). Assim, quanto maior for a concentração do analito de interesse, maior a formação de imunocomplexos, maior turbidez e, consequentemente, menor intensidade luminosa recebida pelo detetor (52).

A potenciometria indireta, utilizada para a determinação dos iões séricos e urinários, baseia-se na medição da força eletromotriz de células galvânicas, sendo que o potencial de um dos componentes do par eletrolítico vem em resposta às concentrações das espécies iónicas eletroativas presentes na solução (52). Neste sentido, as condições analíticas devem ser controladas para que a força eletromotriz da célula galvânica dependa apenas de uma única espécie iónica, a espécie em estudo (52). Desta forma, é efetuada a medição do potencial de um eléctrodo indicador em relação a um eléctrodo de referência (52). Este potencial depende das atividades das espécies iónicas que entram nas reações oxidação-redução

correspondentes (52). O eletrodo indicador utilizado é um eletrodo seletivos de iões, constituído por uma membrana de vidro com permeabilidade seletiva para os iões a analisar (52).

Na eletroquimioluminescência são utilizados dois anticorpos monoclonais específicos do antígeno, um anticorpo monoclonal marcado com ruténio e um anticorpo monoclonal biotilado, estes ligam-se ao antígeno presente na amostra e reagem entre si formando um complexo em sanduíche (52). Após a incorporação de micropartículas revestidas por estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida, constituída por essas micropartículas, pela interação da biotina e da estreptavidina (52). A mistura da reação é então aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo (52). A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão de luz quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador, a luz medida é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra (52).

A quimioluminescência (Figura 36) utilizada pelo architect *i2000SR* corresponde à emissão de luz quando um eletrão passa do estado excitado para um nível energético inferior (78). A excitação é causada por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante (78). O imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência ocorre em dois passos (78). No primeiro passo, a amostra e as micropartículas paramagnéticas, revestidas de anticorpos contra o analito que se pretende determinar, são incubadas, ocorrendo a ligação de anticorpos com o analito, seguindo-se de um passo de lavagem (78). No segundo passo, o anticorpo anti-analito acoplado a uma molécula quimioluminescente em contacto com o reagente ativador (catalisador + oxidante) inicia a reação de quimioluminescência. A concentração de analito detetada é diretamente proporcional ao sinal quimioluminescente detetado em unidades de luz relativas (URLs) (78).



**Figura 36.** Analisador architect *i2000SR* e técnica de quimioluminescência. Fotografia do aparelho retirada de (77).

Na Tabela 9 estão representados os parâmetros analisados através das técnicas anteriormente referidas.

Tabela 9. Parâmetros analisados, aparelhos, técnicas de análise e produtos biológicos.

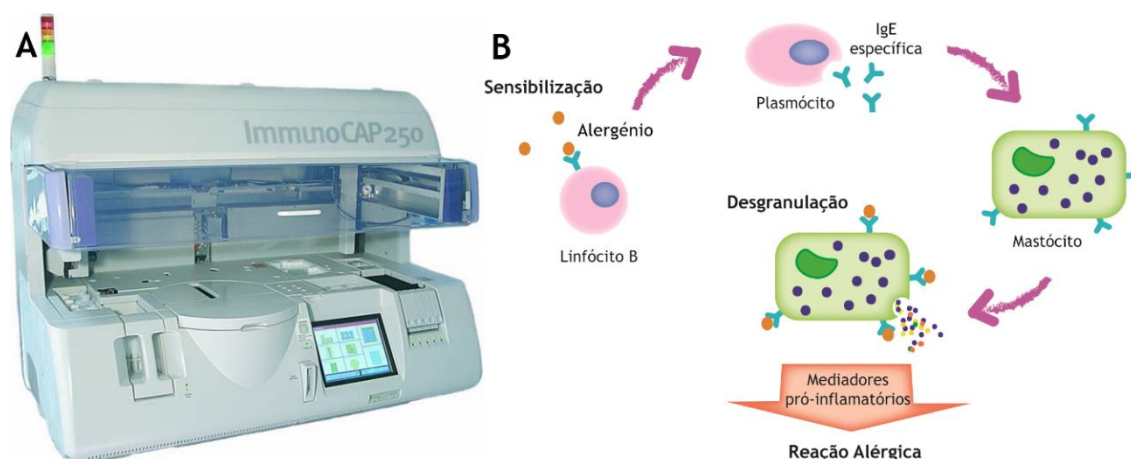
Técnica	Aparelho (Módulo)	Produto Biológico	Parâmetros
F	cobas® 6000 (c 501)	Soro/Plasma	Ácido úrico, albumina, amilase, bilirrubina direta, bilirrubina total, cálcio, creatinina cinase, colesterol HDL, LDL e total, creatinina, fosfatase alcalina, ferro, fósforo, GGT, GPT, GOT, glicose, LDH, lipase, magnésio, proteínas totais, triglicerídeos, ureia, lipoproteína a, ECA
		Urina	Glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, amilase, magnésio, cálcio, fósforo
		LCR	Glicose
IT	cobas® 6000 (c 501)	Soro/Plasma	Proteínas do complemento C3 e C4, Imunoglobulina A, M e G, proteína C reativa, transferrina, amiacina, cadeias k e $\gamma$ , fator reumatoide, $\alpha$ 1-antitripsina, haptoglobina, antiestreptolisina O, recetor solúvel de transferrina, B2-microglobulina
		Urina	Proteínas totais, microalbumina
		LCR	Proteínas totais, microalbumina, imunoglobulina G
PI	cobas® 6000 (c 501)	Urina	
		Soro/Plasma	Cloreto, sódio, potássio
EQL	cobas® 6000 (e 601)	Soro/Plasma	Ferritina, AchBs, AgHBs, AchBc, HIV, HCV, TSH, triiodotironina e trioxina livres, folatos, vitamina B12 e D, paratormona intacta, marcadores tumorais (PSA total e livre, CA-125, 15.3,19.9 e 72.4, CEA, $\alpha$ -fetoproteína), tiroglobulina, AchBs IgG
		Soro/Plasma	Hormona anti-Mulleriana, procalcitonina e proBNP
QL	architect i2000SR	Soro/Plasma Urina LCR	Marcadores cardíacos (CK-MB, mioglobina, troponina, homocisteína), cortisol, estrogénio, FSH, vírus da hepatite A, B e C (HCV, antígeno e anticorpo), HIV, vírus linfotrófico da célula T humana, LH, progesterona, prolactina, SHBG, testosterona, <i>Treponema pallidum</i> , vírus Epstein-Barr, toxoplasma, rubéola, citomegalovírus, anti-tiroglobulina, anti-peroxidase, teste de avidéz IgG para toxoplasma, rubéola e citomegalovírus

GGT: gamaglutamiltransferase, GPT: transaminase glutâmica pirúvica, GOT: transaminase glutâmica oxaloacética, LDH: lactato desidrogenase, HDL: lipoproteína de alta densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, ECA: enzima conversora de angiotensina, Ag/AchBs: anticorpo e antígeno s da hepatite B, AchBc: anticorpo s da hepatite B, HIV: vírus da imunodeficiência humana, HCV: vírus da hepatite C, TSH: hormona estimuladora de tiroglobulinas, PSA: antígeno específico da próstata, SHBG: globulina de ligação a hormonas sexuais, HIV: vírus da imunodeficiência humana, FSH: hormona folículo-estimulante, LH: hormona luteinizante, IgG: imunoglobulina G, PI: potenciometria indireta, EQL: eletroquimioluminescência, IT: imunoturbidimetria, F: fotometria; QL: quimioluminescência.

## 6.2. Testes imunológicos

No laboratório de imunquímica são efetuados testes imunológicos automáticos para vários alérgenos alimentares e ambientais, assim como para doenças inflamatórias intestinais. Para esse efeito o aparelho utilizado é o aparelho ImmunoCAP 250 (*Phadia Laboratory Systems*, Figura 37A). Podem ser utilizadas amostras de soro, plasma, sangue venoso ou capilar (79, 80). Os testes realizados são de várias categorias, incluindo pólen de gramíneas, arbustos e árvores, microrganismos, ácaros, gatos, cães e outros animais com pelo, insetos e os seus venenos, alérgenos alimentares, entre outros (79, 80). Em doentes que sofram de asma extrínseca, febre dos fenos ou eczema atópico, os sintomas desenvolvem-se imediatamente após a exposição aos alérgenos específicos (79, 80). Este tipo de alergia imediata (Figura

36B) é função de um tipo especial de anticorpos presentes no soro, pertencentes à classe E das imunoglobulinas (IgE) (79, 80).

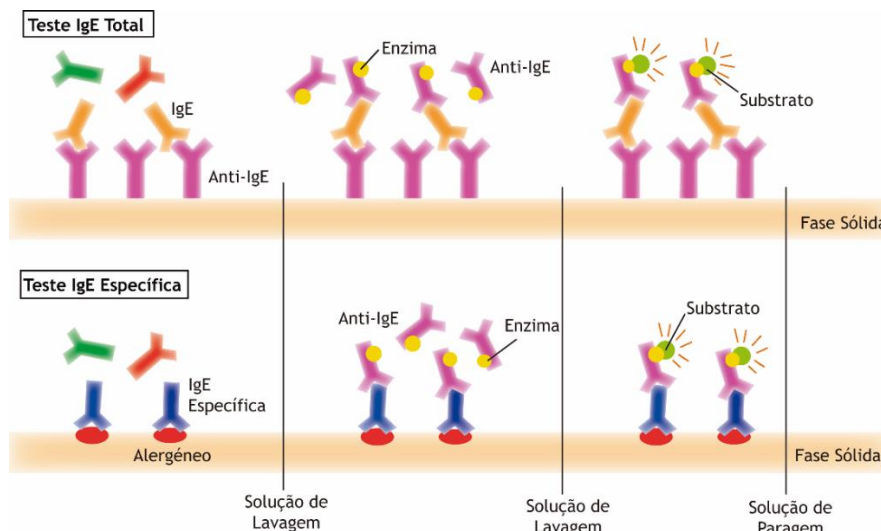


**Figura 37. Aparelho ImmunoCAP250 (A) e reação alérgica atópica (B).** No primeiro contacto com o alérgénio os linfócitos B em circulação são ativados (plasmócitos), passando a produzir IgE específica para esse alérgénio. Esta IgE liga-se aos seus recetores específicos presentes na superfície dos mastócitos. Assim, quando ocorre nova exposição ao alérgénio, este liga-se à IgE na superfície do mastócito, causando a sua desgranulação e consequente libertação de mediadores pró-inflamatórios, como a histamina. Fotografia do aparelho retirada de (79).

Os componentes alérgénicos são proteínas que se agrupam em famílias com base na semelhança estrutural (79). Alguns componentes alérgénicos são específicos e outros apresentam reatividade cruzada (79). A concentração de IgE total no soro está ainda relacionada com a idade (79). A fase sólida das canetas de teste consiste num derivado de celulose fechado numa cápsula, com um polímero hidrófilo muito ramificado ao qual os alérgénios a testar estão ligados de forma irreversível, enquanto mantêm a respetiva estrutura nativa (79, 80). O teste da IgE total é concebido como imunoensaio em sanduíche para determinação do grau de atopia com resultados semi-quantitativos ou qualitativos (79). Os resultados do são apresentados como *Phadia Arbitrary Units/L (PAU/L)* que indicam o grau de sensibilização (79). Expressam-se como positivo ou negativo, sendo que um resultado positivo indica que o doente é atópico, enquanto um resultado negativo indica que o doente é não atópico, ou seja, não sensibilizado aos alérgénios (79). A sensibilidade do teste é de 93% e a especificidade é de 89% (79).

Para determinar a concentração de anticorpos IgE específicos dos alérgénios, a amostra é testada com o ImmunoCAP IgE específica adequado (79). O ImmunoCAP IgE específica (Figura 38) é composto por mais de 650 alérgénios, por mais de 90 componentes alérgénicos e pelo *Phadiatop*, sendo este último uma mistura dos alérgénios mais comuns (*screening*) (80). A medição dos anticorpos IgE específicos permite a avaliação objetiva da respetiva sensibilização (80). Níveis baixos de IgE específica indicam uma probabilidade reduzida de alergia, enquanto níveis elevados de IgE específica para determinado alérgénio revelam boa correlação com este quadro clínico (80). Este teste quantitativo permite detetar a sensibilização do paciente, mesmo antes de surgirem quaisquer sintomas, ajuda a acompanhar a evolução da alergia e a explicar a carga de alérgénios, orientando para o tratamento (80). O intervalo de medição é entre 0,1 a 100 kUA/L de IgE específica, com um

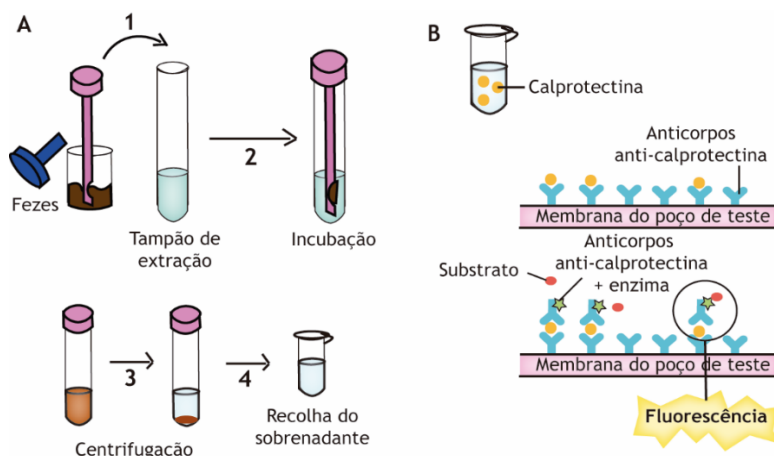
coeficiente de variação de intra-ensaio de 20%, comparável com imunoenaios da química de rotina (80). O valor de *cut-off* é 0.35 kUA/L, a sensibilidade do teste está entre 84 e 95% e a especificidade entre 85 e 94% (80).



**Figura 38. Testes de IgE total e específica.** No teste da IgE total, o anti-IgE encontra-se acoplado por ligação covalente à fase sólida, reagindo com a IgE total da amostra de soro do doente. Após lavagem, são adicionados anticorpos anti-IgE marcados por uma enzima para formarem um complexo. Após incubação, o anti-IgE não ligado é lavado e o complexo ligado é incubado com o substrato. Após paragem da reação, mede-se a fluorescência do eluído. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração de IgE total na amostra de soro. No caso do teste da IgE específica, o alérgeno encontra-se acoplado por ligação covalente à fase sólida, reagindo com a IgE específica da amostra. Após a lavagem da IgE não específica, são adicionados anti-IgE (rosa) marcados por uma enzima para formarem um complexo. Após incubação, o anti-IgE não ligado marcado por uma enzima é lavado e o complexo ligado é incubado com o substrato. Após paragem da reação, mede-se a fluorescência do eluído. A fluorescência é diretamente proporcional à presença de IgE específico na amostra.

No laboratório de imunquímica, o sistema EliA (Figura 39) é exclusivamente utilizado para realizar o teste da calprotectina que, em contraste com outros testes EliA, não é um teste para pesquisar anticorpos mas sim para determinar a quantidade desta proteína nas fezes do doente.

