



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Avaliação da Hipovitaminose D na População do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira

Cristiana Fernandes Reis

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

Versão Final Após Defesa

Orientador: Dr. Rui Pedro Antunes Alves Teixeira
Coorientadora: Doutora Sara Carina de Lima Correia

Covilhã, junho de 2019

Para os meus pais, irmãos, cunhado, afilhada e avós!

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Rui Teixeira agradeço por tudo o que me transmitiu e por todo o apoio que me permitiu tornar possível a elaboração deste projeto.

À minha coorientadora, Doutora Sara Correia agradeço pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou comigo.

À Dra. Emília, agradeço a paciência, o tempo investido e a dedicação que sempre demonstrou por este projeto.

Ao Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, em especial ao Serviço de Patologia Clínica, diretora de serviço Dra. Conceição Faria e a todos os colaboradores agradeço pela maneira como me receberam e por toda a disponibilidade que sempre demonstraram não só ao longo de todo o estágio, mas também após o término deste, obrigada por todo o conhecimento transmitido e pela experiência.

À minha colega de estágio, Mariana Feijó, agradeço pela irmã que foi para mim, pela força que me transmitiu, por nunca me ter deixado desistir e por tudo o que me ensinou. Nunca duvides da pessoa especial que és e do valor que tens tanto a nível pessoal como a nível profissional, foste uma grande inspiração para mim e foi uma honra poder partilhar contigo esta experiência que tanto me fez crescer.

À minha família, em especial aos meus pais, irmãos e cunhado agradeço a paciência, a dedicação que se sempre demonstraram, a confiança que sempre depositaram em mim, mas acima de tudo agradeço o amor que sempre me deram. Não imaginam o quão é importante para mim o vosso apoio, obrigada pela pessoa que me tornaram e obrigada por me fazerem tão feliz, são o melhor de mim.

À minha afilhada, agradeço por ser a luz dos meus olhos, por me fazer chorar de tanto rir, por me fazer a pessoa mais orgulhosa do mundo. Minha pateta mais doce!

À minha melhor amiga, Rita agradeço o companheirismo e a entreatuda. Obrigada por seres quem és, por continuares ao meu lado e pela coragem e força que me transmites.

Aos meus amigos, em especial aos meus irmãos da Covilhã agradeço por todos momentos aqui vividos nesta cidade, por terem entrado na minha vida e me terem acompanhado até hoje.

À minha madrinha agradeço o apoio e a força que sempre me transmitiu e me ajudou a superar cada dificuldade. Não é de sempre mas será para sempre com certeza.

À Ana Rita, agradeço por ser quem é, por nunca me ter deixado cair no desespero e por ter sido uma das melhores coisas que esta cidade me deu. Nunca me vou esquecer das nossas conversas e da maneira como me apoias te sempre que precisei, neste último ano principalmente. Obrigada minha linda.

À Catarina, agradeço o apoio e amizade, agradeço por cada abraço sempre que a lágrima estava prestes a cair. Obrigada por nunca me teres deixado mesmo quando eu insistia que ficava bem.

Ao meu afilhado, David agradeço a força e coragem que me transmitiu ao longo do ano. Obrigada por me fazeres acreditar que era capaz sempre que as dúvidas me assombram. Não foi uma decisão minha, mas hoje agradeço que o tenhas feito, e sou uma madrinha muito babada porque sei que um dia vou ser eu a estar desse lado.

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos meus avós que por infelicidades da vida não vão poder ler isto, mas tenho a certeza que onde quer que estejam sabem que os amo e que as saudades são imensas. Porque foram vocês que me fizeram sempre acreditar que este dia ia chegar, e sei que me vão acompanhar até ao fim! Por isso também é uma conquista vossa. Obrigada!

Resumo

A vitamina D é uma hormona esteroide lipossolúvel sintetizada maioritariamente na pele pela radiação ultravioleta (UVB) através do precursor 7-deidrocolesterol ou de forma menos frequente obtida pela dieta. A primeira hidroxilação ocorre no fígado com a formação da 25-hidroxivitamina D, metabolito com pouca atividade, mas representativo das reservas desta hormona. A segunda hidroxilação pode ocorrer nos rins pela CYP27B1 com formação da 1,25-dihidroxivitamina D, metabolito ativo da vitamina D. A ação primária deste metabolito é através do recetor nuclear da vitamina D, VDR, que se heterodimeriza com o recetor X retinoide e se vai ligar a elementos responsivos da vitamina D próximos dos genes alvo. A função mais conhecida da vitamina D é a homeostase dos níveis de cálcio e fósforo bem como manter uma boa saúde óssea. Contudo há vários estudos que apontam para a associação da vitamina D a várias patologias, como doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e doenças inflamatórias. Esta ampla distribuição clínica pode ser explicada pela expressão de recetores VDR e da enzima CYP27B1 em vários órgãos além dos rins.