A inflamação intestinal é caracterizada por um aumento da atividade neutrofílica e pela perda da função da barreira da parede intestinal, permitindo a migração dos neutrófilos para o lúmen intestinal (81). O nível de calprotectina fecal correlaciona-se diretamente com o número de neutrófilos no lúmen intestinal, pois esta é a principal proteína solúvel presente no citoplasma destas células (81). Quase 98% dos doentes com doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn ou a colite ulcerosa têm um nível mais elevado de calprotectina fecal (82). A especificidade do teste é de aproximadamente 90% (82). O nível de calprotectina nas fezes é aproximadamente 6 vezes maior do que no soro (81). Este teste também pode ser utilizado para avaliar a eficácia da terapêutica e a cicatrização da mucosa intestinal (81).



**Figura 39. Teste ELIA Calprotectina.** (A) A extração da calprotectina é efetuada através do *kit* de extração fornecido no teste, que inclui os tubos que contêm uma aplicação com ranhuras para a recolha da quantidade adequada de fezes e o tampão de extração. Assim, após recolha (1), homogeneização, incubação (2) e centrifugação (3) o sobrenadante é utilizado para o teste (4). (B) Os poços de teste são revestidos com um anticorpo monoclonal anti-calprotectina, ao qual se liga a calprotectina extraída da amostra de fezes do doente. Após lavagem dos componentes não ligados, são adicionados anticorpos anti-calprotectina marcados com uma enzima. Após a incubação, o conjugado não ligado é lavado e eliminado e o complexo fixado é incubado com a solução de desenvolvimento (substrato). Após a paragem da reação, procede-se à leitura da fluorescência. Quanto mais elevado for o valor da resposta, maior a concentração de calprotectina específica presente na amostra.

## 6.3. Virologia

### 6.3.1. Vírus Respiratórios

A pesquisa de vírus respiratórios por PCR em tempo real é efetuada através do ensaio para infeções respiratórias da Allplex™. Visto que se tratam de infeções sazonais, consoante a estação do ano pesquisam-se diferentes vírus. O painel 1 engloba o vírus influenza A e B e o vírus sincicial respiratório A e B, o painel 2 engloba o adenovírus, enterovírus, vírus parainfluenza 1, 2, 3 e 4 e o metapneumovírus.

O aparelho MagNA Pure Compact (Roche, Figura 40) é utilizado para extrair e purificar ácidos nucleicos de forma automatizada. Numa primeira fase é efetuada a disrupção celular e a destruição proteica através do tampão de lise e da proteinase K, respetivamente (83). O ácido ribonucleico (RNA) liga-se à superfície das partículas magnéticas de vidro, enquanto que o DNA é removido por digestão com DNase (83). De seguida o complexo RNA-partícula é separado magneticamente e fixado na coluna (83). Após vários passos de lavagem, através dos quais os restos celulares são removidos, o RNA é separado das partículas magnéticas que estão fixadas à coluna e é eluído a alta temperatura (83).



Figura 40. Aparelho MagNA Pure Compact. Adaptada de (83).

O diagnóstico através da PCR em tempo real é baseado na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogénico. Cada ciclo da PCR consiste em três fases: (a) desnaturação - através do aumento da temperatura; (b) *annealing* - a temperatura é diminuída para poder ocorrer a ligação dos *primers*; (c) extensão - através de uma polimerase que inicia a extensão dos primers a partir da terminação 3' (78). Após estes passos, os produtos desta extensão são dissociados do RNA alvo através do aumento da temperatura (78). No final de cada ciclo, os produtos são teoricamente duplicados (78). Todo o procedimento é realizado no termociclador C1000™, programado com um protocolo específico (temperatura, tempo e número de repetições) em função do que se pretende estudar (Figura 41) (84).

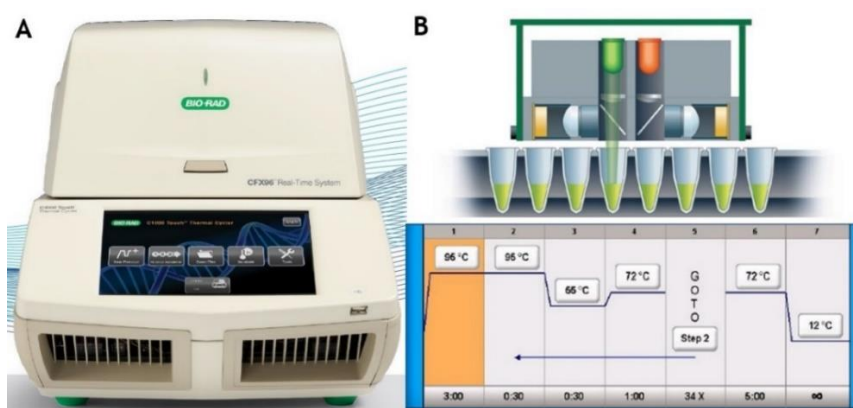


Figura 41. Sistema CFX96™ com termociclador C1000™. (A) Fotografia do aparelho. (B) Sistema de deteção e exemplo de protocolo. Adaptada de (84).

Na PCR em tempo real os produtos amplificados são detetados através de marcadores fluorescentes (84). Normalmente estes marcadores estão ligados às sondas de oligonucleótidos, por sua vez ligadas ao produto amplificado (84). A intensidade de fluorescência é monitorizada durante a corrida, o que permite a deteção e quantificação da acumulação de produto a qualquer momento (84).

### 6.3.2. Vírus da Imunodeficiência Humana e da Hepatite C

Neste laboratório, é utilizado o analisador Cobas® 4800 (Figura 42) para amplificação e deteção de ácidos nucleicos por PCR em tempo real. Inclui o aparelho cobas® x 480, onde é

efetuada a preparação das amostras, e o analisador cobas® z 480, onde são efetuadas a amplificação e deteção (85).



**Figura 42. Analisador Cobas® 4800.** Cobas® x 480 à direita e cobas® z 480 à esquerda (84).

O Teste COBAS® TaqMan® é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, utilizado para a quantificação dos genótipos 1 a 6 do RNA do vírus da hepatite C (HCV) em soro ou plasma e para a quantificação de RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1 (plasma) (86). Um número conhecido de moléculas de RNA do Padrão de Quantificação é introduzido em cada amostra juntamente com o reagente de lise (86). O teste baseia-se em três processos principais: (a) preparação da amostra para isolar o RNA alvo; (b) transcrição reversa automatizada do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); (c) amplificação por PCR do cDNA alvo utilizando iniciadores específicos complementares para o HCV ou HIV-1, e deteção simultânea por sondas de deteção oligonucleotídicas marcadas com corante fluorescente, que permitem a quantificação do produto-alvo amplificado (amplicon) (86). Durante a PCR, a sonda hibridiza-se a uma sequência alvo e é clivada (86). Este processo é repetido durante um número designado de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individuais aumentada eficazmente com cada ciclo, permitindo a identificação independente do RNA alvo e do RNA do Padrão de Quantificação (86). A intensidade dos sinais está relacionada com a quantidade de material iniciador no princípio da PCR (86). Quanto mais elevado for o título do HCV ou do HIV-1 de uma amostra, mais cedo surge a fluorescência do corante sinalizador da sonda acima do nível de fluorescência da linha de base (86). O aparecimento do sinal fluorescente específico é referido como um valor de limite essencial (Ct) (86). Um valor mais elevado de Ct indica um título mais baixo do RNA alvo inicial e, inversamente, o aumento do título está correlacionado com a redução do Ct para o RNA alvo (Figura 43) (86).

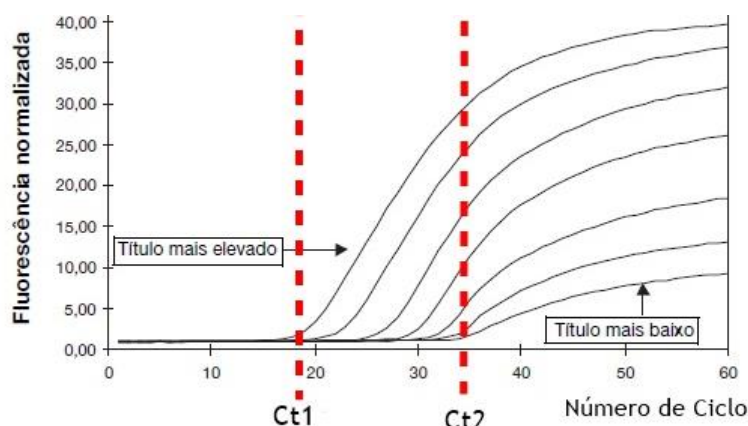


Figura 43. Curvas de crescimento do alvo para uma série de diluições de amostra. À medida que a concentração do vírus aumenta, as curvas de crescimento desviam-se para ciclos anteriores. Consequentemente, a curva de crescimento mais à esquerda corresponde ao nível de título viral mais elevado (Ct mais baixo), enquanto que a curva de crescimento mais à direita corresponde ao nível de título viral mais baixo (Ct mais alto). Adaptada de (86).

#### 6.4. Pesquisa de *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii*

A *Coxiella burnetii* é uma bactéria cocobacilar Gram-negativa intracelular, causadora da febre Q em humanos e animais domésticos (78). Completa o seu ciclo de desenvolvimento dentro dos fagossomas de células fagocitárias, como os macrófagos (78). A *Rickettsia conorii* é um bacilo Gram-negativo intracelular bifásico, que se desenvolve estritamente nas células eucarióticas atuando como parasita obrigatório (78). Esta bactéria provoca a febre botonosa mediterrânea (78). Estes dois microrganismos são geralmente diagnosticados por ensaios de imunofluorescência indireta, com o objetivo de detetar anticorpos IgG e IgM (87). Esta técnica baseia-se na reação de anticorpos específicos presentes na amostra com os antigénios que revestem os poços da lâmina, sendo que as ligações não específicas são eliminadas por lavagem (87). Posteriormente, adiciona-se uma globina anti-humana marcada com fluoresceína, que identifica o imunocomplexo, permitindo a sua observação através do microscópio de fluorescência (87). Um resultado é positivo quando se observa uma fluorescência verde brilhante no organelo ou tecido em estudo (Figura 44) (87).

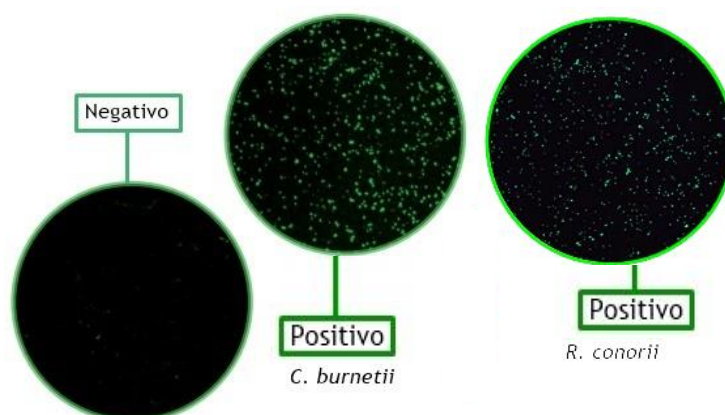
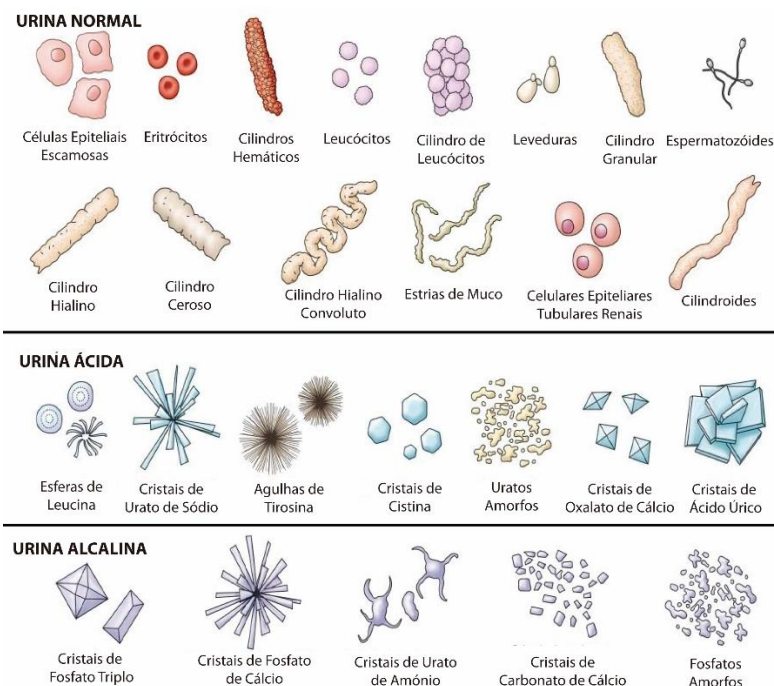


Figura 44. Resultados de microscopia de fluorescência. Nos pacientes com febre Q crónica os títulos anti-fase I superam os anti-fase II. Nos casos de infeção por *R. conorii* só existe um resultado positivo possível. Adaptada de (87).

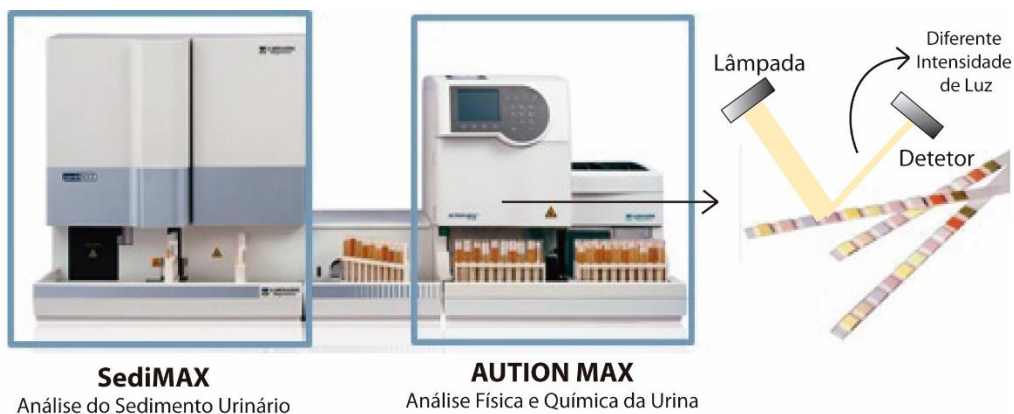
## 6.5. Uranálise

A análise de urina tipo II engloba o exame microscópico do sedimento urinário e o exame físico e químico da urina. O exame microscópico do sedimento urinário normalmente é efetuado de forma automática, no equipamento SediMAX (A. Menarini Diagnostics), cujo funcionamento foi explicado anteriormente (secção de microbiologia). Neste exame microscópico do sedimento urinário (Figura 45), como já foi referido, é possível detetar e identificar elementos figurados presentes na amostra de urina, nomeadamente: leucócitos, eritrócitos, cilindros, células epiteliais, bactérias, leveduras, parasitas e cristais (78).