Para se dosear a vitamina D recorre-se ao 25-OHD havendo mais do que uma metodologia aplicada a esta medição. Vários têm sido os problemas levantados na escolha da metodologia, como a reatividade cruzada pelo 24,25-(OH)₂D, um metabolito da vitamina D que permite que haja um controlo adequado nos níveis das restantes formas. Existem ainda um conjunto de fatores, para além do método usado, que podem interferir de forma negativa nos doseamentos, realçando a necessidade crescente de estudos adicionais.

Neste projeto de investigação é feita uma análise estatística com base nos doseamentos dos últimos 4 anos através de um imunoensaio de eletroquimioluminescência no equipamento Cobas® 6000 (Roche). Este imunoensaio apresenta um anticorpo monoclonal que impede reações cruzadas com o metabolito 24,25-(OH)₂D.

Conclui-se assim nesta investigação que fatores como a estação do ano/meses interferem significativamente no doseamento ainda que a maioria permaneça em hipovitaminose D. Também o sexo parece ser um fator que intervém de forma significativa nos doseamentos, apesar da contestação por parte de um elevado número de estudos. A avaliação dos diagnósticos ainda carece de mais estudos, onde sejam avaliados outros parâmetros que podem desfazer várias dúvidas até ao momento sentidas.

Palavras-chave

Hipovitaminose D, 25-hidroxivitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D, Eletroquimioluminescência
Radiação UVB, Estação do Ano

Abstract

Vitamin D is a fat-soluble steroid hormone synthesized mostly in the skin by ultraviolet radiation (UVB) through the precursor 7-dehydrocholesterol or less commonly obtained by diet. The first hydroxylation occurs in the liver with the formation of 25-OHD, a metabolite with little activity, but representative of the hormone reserves. The second hydroxylation may occur in the kidneys by CYP27B1 with formation of 1,25-(OH)₂D, active metabolite of vitamin D. The primary action of this metabolite is through the nuclear receptor of vitamin D, VDR, which is heterodimerized with the retinoid X receptor and whether it binds to vitamin D responsive elements near the target genes. The homeostasis of calcium and phosphorus levels as well as maintaining a good bone health are the most well known functions to Vitamin D. However, there are several studies that point to the association of this vitamin with various pathologies, such as cardiovascular diseases, autoimmune diseases and inflammatory diseases. This wide clinical distribution can be explained by the expression of VDR and CYP27B1 receptors in various organs aside from the kidneys.

In order to provide a dosage of vitamin D one resorts to 25-OHD having in mind that there is more than one methodology to this measurement. Several problems have been raised regarding the choice of the methodology, such as the cross-reactivity for 24,25-(OH)₂D, a metabolite of vitamin D that allows an adequate control of the levels of the remaining forms. There are still a set of factors, besides the method used, that can interfere negatively in the dosages, enhancing the increasing necessity of further studies.

In this research project a statistical analysis is made based on the dosages of the last 4 years through an electrochemiluminescence immunoassay in the Cobas® 6000 equipment (Roche). This immunoassay presents a monoclonal antibody that prevents cross-reactions with the metabolite 24, 25-(OH)₂D.

It is concluded in this investigation that factors such as the season or certain months interfere significantly in the dosing even though most remain in hypovitaminosis D. Also, gender seems to be a factor that plays a significant role in the dosages, despite some challenge of a high number of studies. The evaluation of the diagnoses still lacks further studies, in which other parameters are evaluated and can undo several doubts felt so far.