**Figura 45. Sedimento urinário.** Principais elementos do sedimento urinário de acordo com o pH da urina (88).

O exame físico e químico da urina avalia o valor do pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, sangue, densidade, cor e o aspeto (78). Esta determinação é feita através do uso de tiras de teste, geralmente de forma automática no equipamento AUTION MAX™ (Arkray), pelo método da refletofotometria (Figura 46) (89). Neste método, a luz emitida por uma lâmpada com díodos de emissão de luz, com comprimento de onda e ângulo definidos, incide na superfície das tiras de teste, que contêm quadrados de celulose absorventes e impregnados com substâncias químicas (78). As reações químicas que ocorrem entre a urina e as substâncias químicas da tira produzem uma alteração da cor dos quadrados (78). A luz proveniente das tiras, captada pelo fotodetector, é refletida e diminui de forma proporcional à intensidade da cor produzida (78). Após conversão da luz detetada para valores de refletância, estes são comparados com os intervalos de referência definidos para cada parâmetro e transmitidos de modo semiquantitativo (78). A cor da urina é avaliada com um algoritmo específico contra o branco da tira de teste (78).



**Figura 46. Sistema para uranálise.** Princípio de refletometria, onde as diferentes intensidades de luz detetadas são convertidas em valores de refletância e comparados com os intervalos de referência. Fotografia do aparelho retirada de (89).

## 6.6. Eletroforese de Proteínas

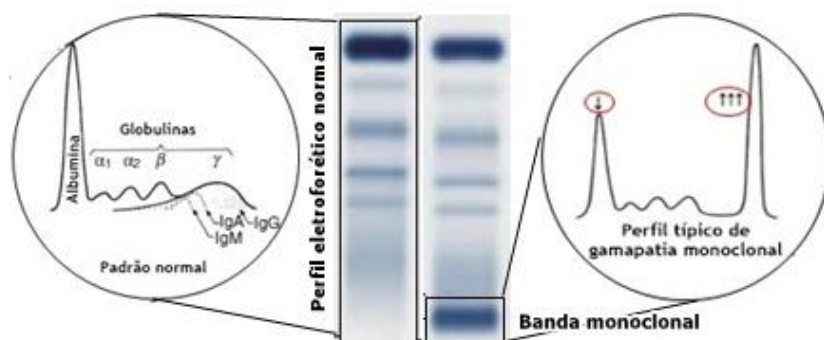
A eletroforese é uma técnica que permite a separação dos componentes de uma solução heterogénea em função das suas propriedades físico-químicas, quando colocados num suporte adequado, neste caso gel de agarose (78). As propriedades anfotéricas do analito são igualmente importantes, visto que este se pode comportar como um ácido ou base, consoante o pH do meio (78). Assim, quando sujeitas a um campo elétrico as proteínas podem migrar do ânodo para o cátodo ou vice-versa, consoante a sua carga e pH do meio (78). O equipamento ASSIST (Sebia), onde é realizada a pipetagem automática das amostras para o pente, e HYDRASIS Focusing (Sebia), onde ocorre a migração e a coloração, são utilizados para realização dos proteinogramas e das imunofixações neste laboratório (Figura 47).



**Figura 47. Aparelhos utilizados para efetuar proteinograma e imunofixação.** (A) ASSIST e (B) HYDRASIS Focusing. Adaptada de (90).

### 6.6.1. Proteinograma

A eletroforese em gel de agarose permite separar frações proteicas, sendo posteriormente coradas pelo negro de amido e medidas por densitometria (78). A partir desta medição é construído um perfil eletroforético, separando cinco frações, por ordem decrescente de mobilidade, como se pode verificar na Figura 48 (78).

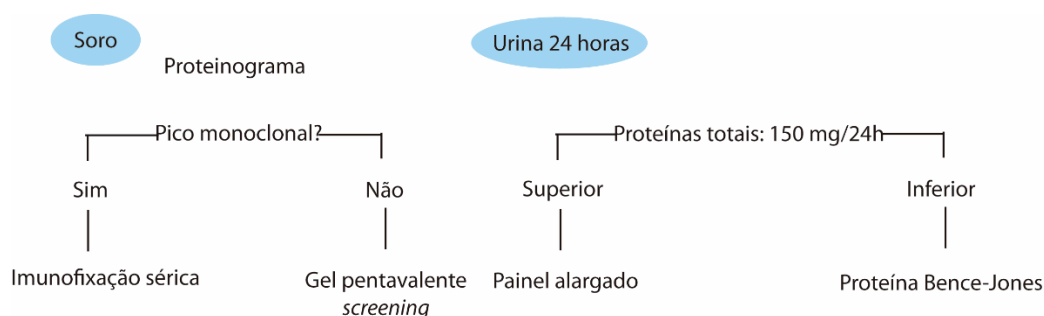


**Figura 48. Perfil eletroforético do proteinograma.** À esquerda perfil normal e à direita perfil típico de uma gamapatia monoclonal. Adaptada de (78).

Por densitometria determina-se a percentagem de cada fração, através da concentração de proteínas totais, previamente analisada, é calculada a concentração das proteínas de cada fração. As proteínas mais representativas em cada fração são as seguintes: (a) fração das α1-globulinas - α1-antitripsina, α1-glicoproteína ácida, α1-fetoproteína e α-lipoproteína; (b) fração das α2-globulinas - α2-macroglobulina, haptoglobina e ceruloplasmina; fração das β-globulinas - transferrina, ferritina, proteínas do complemento C3 e C4 e β-lipoproteína; fração das γ-globulinas - imunoglobulinas (78). Esta análise deve ser feita em soro e nunca em plasma, visto que no plasma existem proteínas da coagulação (como o fibrinogénio) que alteraram o perfil eletroforético. O proteinograma indica o aumento ou diminuição de cada fração e a presença de picos monoclonais, por sua vez a imunofixação permite a caracterização destes picos e das respetivas cadeias.

### 6.6.2. Imunofixação

A imunofixação combina as técnicas de eletroforese e imunoprecipitação, permitindo detetar e identificar as imunoglobulinas monoclonais (marcadores de gamopatias), detetadas na eletroforese das proteínas séricas (78). Existem vários géis de imunofixação neste laboratório, sendo que a sua escolha é baseada no algoritmo representado na Figura 49.



**Figura 49. Algoritmo de escolha do procedimento e gel de imunofixação.**

#### 6.6.2.1. Imunofixação Sérica

Após separação das proteínas por eletroforese, é efetuada a aplicação de anti-soros monoespecíficos e um fixador, diretamente sobre o gel, ao nível das pistas de migração, que se difundem sobre este (78). O fixador precipita todas as proteínas e os anti-soros de

especificidades diferentes - anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM) e anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (livres e ligadas em conjunto) - precipitam os antígenos correspondentes, formando complexos antígeno-anticorpo (78). A coloração das proteínas imunoprecipitadas é feita com violeta ácido, permitindo comparar a posição das bandas imunoprecipitadas com as bandas anómalas. Para identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais deve ser utilizado, paralelamente, um anti-soro poliespecífico de forma a produzir um padrão de referência eletroforético de proteínas (anti-soro de referência) (Figura 50A).

As imunofixações permitem estudar quatro doentes em simultâneo, a cada um é aplicado 6-antisoros já referidos. Nos casos em que o proteinograma não apresenta alterações é efetuada uma imunofixação com um anti-soro pentavalente (todos os anti-soros num só, Figura 50B), como forma de *screening* e confirmação de que não há picos monoclonais.

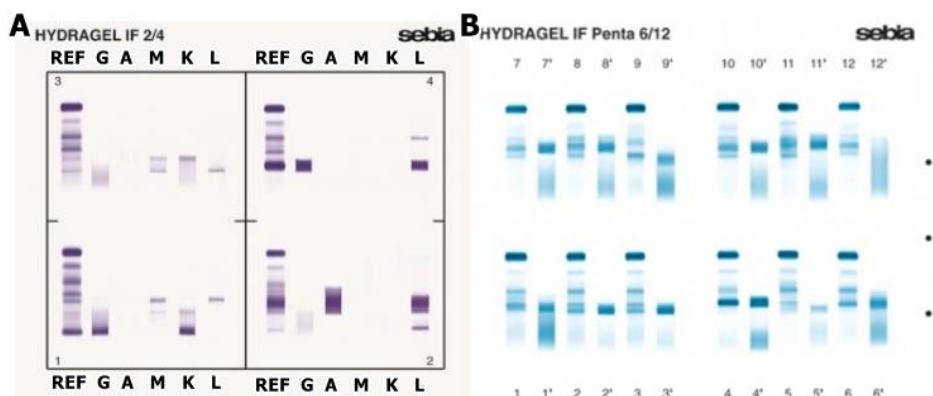


Figura 50. Gel para imunofixação sérica (A) e gel pentavalente (B).

### 6.6.2.2. Imunofixação Urinária

No caso da urina, é necessário ter em atenção o resultado das proteínas totais urinárias (efetuado previamente no cobas® 6000). Assim, existem 2 géis diferentes que se utilizam consoante a proteinúria (cut-off de 150 mg/24 h), quando é superior utiliza-se o gel de perfil urinário (painel alargado (Figura 51), quando é inferior utiliza-se o gel para a proteína de Bence-Jones (Figura 52). Para a análise do perfil urinário, o procedimento é semelhante ao anterior, sendo que o pente, o gel e os anti-soros são adequados à análise. Esta análise é efetuada para identificar as proteínas urinarias, de forma a ajudar na identificação da lesão renal e na identificação de componentes monoclonais na urina.

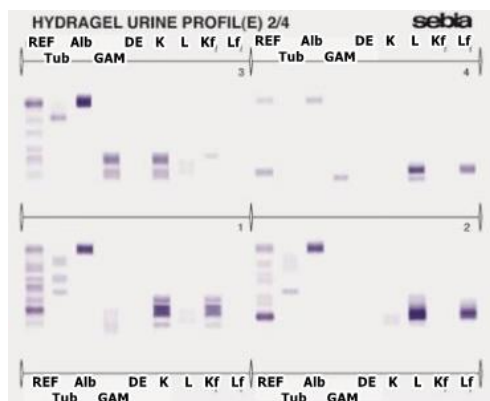


Figura 51. Gel para perfil urinário (painel alargado).

A proteína de Bence-Jones corresponde às cadeias leves livres, sendo que nas discrasias plasmocitárias, esta proteína é produzida em excesso por um único clone de plasmócitos neoplásicos (78). Trata-se de uma proteína de baixo peso molecular com um período de semivida curto, de 2 a 6 horas, sendo rapidamente filtrada pelo glomérulo e posteriormente reabsorvida pelos túbulos proximais, pelo que o seu aparecimento na urina só acontece quando é produzida em grandes quantidades, excedendo a capacidade de metabolização do rim (78). A deteção da proteína de Bence-Jones tem um mau prognóstico, podendo estar associada ao mieloma múltiplo (78). A pesquisa desta proteína pode ser realizada em **soro ou urina 24 horas**, sendo que no caso do soro a amostra deve ser diluída porque a concentração da IgG é muito superior às restantes imunoglobulinas. O gel é semelhante ao de imunofixação sérica, sendo que neste caso o anti-soro anti-cadeias pesadas (IgG, IgA e IgM) agrupa-as e existem 2 anti soros anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$ , um para cadeias livres e outro para cadeias ligadas (Figura 52).

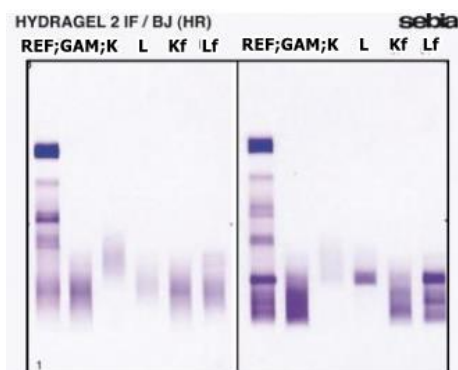


Figura 52. Gel para pesquisa de Bence-Jones. Neste gel podem ser realizados 2 testes em simultâneo, através da utilização de 6 anti-soros diferentes.

## 6.7. Testes Rápidos

### 6.7.1. Teste de *Screening* Para Drogas de Abuso

Este teste (SureStep™) é um imunoenensaio por cromatografia de fluxo lateral para deteção qualitativa de drogas e dos seus metabolitos na urina. Tem como fundamento o princípio da ligação competitiva (Figura 53), sendo que as drogas presentes na urina competem com o respetivo conjugado por locais de ligação ao anticorpo específico para as mesmas (91). Se a droga estiver presente na urina abaixo do respetivo *cut-off*, não satura os locais de ligação do seu anticorpo específico e, assim, o conjugado consegue ligar-se aparecendo uma linha colorida na região de teste (91). Pelo contrário se a concentração da droga for superior ao valor de *cut-off*, consegue saturar os locais de ligação, impedindo assim o aparecimento da linha colorida (91). Para ser válido, o teste tem de apresentar uma linha colorida na região de controlo. Cada teste possui partículas de anticorpo específicas para a droga a testar e os respetivos conjugados. Neste laboratório são testadas as seguintes drogas: anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, canábis e morfina.

### 6.7.2. Teste para Detecção da Gonadotrofina Coriônica Humana

O VISITEC® PREGNANCY é um teste imunocromatográfico qualitativo (92). À medida que a amostra (soro ou urina) flui através da membrana, o conjugado coloidal dourado anti-gonadotrofina coriônica humana (hCG) forma um complexo com a hCG da amostra (Figura 53) (92). Por ação capilar este complexo segue até à linha de teste, onde se liga ao anti-hCG monoclonal aí presente, formando-se uma linha cor-de-rosa que confirma um resultado positivo (92). A ausência desta linha representa um resultado negativo. Para ser válido, o teste tem de apresentar uma linha colorida na região de controlo (92). Este teste possui sensibilidade de 99,6% (concentrações a partir de 10 mU/mL) e especificidade de 99,9% (92).

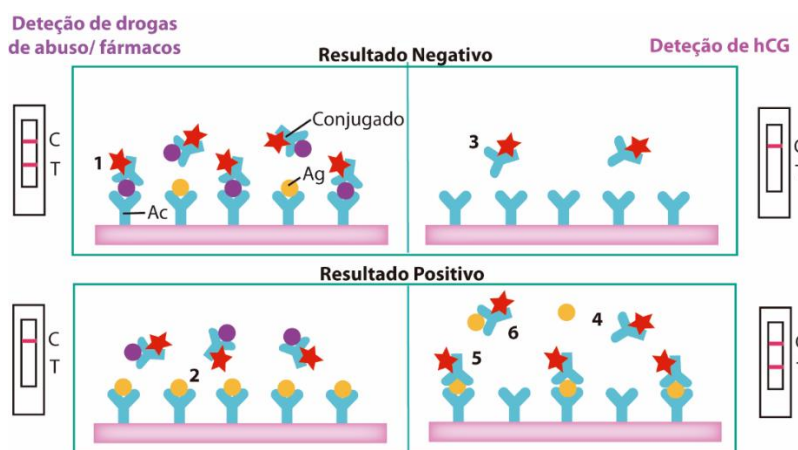


Figura 53. Testes imunocromatográficos realizados no laboratório de imunoquímica. Ac: anticorpo monoclonal anti-analito; Ag: antígeno/analito. 1 - Ligação conjugado-Ac causando o aparecimento da linha de teste (resultado negativo); 2 - Ligação do Ag ao Ac, não aparece a linha de teste (resultado positivo); 3 - Sem Ag, não aparece a linha de teste (resultado negativo); 4 - Ag e conjugado em circulação; 5 - Ligação Ag + conjugado + Ac, aparecimento da linha de teste (resultado positivo); 6 - Ligação Ag + conjugado.