Keywords

Hypovitaminosis D, 25-hydroxy vitamin D, 1,25-dihydroxy vitamin D, Electrochemiluminescence, UVB radiation, Seasons

Índice

I. Introdução.....	1
1. Motivação.....	1
2. Entidade Acolhedora.....	1
3. Objetivo.....	2
II. Projeto de Investigação.....	3
1. Introdução.....	3
1.1. Caracterização da Vitamina D.....	3
1.2. Metabolismo.....	4
1.2.1. 25-OHD.....	4
1.2.2. 1,25-(OH) ₂ D renal.....	4
1.2.3. 1,25-(OH) ₂ D extra-renal.....	5
1.2.4. 24,25-(OH) ₂ D e 1,24,25-(OH) ₃ D.....	5
1.2.5. C3-epimeros.....	5
1.3. Regulação.....	6
1.4. Doseamento.....	6
1.4.1. 1,25-(OH) ₂ D.....	6
1.4.2. 25-OHD.....	7
1.5. Fatores Condicionantes.....	7
1.6. Toxicidade.....	9
1.7. Metodologias de Doseamento.....	10
1.7.1. 25-OHD.....	10
1.7.2. 1,25-(OH) ₂ D.....	11
1.7.3. 24,25-(OH) ₂ D e outros Metabolitos.....	11
2. Objetivo.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Quantificação de 25-OHD.....	14
3.2. Imunoensaio Eletroquimioluminescência.....	14
3.3. Níveis de Vitamina D.....	15
3.4. População em Estudo	15
3.5. Análise Estatística	15
4. Resultados	16
4.1. Caracterização da População.....	16
4.2. Caracterização dos Níveis de Vitamina D.....	20
4.3. Análise dos Níveis de Vitamina D.....	21
5. Discussão.....	29
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	35

III. Relatório de Estágio.....	37
1. Caracterização do SPC.....	37
2. Processo Pré-Analítico.....	37
3. Processo Analítico e Controlo de Qualidade.....	39
4. Processo Pós-Analítico e Validação Biopatológica	39
5. Trabalho Desenvolvido no Estágio	40
5.1. Hematologia	40
5.1.1. Contextualização Teórica.....	40
5.1.2. Esfregaço Sanguíneo.....	42
5.1.3. Colorações em Hematologia.....	42
5.1.3.1. Colorações Automáticas.....	43
5.1.3.2. Colorações Manuais.....	43
5.1.3.2.1. Coloração de May Grunwald Giemsa.....	43
5.1.3.2.2. Coloração de Peerls	44
5.1.3.2.3. Coloração para Pesquisa da Malária	44
5.1.4. Hemograma.....	45
5.1.5. Coagulação.....	45
5.1.6. Estudo da Função Plaquetária	47
5.1.7. Estudo da Hemoglobina.....	47
5.1.8. Trombofilia.....	48
5.1.9. Velocidade de Sedimentação.....	49
5.1.10. Citometria de Fluxo	49
5.2. Microbiologia.....	51
5.2.1. Contextualização Teórica.....	51
5.2.2. Meios Cultura.....	52
5.2.2.1. Meios Líquidos.....	52
5.2.2.2. Meios Sólidos.....	53
5.2.3. Condições de Cultura.....	54
5.2.4. Colorações em Microbiologia.....	54
5.2.4.1. Coloração de Gram.....	55
5.2.4.2. Coloração de Ziehl-Neelse.....	55
5.2.5. Amostras Biológicas.....	55
5.2.5.1. Urina.....	55
5.2.5.2. Aparelho Respiratório.....	56
5.2.5.3. Hemoculturas.....	57
5.2.5.4. Cateter Vascular.....	57
5.2.5.5. Fezes.....	58
5.2.5.5.1. Testes Rápidos Imunocromatográficos.....	58
5.2.5.5.1.1. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes.....	58
5.2.5.5.1.2. Pesquisa de <i>Crypto-Giardia</i>	59