## 7. Laboratório de Hematologia

O Laboratório de hematologia tem como objetivo o diagnóstico e prognóstico de patologias hemato-oncológicas, anemias, hemoglobinopatias, alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas, alterações congénitas e adquiridas da coagulação, doença tromboembólica e doença hemorrágica, entre outras.

### 7.1. Hemograma

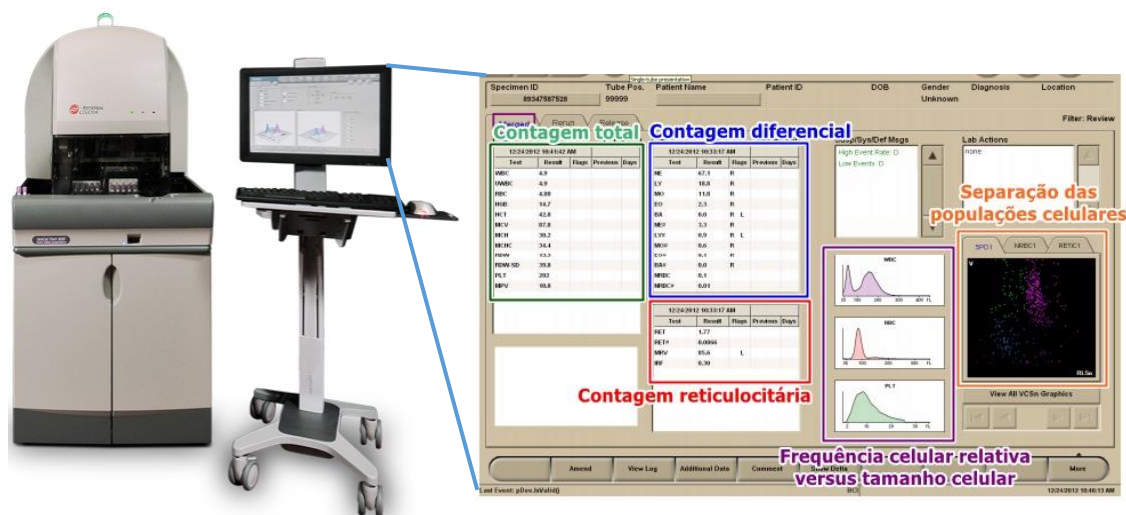
A hematopoiese corresponde ao processo de formação das células sanguíneas e tem início com a produção de células estaminais pluripotentes na medula óssea (93). Estas células dão origem a células progenitoras que, após divisão e diferenciação, formam eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, plaquetas e linfócitos (93). O hemograma é um exame que avalia as células sanguíneas de um paciente, é constituído pela contagem dos leucócitos (total e diferencial), eritrócitos, hemoglobina (Hb), hematócrito, índices hematimétricos, e contagem de plaquetas e reticulócitos (93).

### **7.1.1. Técnica e Fundamento**

O hemograma é efetuado de forma automática em aparelhos que necessitam de pequenas quantidades de sangue. A tecnologia utilizada consiste na medição da dispersão de luz, emitida por um laser de hélio-néon, através de 2 detetores óticos que permitem a sua leitura em 5 ângulos distintos (94). Desta forma, são fornecidos 7 parâmetros de medição celular que valorizam a análise diferencial, eritrócitos nucleados e reticulócitos: **volume** (tamanho celular, impedância), **condutividade** (relação núcleo/citoplasma, densidade nuclear e composição química, em frequência de ondas rádio) e **5 ângulos de dispersão de luz** (94). Estes ângulos consistem na perda de luz axial (**tamanho**) dispersão de luz de baixo ângulo (**estrutura nuclear**), dispersão de luz de ângulo médio, dispersão de luz de ângulo médio-baixo, dispersão de luz de ângulo médio-alto, estes três últimos dão indicação da **complexidade celular e granularidade** (94). Os dados são apresentados em gráficos de duas, três dimensões e de superfície, permitindo assim a discriminação e classificação das populações (94).

A **contagem dos eritrócitos nucleados** é feita num canal específico com correção automática da contagem de leucócitos (94). Uma alíquota da amostra de sangue é diluída e tratada com um reagente de lise que remove seletivamente os eritrócitos normais, mantendo os nucleados, leucócitos e plaquetas (94). O detetor principal para este parâmetro é o de perda de luz axial, pois fornece a medida de luz absorvida pelas células à medida que elas passam através da célula de fluxo e permite a separação destas células de possíveis interferentes (94). Funciona como indicador de tamanho celular, influenciado pela transparência celular (94). Os eritrócitos nucleados e os leucócitos apresentam valores de perda de luz axial diferentes (94). A **contagem completa do sangue** avalia os 3 principais componentes: leucócitos, eritrócitos e plaquetas, dando a contagem e a medição do volume, bem como medição da hemoglobina, utilizando a informação das contagens do tamanho celular para corrigir erros de coincidência (94). A **contagem diferencial do sangue** permite a diferenciação entre os diferentes tipos de leucócitos por tamanho e morfologia celular (94). A **contagem de reticulócitos** é importante para avaliar a produção de eritrócitos, sendo fundamental para o diagnóstico de anemia ou mesmo para monitorizar o seu tratamento (94). Sendo assim, determina-se o número e a percentagem de reticulócitos, a fração de reticulócitos imaturos, o volume reticulocitário médio, bem como outros parâmetros adicionais relacionados com a maturação dos reticulócitos (94). A identificação dos reticulócitos é feita com base na precipitação de RNA residual, utilizando o corante novo azul de metileno (94). A amostra é encaminhada para a célula de fluxo onde é analisado o tamanho, forma e a morfologia celular (94).

Neste laboratório é utilizado o aparelho Unicel DxH 800 (Beckman Coulter, Figura 54), com velocidade de processamento superior a 100 amostras/hora (94).



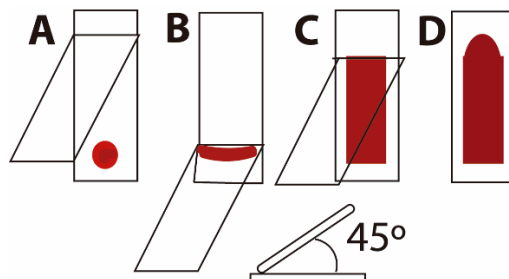
**Figura 54.** Unicel DxH 800. Aparelho utilizado para realização do hemograma e painel de resultados com: contagem total, diferencial, reticulocitária, histogramas (frequência celular relativa versus tamanho celular) e *dotplots* (separação das populações celulares). Fotografia do aparelho retirada de (95).

## 7.2. Análise Microscópica

A análise morfológica ao microscópio é uma componente essencial em hematologia, permitindo efetuar contagens manuais de forma a confirmar as contagens obtidas automaticamente, o que é especialmente útil para descartar falsas trombocitopenias por agregação plaquetar, entre outros artefactos que podem ocorrer nos aparelhos de contagem automática. Além disso, em conjunto com técnicas de coloração adequadas permite identificar características celulares específicas de certas patologias. As amostras utilizadas são sangue periférico (esfregaço), medula óssea (esfregaço) e outros líquidos biológicos (citocentrifugação).

### 7.2.1. Esfregaço Sanguíneo

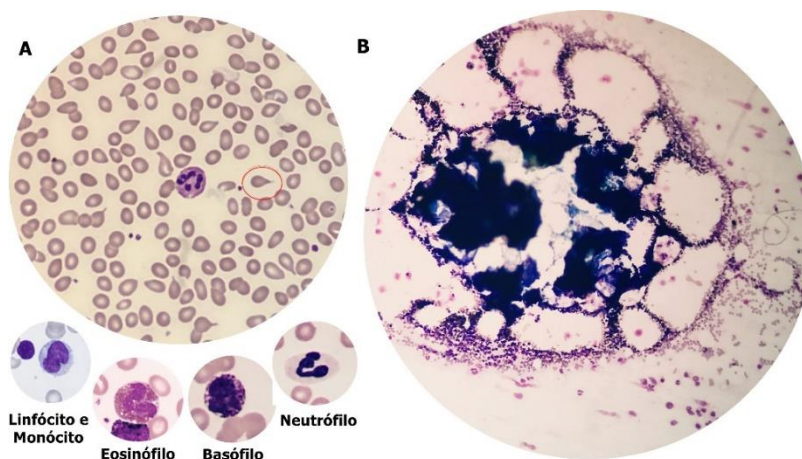
Para a realização do esfregaço sanguíneo (Figura 55) coloca-se uma gota de sangue diretamente sobre uma lâmina de vidro e espalha-se em camada fina pela sua superfície, utilizando a borda de uma lâmina histológica ao longo de outra lâmina, com o objetivo de produzir uma monocamada de células, para observação microscópica após coloração (78).



**Figura 55.** Técnica de esfregaço sanguíneo. A: Gota de sangue na extremidade da lâmina; B: inclina-se a lâmina que promoverá o esfregaço a 45 graus e recua-se; (C, D) promove-se a extensão. O esfregaço ideal deve ter bordas laterais livres e um fim em forma de semicírculo.

### 7.2.2. Coloração de May-Grunwald/Giemsa

Este método consiste na coloração das células por meio de dois corantes contendo eosina e derivados do azul-de-metileno, aplicados sucessivamente (78). O corante de May-Grunwald é uma mistura de eosina (ácida, cora estruturas básicas - acidófilas, eosinófilas) e azul-de-metileno (básico, cora estruturas ácidas - basófilas), que quimicamente se transforma em eosinato de azul-de-metileno (78). O corante Giemsa é uma mistura de azur II (mistura equimolar de azur 1 e azul de metileno) e eosinato de azur II (corante formado pela combinação equimolar de azur 1, azul de metileno e eosina amarelada) (78). Estes dois corantes são utilizados através de um método de coloração mais demorado, em que, após fixação e coloração pelo May Grunwald, se processa uma segunda coloração com solução de Giemsa, obtendo-se um resultado final mais detalhado (78). A coloração May-Grunwald/Giemsa é utilizada principalmente para corar esfregaços de sangue periférico e medula óssea, mas também outros produtos biológicos, como líquidos serosos (Figura 56).



**Figura 56.** Coloração de May-Grunwald/Giemsa em sangue periférico (A) e em medula óssea (B). (A) Círculo vermelho a evidenciar a presença de eritrócitos em gota. Representação dos diferentes tipos de leucócitos visualizados no sangue periférico (linfócito à esquerda e monócito à direita). (B) Grumo medular.

### 7.2.3. Coloração de Perls

A coloração de Perls (Figura 57) serve para avaliar os depósitos de ferro medular constituindo método de referência, permite avaliar as alterações na distribuição (p.e. sobrecargas de ferro ou falta do mesmo) assim como as alterações na utilização do ferro pelos eritroblastos (78). Após reação com o azul de prússia, o ferro iónico ( $Fe^{3+}$ ) do grupo heme reage em solução de ácido clorídrico com o hexacianoferrato (II) de potássio, precipitando sob a forma de sal complexo insolúvel nos eritrócitos e noutras células, localizando esta forma de ferro livre celular. As células da linhagem eritroide imaturas e maduras, que contêm ferro livre, são chamadas sideroblastos e siderócitos, respetivamente (78). Algumas das causas do seu aparecimento são anemias sideroblásticas, envenenamento por chumbo e alcoolismo (78).

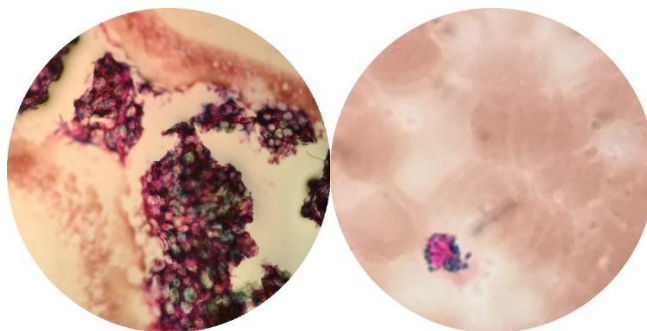


Figura 57. Coloração de Perls (medula óssea). Grumo medular visto ao microscópio (esquerda, ampliação 400x). Célula com aglomerados de ferro (direita).

#### 7.2.4. Coloração da Fosfatase Alcalina

A coloração da fosfatase alcalina (Figura 58) nos leucócitos é utilizada para a determinação citoquímica de uma leucemia mieloide crónica por comparação com outras doenças mieloproliferativas, como a mielofibrose e a policitemia vera, ou processos inflamatórios (reação leucemóide) (78). A fosfatase alcalina catalisa a hidrólise dos estéres fosfóricos em meio alcalino (78). O naftoL-1 é agregado a um sal de diazónio, formando um corante azóico castanho que precipita somente na localização das células com atividade de fosfatase alcalina (78). É importante utilizar uma lâmina de controlo positivo.

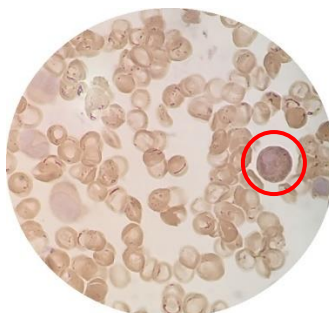


Figura 58. Coloração de fosfatase alcalina (medula óssea). Célula com atividade de fosfatase alcalina evidenciada pelo círculo vermelho.

#### 7.2.5. Teste de Falciformação

A anemia falciforme é uma doença hemolítica hereditária (autossómica recessiva) que se manifesta clinicamente em indivíduos homocigóticos para a mutação na posição 6 da extremidade N-terminal do cromossoma 11, substituindo o ácido glutâmico por valina e dando origem à produção de uma hemoglobina anómala denominada HbS (96). A HbS, em condições de hipoxia, polimeriza e precipita no eritrócito conferindo-lhe formato de foice e contribui em processos inflamatórios, vaso-oclusão, aumento de coagulação e lesão tecidual (96). O hemograma é o primeiro passo do diagnóstico laboratorial, com volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média baixos devido à diminuição nos níveis de hemoglobina em razão da fagocitação eritrocitária das células falciformes (96). O teste de falciformação consiste em colocar os eritrócitos sob baixa concentração de oxigénio, tomando a forma característica de foice, por meio da solução de metabissulfito de sódio a 2% (96). Após adição de metabissulfito ao sangue, a lâmina e a lamela são vedadas por meio de

parafina, verificando-se ao microscópio se a amostra apresenta eritrócitos em forma de foice após 1 hora de incubação a 37 °C. No caso de o resultado ser negativo, a lâmina deve ser visualizada de novo após 24 horas.