5.2.5.5.1.3.	Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i>	59
5.2.5.5.1.4.	Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>	59
5.2.5.5.1.5.	Pesquisa de Rotavirus e Adenovirus.....	60
5.2.5.5.1.6.	Pesquisa de Norovirus.....	60
5.2.5.5.1.7.	Pesquisa de Parasitas.....	61
5.2.5.6.	Exsudado Vaginal/Uretral.....	61
5.2.5.7.	Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i>	61
5.2.5.8.	Espermocultura.....	61
5.2.5.9.	Líquidos Biológicos.....	62
5.2.5.9.1.	Líquido Pleural.....	62
5.2.5.9.2.	Líquido Ascítico.....	62
5.2.5.9.3.	Líquido Sinovial ou Articular.....	62
5.2.5.10.	Pus.....	63
5.2.5.11.	Líquido Cefalorraquidiano.....	63
5.2.5.12.	Biopsia.....	64
5.2.5.13.	Pesquisada de MRSA.....	64
5.2.6.	Testes de Identificação Manual.....	64
5.2.6.1.	Teste da Catalase.....	64
5.2.6.2.	Teste da Coagulase.....	64
5.2.6.3.	Teste de Resistência à Novobiocina.....	65
5.2.6.4.	Tripagem de <i>Streptococcus B-hemolíticos</i>	65
5.2.6.5.	Teste de Inibição à Bacitracina.....	66
5.2.6.6.	Teste da Optoquina.....	66
5.2.6.7.	Teste dos fatores X, V e XV.....	66
5.2.6.8.	Pesquisa de <i>B-lactamases</i>	66
5.2.6.9.	Teste de Hidrolise da Ureia.....	67
5.2.7.	Testes de Identificação Serológica.....	67
5.2.7.1.	Identificação Serológica de <i>E. coli</i> 0157:H7.....	67
5.2.7.2.	Identificação Serologia de <i>Salmonella</i>	68
5.2.8.	Testes de Identificação Automática.....	68
5.2.9.	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos	69
5.2.10.	Diagnostico por técnicas de Biologia Molecular: GeneXpert®.....	69
5.2.11.	Xpert® Carba-R.....	69
5.2.12.	Xpert® CT/NG.....	70
5.2.13.	Xpert® MRSA NxG.....	71
5.2.14.	Xpert® MTB/RIF.....	71
5.3.	Imunoquímica.....	72
5.3.1.	Contextualização Teórica.....	72
5.3.2.	Metodologia pelo Cobas® 6000.....	73
5.3.2.1.	Cobas®6000: c501.....	73

5.3.2.2.	Cobas®6000: e601.....	74
5.3.3.	Metodologia pelo Cobas®4000: e411.....	74
5.3.4.	Metodologia pelo Architect™.....	74
5.3.5.	Metodologia pelo ImmunoCa.....	74
5.3.6.	Diagnostico por técnicas de Biología Molecular.....	75
5.3.6.1.	Estudo do HCV e Carga Viral do HIV.....	75
5.3.6.2.	Quantificação de Vírus Respiratórios.....	76
5.3.7.	Eletroforese de Proteínas.....	76
5.3.8.	Caracterização Imunologica de Imunoglobulinas	76
5.3.9.	Análise de Urinas.....	77
5.3.10.	Imunoensaios Cromatográficos.....	77
5.3.10.1.	Testes das drogas de Abuso.....	77
5.3.10.2.	Teste de Gravidez.....	78
5.3.11.	Testes de Imunofluorescencia.....	78
5.3.11.1.	<i>Coxiella burnetii</i> I+II IFA IgG/IgM/IgA.....	78
5.3.11.2.	<i>Rickettsia conorii</i> IFA IgG.....	79
6.	Conclusão.....	81
IV.	Referências Bibliográficas.....	83
V.	Anexos.....	89

Lista de Figuras

Figura 1: Isómeros da vitamina D.....	3
Figura 2: Metabolismo da vitamina D e os seus principais metabolitos.....	4
Figura 3: Percentagem de pedidos por ano.....	16
Figura 4: Percentagem dos pedidos por sexos.....	16
Figura 5: Percentagem dos pedidos por idades.....	17
Figura 6: Percentagem de pedidos por estação do ano.....	17
Figura 7: Percentagem de pedidos por meses.....	18
Figura 8: Percentagem de pedidos da consulta e do internamento.....	18
Figura 9: Percentagem de pedidos por especialidade.....	19
Figura 10: Contagem de pedidos em cada diagnósticos	20
Figura 11: Frequência dos doseamentos de vitamina D.....	20
Figura 12: Níveis de vitamina D da população.....	21
Figura 13: Níveis de vitamina D ao longo dos anos.....	21
Figura 14: Comparação dos níveis de vitamina D entre sexos.....	22
Figura 15: Impacto da idade nos doseamentos de vitamina D.....	23
Figura 16: Comparação dos níveis de vitamina D pelos diversos grupos etários.....	23
Figura 17: Comparação dos níveis de vitamina D ao longo das estações do ano.....	24
Figura 18: Comparação dos níveis de vitamina D ao longo dos meses.....	25
Figura 19: Comparação dos níveis de vitamina D no internamento e na consulta.....	26
Figura 20: Comparação dos níveis de vitamina D pelas especialidades.....	27
Figura 21: Comparação dos níveis de vitamina D dentro dos grupos de diagnósticos.....	28

I. Introdução

1. Motivação

O presente relatório de estágio tem em vista o ganho de competências tanto a nível profissional, enriquecendo a área de formação, como a nível pessoal com a superação de dificuldades e obstáculos.