### 7.3. Hemoglobina glicada, A<sub>2</sub> e Fetal

Os distúrbios genéticos da hemoglobina são divididos em dois grupos principais: talassémias (deficiência num determinado tipo de cadeia) e estruturais (produzida hemoglobina anormal). Neste laboratório são medidos três parâmetros: hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>), HbA<sub>2</sub> (α2δ2, normalmente 1 a 3% no adulto) e hemoglobina fetal (HbF, α2γ2, 60 a 90% no recém-nascido e <1% após 1 ano) (93). Durante os 90 dias da vida do eritrócito, a hemoglobina vai incorporando glicose, em função da sua concentração no sangue (93), se as taxas de glicose estiverem altas durante esse período, haverá um aumento da HbA<sub>1c</sub> (93). Assim, este teste dá-nos informação sobre a média da concentração de glicose neste período. A determinação da HbA<sub>1c</sub>, além de servir como método de diagnóstico, deve ser realizada rotineiramente em doentes com diabetes *mellitus*, de forma a avaliar o controlo glicémico e quantificar o risco de complicações (93). Para determinação da HbA<sub>1c</sub>, é utilizado o método de referência da federação internacional para química clínica, no qual a hemoglobina é clivada pela enzima endoproteínase Glu-C, e, seguidamente os hexapeptídeos N-terminais glicosados e não-glicosados obtidos são separados (93). A β-talassemia é uma doença onde há deficiência na produção da cadeia β da hemoglobina, em pacientes com esta doença podem-se verificar níveis elevados de HbA<sub>2</sub> e HbF (93).

A técnica utilizada para a separação e quantificação da hemoglobina é a cromatografia líquida de alta eficiência com troca iónica (97). O processo pode-se dividir em três fases: hemólise, separação e deteção (97). As moléculas de hemoglobina são separadas pela interação com a matriz carregada negativamente, através da carga positiva da hemoglobina, a amostra de sangue total é hemolisada pela solução de lavagem e o hemolisado é injetado na coluna (97). As moléculas de hemoglobina ligam-se à matriz hidrofóbica (fase estacionária não polar) e são eluídas com tampão fosfato inorgânico com diferentes forças iónicas (97). Estas diferentes forças iónicas vão fazer com que as diferentes frações de hemoglobina sejam eluídas a tempos diferentes, sendo assim separadas e detetadas por método colorimétrico a 420 e 500 nm (97). Os resultados são apresentados em forma de cromatograma, compostos por picos, tempos de retenção e percentagem das diferentes frações (97). O aparelho utilizado, neste laboratório, para efetuar esta medição é o ADAMS™ A1c HÁ-8180V (ARKRAY, Figura 59).

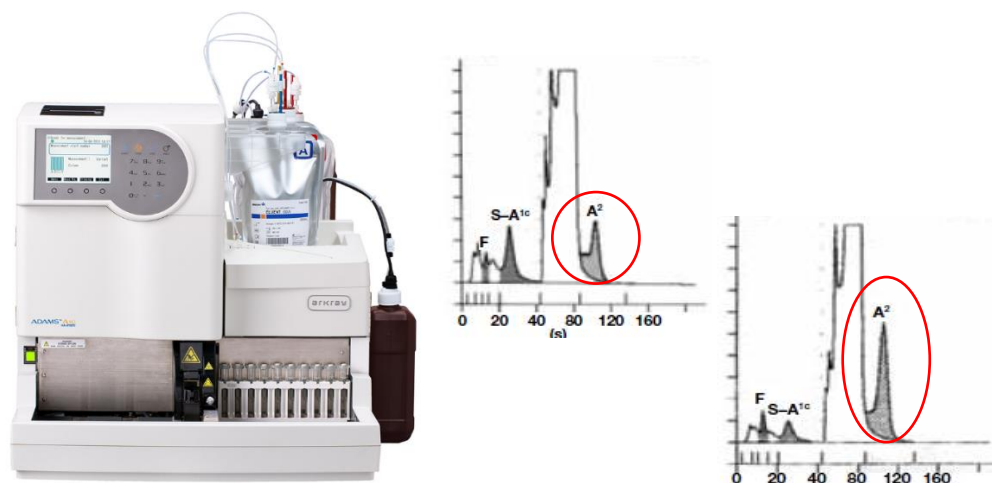


Figura 59. Aparelho ADAMS™ A1c HA-8180V e respetivos resultados. No gráfico de cima está representada uma fração HbA<sub>2</sub> normal e no gráfico abaixo uma fração HbA<sub>2</sub> elevada, sendo este gráfico característico de pacientes com  $\beta$ -talassemia. Fotografia do aparelho retirada de (98).

## 7.4. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de Sedimentação mede a taxa de precipitação dos eritrócitos num dado intervalo de tempo (1 hora) (78). É um teste comumente utilizado para medição não específica da inflamação, é frequentemente o primeiro indicador de doença, quando outros indicadores estão normais (78). Neste laboratório, é medida em tubos S-Sedivette® (anticoagulante citrato de sódio) no aparelho Sediplus® S 2000 (sarstedt, Figura 60). Durante a medição, o prato de medição sobe e desce, medindo o nível de sangue através de diferenças de intensidade de luz entre o sedimento eritrocitário e o sobrenadante, recebidas num detetor posterior ao tubo, efetua medição aos 0 minutos, 30 minutos e 1 hora.



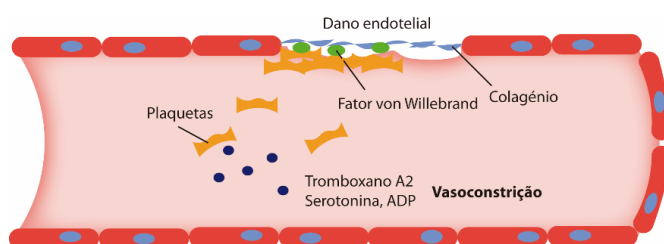
Figura 60. Sediplus® S 2000 (sarstedt). Tubos S-Sedivette® e prato móvel para efetuar medições (99).

## 7.5. Coagulação

O sistema hemostático tem como base o equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes, aliado a um sistema de fibrinólise. Os cinco principais componentes envolvidos são: plaquetas, fatores de coagulação, inibidores de coagulação, fibrinólise e vasos sanguíneos.

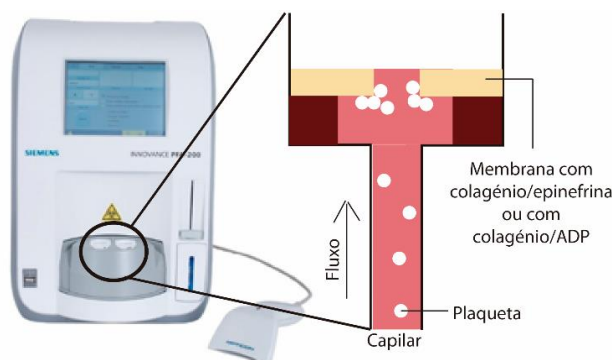
### 7.5.1. Plaquetas

A principal função das plaquetas é a formação de um tampão mecânico durante a resposta hemostática normal à lesão vascular (Figura 61) (93). As glicoproteínas do revestimento da superfície das plaquetas são importantes nas reações de adesão e agregação, sendo estes os eventos iniciais que levam à formação do tampão plaquetar durante o processo de hemostasia (93). A adesão ao colagénio é facilitada pela glicoproteína Ia (93). As glicoproteínas Ib e IIb/IIIa são importantes na ligação das plaquetas ao fator de von Willebrand e em seguida ao endotélio vascular (93). As plaquetas possuem dois tipos de grânulos, os densos, que contêm cálcio, 5-hidroxitriptamina, adenosina difosfato, adenosina trifosfato e serotonina, e os específicos  $\alpha$ , que contêm um antagonista da heparina, fator de crescimento derivado de plaquetas,  $\beta$ -tromboglobulina, fibrinogénio, fator de von Willebrand entre outros (93).



**Figura 61. Hemostase primária.** As plaquetas aderem à zona de dano endotelial, onde se agregam e ativam. Ocorre a libertação de potenciais vasoconstritores presentes nos grânulos destas células.

O exame utilizado neste laboratório é o PFA-200 (analisador de função plaquetar, Figura 62), englobando os testes de agregação plaquetar e os testes de tempo de hemorragia (100). A pressão negativa constante aspira a amostra de sangue periférico com anticoagulante citrato, desde o reservatório para onde a amostra foi pipetada, através dos capilares e da abertura da membrana do cartucho, onde as plaquetas estão sujeitas a tensões de corte elevadas (100). O sangue que circula pelo capilar contacta com uma abertura central da membrana revestida por agonistas plaquetares: colagénio e adenosina difosfato ou colagénio e adrenalina, consoante o cartucho utilizado (100). A presença destes estímulos bioquímicos e as taxas de cisalhamento elevadas resultam na adesão, ativação e agregação plaquetar e na formação de um tampão estável na abertura, diminuindo assim gradualmente o fluxo sanguíneo, parando-o aquando a oclusão completa (100). Considera-se normal o tempo de oclusão até 200 segundos (100).



**Figura 62. Aparelho PFA-200.** Representação dos cartuchos de teste e respetiva localização no aparelho. Fotografia do aparelho retirada de (101).

### 7.5.2. Cascata da Coagulação

O processo de coagulação envolve a ativação sequencial de várias proteínas (**fatores de coagulação**), culminando na formação de **trombina**, que converte o **fibrinogénio** solúvel do plasma em **fibrina** (93). A fibrina infiltra os agregados de plaquetas e converte os tampões primários e instáveis em tampões hemostáticos firmes, definitivos e estáveis (93). É importante que o efeito da trombina seja limitado ao local de lesão, ocorrendo inativação direta da trombina e de outros fatores serina-proteases pela **antitrombina** (93). Esta molécula combina-se com proteínas serina-proteases por meio de ligações peptídicas formando complexos estáveis de alto peso molecular (93). A **heparina** potencializa muito a sua ação. A trombina liga-se no recetor trombomodulina da superfície da célula endotelial (93). O complexo resultante ativa a serina-protease **proteína C**, dependente da vitamina K, capaz de destruir os fatores V e VIII ativados, impedindo assim mais geração de trombina (93). A ação da proteína C é amplificada por outra proteína dependente da vitamina K, a **proteína S**, que liga a proteína C na superfície da plaqueta (93). Além disso, a proteína C ativada aumenta a fibrinólise, que consiste na dissolução de coágulos de fibrina pela ativação do plasminogénio em plasmina (93).

Os testes de função hemostática incluem o **tempo de trombina**, **tempo de protrombina**, **tempo de tromboplastina parcial ativada** e doseamentos específicos de **fatores de coagulação** e do **fator de von Willebrand**. O aparelho utilizado para efetuar estas medições neste laboratório é o ACL TOP (Instrumentation Laboratory, Figura 63). Para isso, utiliza três técnicas diferentes: coagulométrica (turbidimetria), cromogénica (absorvância) e imunológica. Para os testes de coagulação o sangue em citrato de sódio é centrifugado (3000 rpm, 10 minutos), de forma a obter plasma. Os principais testes efetuados estão representados na Tabela 10.

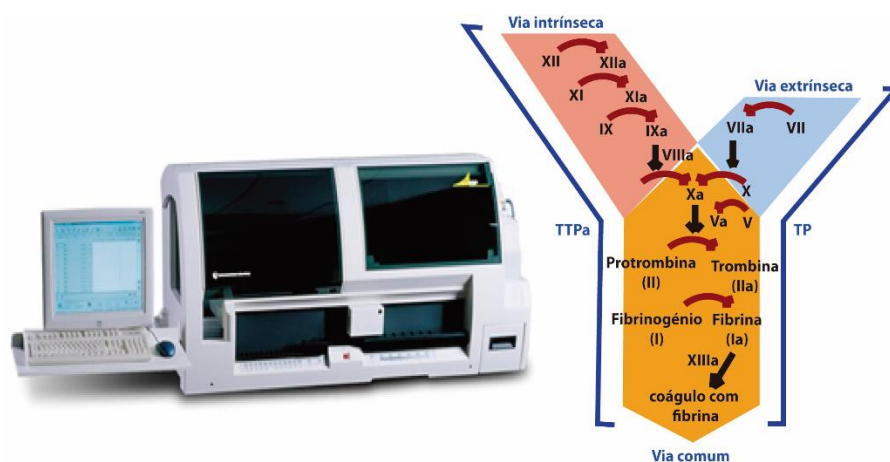


Figura 63. Aparelho ACL TOP e hemostase secundária. Cascata da coagulação: via extrínseca, intrínseca, comum e fatores de coagulação intervenientes nas diferentes vias. TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada. Fotografia do aparelho retirada de (102).

O princípio da **deteção coagulométrica** é utilizado para medir a quantidade de tempo necessária para ocorrer coagulação plasmática (102). A deteção do coágulo é baseada no princípio de que a luz ao passar por um meio onde o fibrinogénio é convertido em fibrina é absorvida pelos filamentos de fibrina (102). A luz (671 nm) é transmitida através da amostra para um fotodetector que está posicionado a 180° da fonte incidente, sendo que a absorção de luz aumenta com o aumento da formação do coágulo de fibrina (102). Consequentemente, a transmitância através da amostra diminui continuamente e é medida pelo fotodetector (102). O sinal output elétrico enviado pelo fotodetector altera-se de acordo com a luz detetada, sendo processado via *software* através de uma série de algoritmos para determinação do ponto de formação de coágulo (102).

No caso da **medição cromogénica**, esta pode ser direta, sendo que o analito de interesse atua diretamente num substrato sintético específico, ou indireta, onde o analito de interesse reage com uma quantidade fixa de enzima para formar complexos inativos (102). Neste último, sob condições de teste otimizadas, a atividade enzimática residual é medida utilizando um substrato sintético específico (102). Os resultados são monitorizados a 405 nm pela libertação contínua de pNA do substrato sintético (102). Os canais cromogénicos utilizam o princípio colorimétrico para medição de absorvâncias na cuvette através de um sensor ótico que lê a luz (405 nm) que atravessa a cuvette (102). A luz é absorvida pela solução na cuvette de forma diretamente proporcional à concentração de pNA (102). Por fim, a quantidade de luz que atinge o fotodetector é convertida num sinal elétrico que é proporcional à atividade enzimática (102).

A **medição imunológica** traduz a concentração física do analito e não a sua atividade, medindo alterações na densidade ótica (102). Apesar de similar ao método turbidimétrico, o método imunológico tem como fundamento a formação de complexos antigénio-anticorpo que interferem com a transmissão de luz (405 ou 671 nm, dependendo do teste e da formulação do reagente) (102). Um sensor ótico mede a luz que passa pela *cuvette*, esta é absorvida pela solução numa proporção direta às quantidades de complexos antigénio-anticorpo (102). A quantidade de luz que atinge o fotodetector é convertida em sinal elétrico que é direta ou inversamente proporcional à concentração do analito (102).

**Tabela 10. Testes efetuados, respetiva função e patologias/alterações associadas.** Na Tabela não constam os fatores de coagulação.

Teste	Função	Patologias/Alterações Associadas
PT	- Via extrínseca da coagulação - Controlo da terapia anticoagulante oral	- Deficiência de fatores VII, X, V, II - Insuficiência Hepática - Hipovitaminose K - Doença hemorrágica do recém-nascido e prematuridade - Síndrome de má absorção - Presença de inibidores (heparina e terapia anticoagulante oral, pela sensibilidade ao fator VII)
APTT	- Via intrínseca da coagulação - Monitorização da terapia anticoagulante com heparina	- Deficiência de fatores XII, XI, X, IX, V, II e fibrinogénio - Doenças hepáticas - Hipovitaminose K - Presença de inibidores (heparina)
TT		- Deficiência ou anomalia de fibrinogénio ou inibição da trombina por heparina - Coagulação intravascular disseminada
D-D	- Detecção dos produtos de degradação da ação da plasmina sobre os coágulos de fibrina	- Situações de coagulação intravascular disseminada (CID) - Fibrinólise primária
Proteína C	- Inibidor fisiológico da coagulação	- Trombose venosa recorrente - Hepatopatias - Terapia anticoagulante oral - CID
Proteína S	- Cofator da proteína C ativada aumentando os seus efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos	- Insuficiências hepáticas - Síndromes nefróticas - 3º trimestre de gravidez - Recém-nascidos - Terapêutica anticoagulante oral (TAO) - Doenças trombembólicas
Anti-Lúpico	- Interfere com as provas de coagulação em que participam os fosfolípidos, tais como o TTPA.	- Indicados em doentes que tenham um TTPA prolongado sem causa conhecida. - Doentes com AL têm maior probabilidade de sofrer manifestações trombóticas e abortos de repetição
AT	- Principal inibidor fisiológico da coagulação - Essencial para que a terapia anti-coagulante com a heparina seja eficiente	- Paciente com trombofilia - Estados pré-operatórios - CID - Síndromes nefróticas - Hepatopatias - Terapia com Heparina
FvW Ag	- Promove a adesão das plaquetas ao endotélio lesado - Responsável pelo transporte do fator VIII	- Doença de von Willbrand (doença hemorrágica hereditária autossómica dominante)

PT: tempo de protrombina; APTT: Tempo de tromboplastina ativada; TT: tempo de trombina; D-D: D-dímeros; AT: antitrombina.

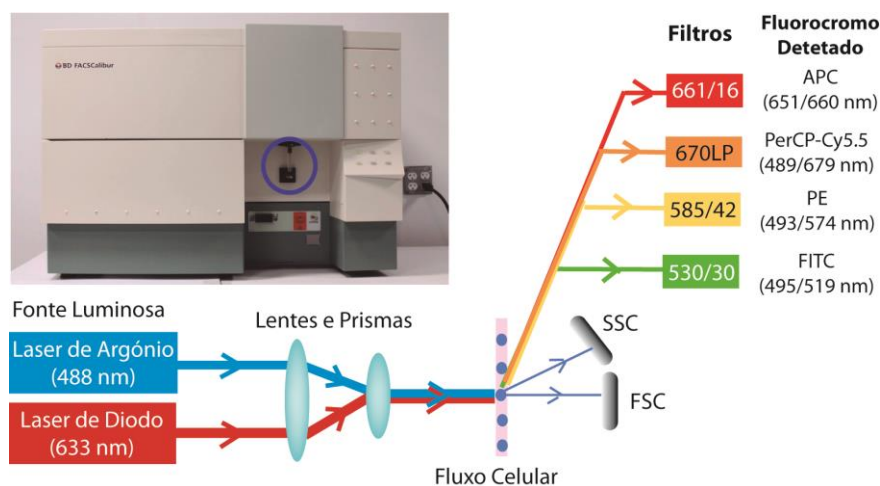
## 7.6. Trombofilia

Existe uma associação entre mutações do Fator II (G20210A) e do Fator V Leiden (G1691A) e o aumento do risco de trombose venosa (103). A mutação do Fator II refere-se à transição de guanina para adenina no nucleótido 20210 na região 3' não transcrita do gene e está associada a níveis plasmáticos de protrombina aumentados (103). O Fator V Leiden (G1691A) refere-se à transição de guanina para adenina na posição do nucleótido 1691 do gene do Fator V, resultando na substituição do aminoácido arginina por glutamina na proteína do Fator V, causando resistência à clivagem pela Proteína C ativada (103). Neste laboratório é utilizado um sistema de PCR em tempo real automatizado (GeneXpert®, funcionamento explicado na

secção de microbiologia) para deteção destas mutações, sendo utilizado sangue periférico em K3-EDTA ou citrato de sódio.

## 7.7. Citometria de Fluxo

A CMF é uma técnica multiparamétrica que avalia as propriedades intrínsecas e a expressão de proteínas em partículas biológicas numa suspensão (104). Apesar das diferentes aplicações, esta técnica tem como base três passos principais: preparação da amostra, a aquisição e a análise de dados (104). Sendo que o painel de anticorpos utilizado em cada análise deve ser ajustado à suspeita clínica que se quer estudar. Assim, à amostra, que contém as células a estudar (antígenos específicos), são adicionados anticorpos monoclonais específicos para esses antígenos, marcados com fluorocromos (104). Os componentes básicos do citómetro de fluxo estão representados na Figura 64.



**Figura 64. Aparelho FACSCalibur™ (Becton Dickinson) e principais componentes.** Fonte de iluminação (lasers), sistema de fluídos (fluxo célula-a-célula) e os fotodetetores (refração frontal - FSC, refração lateral - SSC e canais fluorescentes). O FSC dá indicação do tamanho celular, sendo que quando a célula tem dimensões reduzidas é detetada mais luz e quando a célula é maior acontece o inverso. O SSC, por sua vez, dá indicação da complexidade interna, sendo que quanto menos complexidade menos refração ocorre e vice-versa. Os fluorocromos presentes nos anticorpos que se ligaram aos antígenos das células absorvem a radiação proveniente do laser, e de seguida emitem radiação em comprimentos de onda específicos. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: piceoeritrina; PerCP-Cy5.5: proteína peridinina-clorofila; APC: alofocianina.

Os sinais luminosos amplificados e convertidos em pulsos elétricos pelos detetores são então medidos e sofrem uma conversão analógica-digital (104). Os sinais digitalizados são processados por analisadores sendo possível a sua acumulação em sinais em tempo real, sob a forma de histogramas mono ou biparamétricos, que são visualizados no monitor do computador (104). Na análise de dados é utilizada uma janela onde as células com características semelhantes são agrupadas, permitindo o isolamento e análise dessa população celular (104). O computador elabora gráficos e histogramas, divididos em regiões de parâmetros de fluorescência denominadas FL1, FL2, FL3, etc., que possibilitam a análise de populações celulares diferentes dentro de uma mesma amostra, através da marcação com fluorocromos distintos (104).

Uma das várias aplicações da CMF são os estudos hematológicos, servindo como meio de diagnóstico, seguimento e monitorização de doença residual mínima. A imunofenotipagem é atualmente uma ferramenta indispensável para o diagnóstico hematopatológico, consistindo no estudo do perfil leucocitário, permite identificar diferentes populações linfocitárias, dando informação sobre a sua percentagem relativa e características.

#### **Estudo de Populações Linfocitárias**

Este estudo, realizado em sangue periférico, permite saber o número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, B e células NK. Nesta análise são utilizados tubos trucount™, que possuem um número específico de esferas, permitindo ao *software* extrapolar automaticamente o número absoluto de células presentes na amostra. É útil no seguimento de doentes portadores do vírus da imunodeficiência humana, vírus este que tem tropismo para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (78).

#### **Estudo de Doenças Linfoproliferativas**

As doenças linfoproliferativas, tal como o nome indica, consistem na proliferação anormal dos linfócitos, estando mais comumente associadas aos linfócitos B (78). Esta análise foca-se no estudo da percentagem relativa e características dos linfócitos B e T e é efetuada quando a suspeita clínica (mieloma múltiplo, leucemia, p.e.) ou os resultados do hemograma (linfocitose) o justificam. As amostras mais frequentemente analisadas são sangue periférico, adenopatias, medula óssea, entre outras.

#### **Estudo de Gamopatias Monoclonais**

As gamopatias monoclonais estão associadas à proliferação monoclonal de plasmócitos e caracterizam-se pela existência de uma imunoglobulina clonal no soro/urina (78). Nestes casos a amostra mais utilizada é a medula óssea, sendo que o painel de anticorpos monoclonais utilizado permite estudar os plasmócitos e as suas características, sendo de grande importância o estudo da proporção de cadeias leves kappa e lambda, de forma a identificar populações de plasmócitos monoclonais.

#### **Estudo da Hemoglobinúria Paroxística Noturna**

Trata-se de uma doença adquirida, clonal e rara das células estaminais da medula óssea na qual há deficiência na síntese da âncora de glicosil-fosfatidil-inositol, uma estrutura que liga várias proteínas de superfície na membrana celular (93). Resulta de mutações num gene do cromossoma X que têm como resultado a perda das proteínas ligadas (CD55 e CD59) à superfície celular de todas as células derivadas da célula estaminal anormal, o que torna os eritrócitos sensíveis à lise por complemento, resultando em hemólise intravascular crónica (93). Nesta análise, efetuada em sangue periférico, pesquisa-se a perda total ou parcial destas proteínas. Também ocorre perda de CD55 e CD59 em leucócitos, sendo que o estudo é também efetuado nestas células. Esta última abordagem permite a deteção da perda destas proteínas mesmo em períodos de crise hemolítica (destruição eritrocitária).

### **Controlo de Desleucocitação**

Neste laboratório são recebidos concentrados plaquetares provenientes do serviço de sangue, para se verificar se a remoção leucocitária foi devidamente efetuada. Para isso são utilizados tubos truocount™, que como já foi referido permitem obter valores de contagem absoluta, iodeto de propídeo e RNase. O iodeto de propídeo intercala as bases do DNA, marcando somente os leucócitos, sendo que as plaquetas não possuem este ácido nucleico. Ao emitir fluorescência em FL2, o iodeto de propídeo é detetável por CMF, permitindo quantificar os leucócitos presentes na amostra.

## **V - Conclusão e Balanço Final da Aprendizagem**

A realização deste estágio foi um importante e determinante complemento de toda a formação adquirida ao longo do mestrado em bioquímica, apresentando-se como uma ferramenta única de aperfeiçoamento das técnicas e dos procedimentos teóricos aprendidos.

A experiência adquirida foi bastante rica e ampla, fruto das boas condições de trabalho e da oportunidade de contactar com uma considerável diversidade de metodologias e com profissionais experientes. A principal limitação foi a adaptação inicial a cada secção, o que devido à disponibilidade, recetividade e capacidade pedagógica dos vários colaboradores do serviço foi rapidamente ultrapassado.

Este estágio sensibilizou-me para a responsabilidade que o SPC tem em assegurar a qualidade de todo o processo analítico, sempre com espírito crítico. O balanço que faço de todo o estágio é muito positivo, pois constituiu uma fase de grande crescimento para a minha formação quer pessoal, quer profissional, pelo que considero ter superado os desafios através de um questionamento sistemático do meu trabalho, numa postura autocrítica e de autoformação.

Em suma, considero ter atingido os objetivos propostos para este estágio, através do desenvolvimento de competências profissionais proporcionado pelo contacto com as áreas mais importantes de um laboratório de patologia clínica.

## VI - Referências Bibliográficas

1. Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira. Disponível em: <http://www.chcbeira.pt/>  
Consultado a: 08/01/2019.
2. Cruvinel W, Júnior D, Araújo J, Catelan T, Souza A, Silva N, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(4):434-61.
3. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Cruvinel WdM, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras de Reumatol.* 2010;50(5):552-80.
4. Smith KG, Kamdar AA, Stark JM. Lung Defenses: Intrinsic, Innate, and Adaptive. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children: Elsevier;* 2019. p. 120-33.
5. Ochs M, O'Brodovich H. The structural and physiologic basis of respiratory disease. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children: Elsevier;* 2019. p. 63-100.
6. Baughman R. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 2007;28(05):475-85.
7. Wood R. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in pediatric patients. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children: Elsevier;* 2019. p. 134-46.
8. Silveira P, Palmares M, Delgado L. Lavagem broncoalveolar: metodologia e aplicação clínica. *Rev Port Pneumol.* 1997;3(2):155-78.
9. Gharsalli H, Mlika M, Sahnoun I, Maalej S, Leila D, El Mezni F. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: a clinicopathological perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology.* 2018.
10. Meyer K, Raghu G, Baughman R, Brown K, Costabel U, du Bois R, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(9):1004-14.
11. Jones N, Mochizuki M. Sarcoidosis: epidemiology and clinical features. *Ocul Immunol Inflamm.* 2010;18(2):72-9.
12. Heinle R, Chang C. Diagnostic criteria for sarcoidosis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):383-7.
13. Winterbauer R, Lammert J, Sellami M, Wu R, Corley D, Springmeyer S. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest.* 1993;104(2):352-61.
14. Serrano S, Juan J, Izquierdo L, Rodríguez I, Becerra E, Panadero F. Radiographic staging and bronchoalveolar lavage cell counts in sarcoidosis. *Arch Bronconeumol.* 2005;41(8):425-9.
15. King Jr T, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet.* 2011;378(9807):1949-61.
16. Aburto M, Herráez I, Iturbe D, Jiménez-Romero A. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis: Differential diagnosis. *Med Sci.* 2018;6(3):73-93.
17. Costa T, Rodrigues C, Arrobas A. Alveolite alérgica extrínseca com expressão imunológica atípica. *Rev Port Pneumol.* 2009;15(2):313-8.
18. Vasakova M, Morell F, Walsh S, Leslie K, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: perspectives in diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(6):680-9.
19. Longo D, Fauci A. *Harrisons manual of medicine: McGraw Hill Professional;* 2012.

20. Rutgers S, Timens W, Kaufmann H, van der Mark T, Koeter G, Postma D. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J.* 2000;15(1):109-15.
21. Löfdahl J, Cederlund K, Nathell L, Eklund A, Sköld C. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J.* 2005;25(2):275-81.
22. McCracken J, Veeranki S, Ameredes B, Calhoun W. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. *Jama.* 2017;318(3):279-90.
23. Ström J, Pourazar J, Linder R, Blomberg A, Lindberg A, Bucht A, et al. Cytotoxic lymphocytes in COPD airways: increased NK cells associated with disease, iNKT and NKT-like cells with current smoking. *Respir Res.* 2018;19(1):244-54.
24. Heron M, Grutters J, ten Dam-Molenkamp K, Hijdra D, van Heugten-Roeling A, Claessen A, et al. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(3):523-31.
25. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Resp J.* 1994;7(10):1865-70.
26. Meyer KC, Soergel P. Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung. *Thorax.* 1999;54(8):697-700.
27. Fuseini H, Newcomb D. Mechanisms driving gender differences in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(3):19.
28. Forsslund H, Yang M, Mikko M, Karimi R, Nyrén S, Engvall B, et al. Gender differences in the T-cell profiles of the airways in COPD patients associated with clinical phenotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017;12:35-48.
29. Rudd J, Pulavendran S, Ashar H, Ritchey J, Snider T, Malayer J, et al. Neutrophils induce a novel chemokine receptors repertoire during influenza pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:108-20.
30. Letsiou E, Alves GT, Felten M, Mueller-Redetzky H, Mitchell T, Witzernath M. Neutrophils produce microvesicles in pneumococcal pneumonia. *Eur Respir Soc;* 2017.
31. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, et al. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1698-704.
32. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Hoogsteden H, van den Bosch J. Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile: a study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest.* 1993;104(3):795-800.
33. Kantrow S, Meyer K, Kidd P, Raghu G. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1997;10(12):2716-21.
34. Sidhu S, Brar S, Remakus C, Miller J, Santelli E. BALF CD103+ CD4+/CD4+ ratio alone is enough to support the diagnosis of sarcoidosis in an appropriate clinicopathologic setting. *Respir Med.* 2016;119:10-2.
35. Kolopp-Sarda M, Kohler C, De March A, Béné M, Faure G. Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. *Lab Invest.* 2000;80(7):1065.
36. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 2007;28(5):486-95.
37. O'Shaughnessy T, Ansari T, Barnes N, Jeffery P. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(3):852-7.

38. Saltini C, Kirby M, Trapnell B, Tamura N, Crystal R. Biased accumulation of T lymphocytes with "memory"-type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung. *J Exp Med*. 1990;171(4):1123-40.
39. Trejo Bittar H, Yousem S, Wenzel S. Pathobiology of severe asthma. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:511-45.
40. Manni M, Trudeau J, Scheller E, Mandalapu S, Elloso M, Kolls J, et al. The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1186-98.
41. Schweitzer M, Salamo O, Urdaneta G, Baghaei P, Candelario R, Campos M, et al. Gender Disparity Manifestations in Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197.
42. Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Gender Med*. 2007;4:S133-S46.
43. Costabel U, Guzman J. Effect of smoking on bronchoalveolar lavage constituents. *Eur Respir J*. 1992;5(7):776-9.
44. Costabel U, Bross K, Reuter C, Rühle K-H, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers: a phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*. 1986;90(1):39-44.
45. Galati D, De Martino M, Trotta A, Rea G, Bruzzese D, Cicchitto G, et al. Peripheral depletion of NK cells and imbalance of the Treg/Th17 axis in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Cytokine*. 2014;66(2):119-26.
46. Kumar P, Thakar M, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol*. 2013;6(1):69.
47. O'donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006;61(5):448-54.
48. Urbanowicz R, Lamb J, Todd I, Corne J, Fairclough L. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res*. 2010;11(1):76-85.
49. Meyer E, DeKruyff R, Umetsu D. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med*. 2008;59:281-92.
50. Weinberges S, Kelman J, Elson N, Young R, Reynolds H, Fulmer J, et al. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Ann Int Med*. 1978;89:459-66.
51. Bonella F, Ohshimo S, Bauer P, Guzman J, Costabel U. Bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Monogr*. 2010(48):59-72.
52. Roche. Analisador cobas® série 6000. Manual do Operador.
53. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical microbiology*: Elsevier; 2015.
54. Biomérieux. Meios de cultura convencionais. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais> Consultado a: 25/11/2018.
55. BD Biosciences. BBL™ Cooked Meat Medium. Disponível em: [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007448\(12\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007448(12).pdf) Consultado a: 25/11/2018.
56. Thermo-Fisher. Todd Hewitt Broth. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/IFU64840.pdf> Consultado a: 25/11/2018.
57. Knox R, Gell P, Pollock M. Selective media for organisms of the Salmonella group. *J Pathol Bacteriol*. 1942;54(4):469-83.
58. Thorpe T, Wilson M, Turner J, DiGuseppi J, Willert M, Mirrett S, et al. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol*. 1990;28(7):1608-12.

59. Tessari A, Osti N, Scarin M. Screening of presumptive urinary tract infections by the automated urine sediment analyser sediMAX. Clin Chem Lab Med. 2015;53(2):1503-8.
60. Tenorio-Abreu A, Gil-Tomas J, Martínez-Macías O, Colomina-Rodríguez J. Comparison between 2 parasite concentration techniques (Copropack versus Mini Parasep Solvent Free). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(5):347-52.
61. Vidia. Crypto-Giardia Test. Disponível em: [https://www.vidia.cz/en/images/stories/Navody\\_NOVA\\_ADRESA\\_EN/EN\\_Crypto-Giardia\\_blister\\_04-2015.pdf](https://www.vidia.cz/en/images/stories/Navody_NOVA_ADRESA_EN/EN_Crypto-Giardia_blister_04-2015.pdf) Consultado a: 20/11/2018.
62. Certest. Rotavírus+Adenovírus. Disponível em: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2014/10/IU-XR88V.pdf> Consultado a: 20/11/2018.
63. R-Biopharm. RIDA®QUICK Norovirus. Disponível em: [https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2013/04/N1402\\_RIDAQUICK-Norovirus-12-10-26\\_GB.pdf](https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2013/04/N1402_RIDAQUICK-Norovirus-12-10-26_GB.pdf) Consultado a: 20/11/2018.
64. Certest. Clostridium difficile Toxin A+B. Disponível em: <https://www.certest.es/wp-content/uploads/2014/10/IU-CD88V.pdf> Consultado a: 20/11/2018.
65. Corisbio. Pylori-Strip. Disponível em: <http://www.corisbio.com/pdf/Products/Coris-Pylori-Strip-Helicobacter-Pylori-Diagnostic.pdf> Consultada a: 20/11/2018.
66. Biogate Labs. One Step Fecal Occult Blood Rapid Test. Disponível em: [http://www.biogatelab.com/uploads/3/4/4/1/34413460/\\_fob\\_cassette.pdf](http://www.biogatelab.com/uploads/3/4/4/1/34413460/_fob_cassette.pdf) Consultado a: 20/11/2018.
67. Ruiz-Mesa J, Sanchez-Gonzalez J, Reguera J, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero J. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect. 2005;11(3):221-5.
68. Olopoenia L, King A. Widal agglutination test- 100 years later: still plagued by controversy. Postgrad Med J. 2000;76(892):80-4.
69. Ulrich M, Christensen D, Coyne S, Craw P, Henchal E, Sakai S, et al. Evaluation of the Cepheid GeneXpert® system for detecting Bacillus anthracis. J App Microbiol. 2006;100(5):1011-6.
70. Cepheid. Xpert® MTB/RIF. Disponível em: <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/critical-infectious-diseases/xpert-mtb-rif> Consultado a: 29/11/2018.
71. Cepheid. Xpert® Carba-R. Disponível em: <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r> Consultado a: 29/11/2018.
72. Wassenberg M, Kluytmans J, Erdkamp S, Bosboom R, Buiting A, van Elzakker E, et al. Costs and benefits of rapid screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage in intensive care units: a prospective multicenter study. Crit Care. 2012;16(1):22-30.
73. Cepheid. Xpert® CT/NG. Disponível em: <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/sexual-health/xpert-ct-ng> Consultado a: 29/11/2018.
74. Bio-Rad. Diagnóstico Presumível De Streptococcus pneumoniae. Disponível em: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/2/pt/53852\\_10\\_2010\\_BRPT.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/2/pt/53852_10_2010_BRPT.pdf) Consultado a: 25/11/2018.
75. McGill K, Kelly L, Madden R, Moran L, Carroll C, O'Leary A, et al. Comparison of disc diffusion and epsilometer (E-test) testing techniques to determine antimicrobial susceptibility of Campylobacter isolates of food and human clinical origin. J Microbiol Methods. 2009;79(2):238-41.
76. Biomérieux. VITEK® 2 Compact. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/microbiologia-industrial/industria-biofarmaceutica/vitekr-2-compact?dest=view>

Consultado a: 07/12/2018.

77. Abbott. Architect-i2000SR. Disponível em: <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect/architect-i2000SR> Consultado a: 14/02/2019.
78. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods: Elsevier; 2017.
79. Phadia. ImmunoCAP Total IgE. Disponível em: <http://www.phadia.com/pt-BR/Produtos/Produtos/ImmunoCAP-Ensaios/ImmunoCAP-Total-IgE/> Consultado a: 25/01/2019.
80. Phadia. ImmunoCAP Specific IgE. Disponível em: <http://www.phadia.com/pt-BR/Produtos/Produtos/ImmunoCAP-Ensaios/ImmunoCAP-Specific-IgE/> Consultado a: 20/01/2019.
81. Konikoff M, Denson L. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(6):524-34.
82. Phadia. Doença Celíaca/Outras Doenças Gastrointestinais. Disponível em: <http://www.phadia.com/pt-PT/5/Testes/Doenca-CeliacaOutras-Doencas-Gastrointestinais/> Consultado a: 25/02/2019.
83. Roche Diagnostics. MagNA Pure Compact System. Disponível em: <https://lifescience.roche.com/documents/MagNA-Pure-Compact-System-Versatile-Nucleic-Acid-Purification.pdf> Consultado a: 05/03/2019.
84. Bio-Rad. CFX96 Touch Real-Time PCR. Disponível em: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6093.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6093.pdf) Consultado a: 05/03/2019.
85. Roche. Analisador cobas® série 4800. Manual do Operador.
86. Roche Diagnostics. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test. Disponível em: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf6/P060030c.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf6/P060030c.pdf) Consultado a: 05/03/2019.
87. Vircell. Disponível em: [https://www.vircell.com/media/filer\\_public/aa/b1/aab166bd-e8e6-4e89-9170-6cc8de8f43d2/vircell\\_ifa\\_es.pdf](https://www.vircell.com/media/filer_public/aa/b1/aab166bd-e8e6-4e89-9170-6cc8de8f43d2/vircell_ifa_es.pdf) Consultado a: 13/03/2019.
88. Palmer B. Abordagem do paciente com doença renal. Disponível em: [http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4822/abordagem\\_do\\_paciente\\_com\\_doenca\\_renal\\_%E2%80%93\\_biff\\_f\\_palmer\\_md\\_facp.htm](http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4822/abordagem_do_paciente_com_doenca_renal_%E2%80%93_biff_f_palmer_md_facp.htm) Consultado a: 13/03/2019.
89. A. Menarini Diagnostics. SediMAX e AutionMAX. Disponível em: <http://www.en.menarinidiag.pt/Products/Urine-Sediment/sediMAX-and-Aution-MAX> Consultado a: 13/03/2019.
90. Sebia. Disponível em: <https://www.sebia.com/> Consultado a: 13/03/2019.
91. Hawks R, Chiang C. Urine testing for drugs of abuse: National Institute on Drug Abuse; 1986.
92. Omega Diagnostics. VISITECT PREGNANCY- Disponível em: <http://www.omegadiagnostics.com/portals/0/english11.pdf> Consultado a: 06/03/2019.
93. Hoffbrand A, Moss P. Hoffbrand's essential haematology: John Wiley & Sons; 2015.
94. Hedley B, Keeney M, Chin-Yee I, Brown W. Initial performance evaluation of the UniCel® DxH 800 Coulter® cellular analysis system. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(1):45-56.
95. Beckman Coulter. DxH-800. Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/en/products/hematology/dxh-800> Consultado a: 04/05/2019.

96. de Almeida R, Beretta AL. Anemia Falciforme e abordagem laboratorial: uma breve revisão de literatura. *Rev Bras Anal Clin.* 2017;49(2):131-4.
97. Kunwandee 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. *Lab Med.* 2014;45(3):112-21.
98. Arkray. Automatic Glycohemoglobin Analyzer  
ADAMS A1c HA-8180V/HA-8180T. Disponível em:  
<http://www.arkray.eu/english/products/laboratory/habalc/ha-8180.html> Consultado a: 04/05/2019.
99. Sarstedt. Sediplus® S 2000. Disponível em:  
<https://www.sarstedt.com/pt/produtos/diagnostico/hemossedimentacao/sediplusr/product/90.189.700/>  
/ Consultado a: 04/05/2019.
100. Favalaro E, Bonar R. External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2014;40(02):239-53.
101. Siemens. PFA-200. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/innovance-pfa-200> Consultado a: 05/05/2019.
102. Instrumentation Laboratory, ACL TOP. Disponível em:  
<https://www.instrumentationlaboratory.com/en/acl-top-family-series> Consultado a: 05/05/2019.
103. Cepheid. Xpert® FII & FV. Disponível em: <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/oncology-genetics/xpert-fii-fv> Consultado a: 05/05/2019.
104. Fleisher T, Oliveira J. Flow cytometry. *Clinical Immunology*: Elsevier; 2019. p. 1239-51.

## VII - Anexos: Publicações e Comunicações

### Abstracts aceites para publicação em revista internacional:

- Feijó M, Monteiro A, Amantegui P, Reis C, Correia S, Valente M, Faria M. Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Diseases: Smokers versus Non-Smokers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019. FI:3.556

“Over the years, flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) has become an essential procedure in differential diagnosis of pulmonary diseases (PD). In healthy subjects, BAL’s cell pattern is notoriously different between smokers and non-smokers. The present study aims to understand if and how smoking habits influence the BAL’s cell pattern of patients with PD. Between 2014 and 2018, our institution performed 285 BAL, which cell surface antigen expression of total lymphocytes, CD4+ and CD8+ T cells and macrophages was characterized by flow cytometry. The study population includes 148 men and 137 woman, with age comprised between 17 and 87 years and mean age of 61 years, 179 non-smokers, 60 ex-smokers and 46 smokers. This population includes cases of pulmonary nodule (PN), pneumonia, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), sarcoidosis, bronchial asthma (BA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Statistically significant differences ( $P<0.05$ ) between the tested groups were obtained by Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test, utilizing IBM SPSS Statics (version 25) software. Across all study groups, smokers showed an increased macrophages’ frequency in comparison to non-smokers, being statistically significant in pneumonia and BA. Relatively to CD4/CD8 ratio, no significant differences between smokers and non-smokers were found, except in the case of PN, significantly lower ratio in smokers, and in IPF, significantly higher ratio in smokers. Inversely to macrophages’ results, total lymphocytes’ frequency in smokers was decreased in comparison to non-smokers, being statistically significant in COPD and BA. Comparing the cell pattern of smokers and non-smokers with PD to the one of healthy smokers and non-smokers separately, it is easily understandable that the abnormal values observed in smokers are not only a PD outcome but also a cigarette smoke-related consequence. In conclusion, our results lead to the possibility that an apparently pathological value can be due to the subject’s smoking habits and not due to a disease. Thereby, although preliminary, this study highlights the importance of considering the patient’s smoking habits when interpreting the BAL cytometric analysis results in differential diagnosis of PD.”

- Reis C, Teixeira R, Krasteva E, **Feijó M**, Correia S, Faria M. Analysis of Vitamin D levels in 2018: A Retrospective Study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019. **FI:3.556**

“25-hydroxycholecalciferol (Vitamin D) is an liposoluble hormone that plays a key role in the regulation of several organs and tissues. The importance of vitamin D together with its increasingly reported lower levels becomes a global concern. In laboratorial routine, exact measurements of Vitamin D and methodological standardization are essential to avoid quantification errors and to assure results reproducibility. Thereby, the evaluation and critical analysis of these results are extremely important. The present work aims to analyze all of Vitamin D measurements performed in our institution, over the last year. During 2018, 3100 patients’ serum samples were analyzed through a chemiluminescent microparticle immunoassay realized in Cobas® 6000 equipment (Roche). Study population ages are comprised between 1 and 101 years, with the average age of 62 years, being that 62,3 % were females. Vitamin D levels, gender, age, month of analysis and specialty which requires the analysis were defined as study variables. Statistically significant differences between groups were analyzed by Kruskal-Wallis, Mann Whitney and Pearson’s correlation tests, utilizing IBM SPSS Statistics (version 25) software. This retrospective analysis demonstrated that the majority of the studied population presented deficient ( $\leq 20$  ng/mL, 56,8 %) or insufficient (21-29 ng/mL, 30,7 %) vitamin D levels, being that only 12,5 % presented sufficient levels. A negative correlation ( $p < 0,001$ ) between age and vitamin D was demonstrated, since vitamin D levels decrease with age. Even more, this result was shown to be gender-independent. Despite of Vitamin D measurement, requirements were essentially from consultation (83,5%), statistically significant ( $p < 0,001$ ) lowest levels of vitamin D were observed in internment patients. Medical (38,9%), rheumatology (12,3 %), and diabetology (9,5%) were the specialties that more frequently required vitamin D measurements. The month when the measurement was performed significantly influences the vitamin D levels ( $p < 0,001$ ), being the highest levels observed in September and lowest in December. In conclusion, vitamin D low levels were observed in almost every one of the study subjects, being that even on the months with higher sun exposition this deficit was observed.”

Pósteres em Eventos Científicos

- **Feijó M**, Monteiro A, Reis C, Correia S, Valente M, Amantegui P. Lymphocyte Subsets Distribution in the Bronchoalveolar Lavage From Pathological vs Healthy Subjects. XIV Simpósio Anual CICS-UBI, 2019 (*Abstract* submetido).
- **Reis C**, Teixeira R, Krasteva E, **Feijó M**, Correia S, Faria M. Youth Population Vitamin D levels: A Pathologies that may be Associated. XIV Simpósio Anual CICS-UBI, 2019 (*Abstract* submetido).
- **Feijó M**, **Monteiro A**, Correia S, Valente M, Amantegui P. Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of Pulmonary Diseases: Flow Cytometry Findings. A 2-Year Study. XVI Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria, Salamanca, 09-11 de maio, 2019.

## Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of Pulmonary Diseases: Flow Cytometry Findings. A 2-Year Study

**Mariana Feijó<sup>1</sup>, Andreia Monteiro<sup>2,3</sup>, Sara Correia<sup>2</sup>, Maria Jesus Valente<sup>1</sup>, Patricia Amantegui<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, Chemistry Department, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>2</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>3</sup> CHUCB - Cova da Beira Hospital and University Centre, Covilhã, Portugal

### Introduction

Over the years, flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) has become an essential procedure in differential diagnosis of pulmonary diseases (PD)<sup>1</sup>. Although, the diagnostic value of bronchoalveolar lavage (BAL) is still challenging.

**Aim:** to evaluate the relationship between BAL flow cytometry's results and the final diagnosis in pulmonary diseases (PD).

### Material and Methods

#### BAL processing

#### Flow cytometric analysis

#### Retrospective analysis

### Results

#### Morphological analysis of BAL

**Figure 1:** BAL morphological analysis. 100x magnification. Scale bar: 100 µm.

#### Macrophages

**Figure 2:** Macrophages (%) in BAL. Data shows a general decrease in macrophage frequency across most PDs compared to healthy subjects.

#### Total Lymphocytes

**Figure 3:** Total Lymphocytes (%) in BAL. Data shows significantly increased lymphocyte frequency in Sarcoidosis, Pneumonia, BA, and PN.

#### CD4/CD8 Ratio

**Figure 4:** CD4/CD8 Ratio in BAL. Data shows an elevated ratio in Sarcoidosis, Pneumonia, BA, and PN.

#### Population of BAL cells by gender and smoking habits

**Figure 5:** Population of BAL cells by gender and smoking habits. Data shows differences in cell distribution based on these factors.

### Conclusions

- From all cell populations of BAL, the most representative were macrophages and T cells. Despite of being analyzed, B and NK cells were not appreciated in this study.
- In sarcoidosis, pneumonia and PN, total lymphocytes were significantly increased.
- An elevated CD4/CD8 ratio was observed in sarcoidosis, being statistically significant in comparison to IPF, COPD, BA, pneumonia, and PN.
- A general decreased frequency of macrophages, being that the lowest were from sarcoidosis and the highest were from IPF.
- **Although preliminary, our results highlighted the importance of BAL's cytometric analysis in differential diagnosis of PD.**

**References**

1. Ghimaili H, et al. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung disease: a clinicopathological perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2018; 35: 260-267.
2. Haber J, et al. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011; 167: 523-531.

- **Feijó M**, Monteiro A, Amantegui P, Reis C, Correia S, Valente M, Faria M. Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Diseases: Smokers versus Non-Smokers. 11ª Reunião Científica da Sociedade Portuguesa de Medicina Laboratorial, Coimbra, 05-06 de abril, 2019.

## Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Diseases: Smokers versus Non-Smokers

**Mariana Feijó<sup>1</sup>, Andreia Monteiro<sup>2,3</sup>, Patrícia Amantegui<sup>2</sup>, Cristiana Reis<sup>1</sup>, Sara Correia<sup>2</sup>, Maria Jesus Valente<sup>2</sup>, Maria Conceição Faria<sup>2</sup>**  
<sup>1</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, Chemistry Department, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>2</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>3</sup> CHUCB - Cova da Beira Hospital and University Centre, Covilhã, Portugal

### Introduction

Over the years, flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) has become an essential procedure in differential diagnosis of pulmonary diseases (PD)<sup>1</sup>. In healthy subjects, BAL's cell pattern is notoriously different between smokers and non-smokers<sup>2</sup>.

**Aim:** To understand if and how smoking habits influence the BAL's cell pattern of patients with PD.

### Material and Methods

#### BAL processing

#### Flow cytometric analysis

#### Retrospective analysis

### Results

**Figure 1.** Evolution of interstitial lung diseases performed over the years (2014-2018).

**Figure 2.** Pulmonary diseases and respiratory conditions, grouped by smoking habits: COPD, chronic obstructive pulmonary disease, IPF, idiopathic pulmonary fibrosis, ILD, interstitial lung disease, IPN, pulmonary nodules.

**Figure 3.** Percentage of smokers, versus non-smokers and respect to gender (M/F).

#### Morphological analysis of BAL

**Figure 4.** BAL's typical cellular morphology. ICDs (interstitial lung diseases).

#### A Macrophages

#### B Total Lymphocytes

#### C CD4/CD8 Ratio


**Figure 5.** (A) Macrophages' frequency, (B) total lymphocytes' frequency and (C) CD4/CD8 ratio. (A1, B1, C1) Comparisons between smokers and non-smokers, in each pathological condition. (A2, B2, C2) Comparisons between each pathological condition to non-smokers. (A3, B3, C3) Comparisons between each pathological condition to smokers. Data were reported healthy control values. Data shown on smokers and on PD patients (age, statistically significant differences (\*\*P<0.05) between tested groups were indicated by Kruskal-Wallis test, utilizing IBM SPSS Statistics (version 26) software. COPD, chronic obstructive pulmonary disease, non-smokers, IPF, idiopathic pulmonary fibrosis, ILD, interstitial lung disease and pulmonary, PD, pulmonary diseases.

### Conclusions


- From all cell populations of BAL, the most representative were macrophages and T cells. Despite of being analyzed, B and NK cells were not appreciated in this study.
- Smokers showed an increased macrophages' frequency in comparison to non-smokers, inversely to what occurs with total lymphocytes' frequency.
- Smokers with IPF shown decreased CD4/CD8 ratio relatively to non-smokers, being that in PN the opposite were observed.
- Comparing the cell pattern of unhealthy and healthy subjects, it is easily understandable that the abnormal values observed in smokers are not only a PD outcome but also a cigarette smoke-related consequence.
- **Although preliminary, this study highlights the importance of considering the patient's smoking habits when interpreting the BAL cytometric analysis results in differential diagnosis of PD.**

**References**  
 1. Gianelli H, et al. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: a clinicopathological perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2018; 35: 280-287.  
 2. Hertz M, et al. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011; 167: 523-531.


- **Reis C**, Teixeira R, Krasteva E, **Feijó M**, Correia S, Faria M. Analysis of Vitamin D levels in 2018: A Retrospective Study. 11ª Reunião Científica da Sociedade Portuguesa de Medicina Laboratorial, Coimbra, 05-06 de abril, 2019.




UNIVERSIDADE  
BEIRA INTERIOR



Centro Hospitalar  
Cova da Beira, L.P.



SPML  
Sociedade Portuguesa  
de Medicina Laboratorial



CICS-UBI  
Centro de Investigação em Ciências da Saúde  
Univ. Beira Interior

## ANÁLISE DOS NÍVEIS DE VITAMINA D EM 2018: UM ESTUDO RETROSPECTIVO

Cristiana Reis<sup>1,2</sup>, Rui Teixeira<sup>3</sup>, Emília Krasteva<sup>3</sup>, Mariana Feijó<sup>1,2</sup>, Sara Correia<sup>2</sup>, Maria Conceição Faria<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>2</sup>CICS-UBI – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal  
<sup>3</sup>CHUCB – Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, Covilhã, Portugal

### Introdução


A 25-hidroxicolecalciferol (vitamina D) é uma hormona lipossolúvel que desempenha um papel fundamental na regulação de vários órgãos e tecidos. A importância da vitamina D, juntamente com os níveis mais baixos relatados, torna-se uma preocupação global. Na rotina laboratorial, a exatidão da determinação da vitamina D e a padronização metodológica são essenciais para evitar erros de quantificação e assegurar a reprodutibilidade dos resultados [1]. A avaliação e análise crítica desses resultados são extremamente importantes, assim...

O presente trabalho tem como objetivo analisar todos os doseamentos de vitamina D realizados na instituição, no último ano.

### Materiais e Métodos


Durante 2018, 3100 amostras de soro de pacientes foram analisadas através de um imunoensaio quimioluminescente de microparticulas realizado em equipamento Cobas® 6000 (Roche). As idades da população em estudo estão compreendidas entre 1 e 101 anos, com a idade média de 62 anos, sendo que 62,3% eram do sexo feminino e 37,7% eram do sexo masculino.

### Resultados




**Doseamento de Vitamina D**

Figura 1. Percentagem de casos com deficiência de Vitamina D por tipo de atendimento: Internamento (62,3%) e Ambulatório (37,7%).



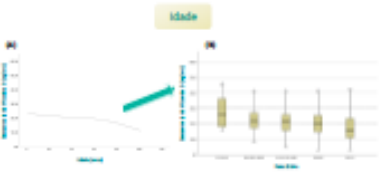
**Especialidade**

Figura 3. Percentagem da patologia de doseamento de vitamina D por área especializada. O grupo "outros" representa todas as especialidades que apresentaram frequência inferior a 5%.



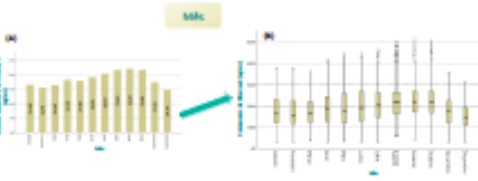
**Serviço**

Figura 2. (A) Percentagem da patologia de doseamento de vitamina D de Internamento e ambulatório e (B) comparação entre os respetivos resultados do doseamento. Primeiro eixo a esquerda (0,00 ng/ml) e eixo a direita a paragem de referência para internamento e a segunda eixo a esquerda (0,00 ng/ml) eixo a paragem de referência para ambulatório. Outros representados como mediana e IQ (Intervalo Interquartil). Foram obtidos resultados estatisticamente significativos (P < 0,001) entre os grupos estudados com recurso ao teste de Mann-Whitney, utilizando o software SPSS (Statsoft versão 20).



**Idade**

Figura 4. (A) Correlação negativa entre o doseamento de vitamina D e a idade e (B) comparação dos doseamentos de vitamina D em cada faixa etária. Os dados estão correlacionados entre 0 e 100 anos, subdivididos em 10 anos, desde idade 0-10 anos, idade 10-20 anos e assim sucessivamente até 90 anos. Primeiro eixo a esquerda (0,00 ng/ml) eixo a paragem de referência para internamento e a segunda eixo a esquerda (0,00 ng/ml) eixo a paragem de referência para ambulatório. Outros representados como mediana e IQ. Foram obtidos resultados estatisticamente significativos (P < 0,001) entre os grupos estudados com recurso ao teste de correlação de Spearman e ao teste de Mann-Whitney, utilizando o software SPSS (Statsoft versão 20).



**Sexo**

Figura 5. (A) Mediana dos doseamentos de vitamina D em todos os meses de ano (2018) e (B) comparação dos doseamentos de vitamina D em cada mês. Primeiro eixo a esquerda (0,00 ng/ml) eixo a paragem de referência para internamento e a segunda eixo a esquerda (0,00 ng/ml) eixo a paragem de referência para ambulatório. Outros representados como mediana e IQ (Intervalo Interquartil). Foram obtidos resultados estatisticamente significativos (P < 0,05) entre os grupos estudados com recurso ao teste de Mann-Whitney, utilizando o software SPSS (Statsoft versão 20). \*Significativo em relação ao mês de novembro, \*\*significativo em relação ao mês de janeiro, \*\*\*significativo em relação ao mês de março, \*\*\*\*significativo em relação ao mês de maio, \*\*\*\*\*significativo em relação ao mês de junho.

### Conclusão

- Níveis baixos de vitamina D foram observados em quase todos os pacientes em estudo, sendo que mesmo nos meses com maior exposição solar este déficit foi observado.
- Ocorre uma correlação negativa entre a idade e a vitamina D, uma vez que os níveis de vitamina D diminuem com a idade.
- Os níveis baixos verificados neste estudo podem estar relacionados com o facto do maior número de casos corresponderem a idosos.
- Pacientes internados demonstram significativamente níveis mais baixos.
- Conclui-se assim que a carência de vitamina D, apesar de ser uma problemática que afeta a maior parte da população em estudo, apresenta grupos de maior risco o que remete para a necessidade de suplementação adequada aos mesmos.

**Referências:**  
 [1] Hermans, M., Nijel, C., Poels, L., et al. (2018). Assessment of vitamin D status – a challenging task. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (216), 11(1), pp. 9-24.

### Serviço de Formação do SPC

#### Formadora:

- Síndromes Mieloproliferativas (17/04/19, 1 hora).
- Citometria de Fluxo: Fundamentos e Aplicações (26/04/19, 1 hora).

#### Formanda:

- Líquidos Seroso. Análise laboratorial do líquido pleural (24/10/2018, meia hora).
- Pseudotrombocitopenia por EDTA - Utilidade do Thromboexact (08/11/2018, 2 horas).
- Novos Biomarcadores de LRA (14/11/2018, meia hora).
- Análise Laboratorial dos Líquidos Ascítico e Pericárdico (04/12/2018, 1 hora).
- Gasimetrias: Casos Clínicos (17/12/2018, 1 hora).
- Colorações em Hematologia (14/02/2019, 1 hora).
- A epidemiologia de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos. Impacto e evolução (20/03/2019, 1 hora).
- Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca de Rotina (27/03/2019, 1 hora).
- Deficiência em vitamina D e o laboratório clínico (03/04/2019, 1 hora).
- Diagnóstico e Tratamento de Amigdalite Aguda na Idade Pediátrica (24/04/2019, 1 hora).