2. Entidade Acolhedora

O presente estágio curricular foi desenvolvido no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), no Serviço de Patologia Clínica (SPC). O laboratório possui 6 áreas laboratoriais de diagnóstico em hematologia, microbiologia, imunoquímica, virologia, autoimunidade e um laboratório de urgência que se encontra interligado com todas as outras restantes áreas¹. O estágio incidu nas áreas laboratoriais de diagnóstico de hematologia, microbiologia e imunoquímica, com uma duração de aproximadamente dois meses e meio em cada, num total de 1303 horas.

Missão do SPC¹:

- ✓ Recolher produtos biológicos aos utentes que recorrem ao serviço, efetuando a determinação analítica dos parâmetros solicitados, de forma a complementar o diagnóstico clínico e instituição de uma terapêutica adequada;
- ✓ 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.

3. Objetivo

No período de 10 de setembro a 30 de abril foi desenvolvido o presente trabalho, que engloba duas vertentes; a primeira, projeto de investigação visa a aquisição de experiência na área de investigação clínica, com a realização de um estudo a nível hospitalar e a escrita desse mesmo projeto; a segunda, estágio curricular visa o contacto direto e prático na aquisição de competências laborais na área de hematologia, microbiologia e imunoquímica, sobre o qual foi escrito um relatório incluído neste documento.

II. Projeto de Investigação

1. Introdução

1.1. Caracterização da Vitamina D

A vitamina D é uma hormona esteroide lipossolúvel de extrema importância fisiológica para o nosso organismo com particularidades únicas^{2,3,4}. Quando falamos em vitamina D podemos subdividi-la em colecalciferol (vitamina D3) e ergocalciferol (vitamina D2)³. A forma isomérica D2 da vitamina D, não é sintetizada pelo nosso próprio organismo, podendo ser extraída de algumas plantas e fungos^{3,5}. No que respeita à forma D3, esta pode ser absorvida pela dieta através da ingestão de peixes gordurosos, fígado animal, óleo de peixe ou até mesmo gemas de ovo, ou é sintetizada pela nossa pele^{3,6}. Neste último caso, a exposição a raios solares ou mais propriamente a raios ultravioleta B (UVB) (290 a 315 nm) ativam a síntese do precursor 7-deidrocolesterol que se converte em vitamina D3 através do intermediário pré-vitamina D3^{3,7}. Ambas as formas, D2 e D3, comportam-se da mesma maneira e passam pelo mesmo metabolismo, sendo que quando ativas ligam-se a recetores nuclear de vitamina D (VDR)^{3,5}.

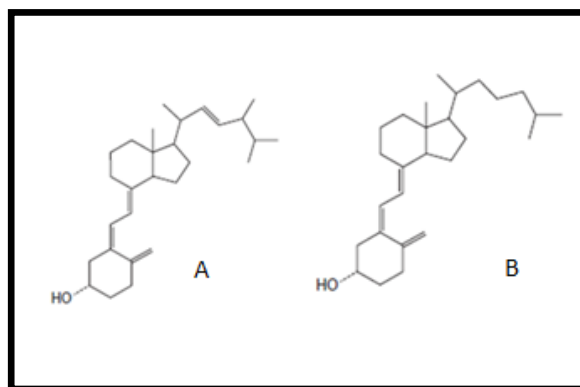


Figura 1: Isómeros da vitamina D, A. Ergocalciferol (D2) e B. colecalciferol (D3).

Adaptação do artigo ¹⁷

1.2. Metabolismo

1.2.1. 25-OHD

A vitamina D adquire a sua forma mais ativa através de duas etapas de hidroxilação⁸. Numa primeira etapa ambas as formas de vitamina D, D2 e D3, são transportadas para o fígado ligadas a uma proteína de ligação à vitamina D, DBP^{8,9}. A primeira hidroxilação ocorre na posição 25 por uma enzima do citocromo P450, a CYP2R1 hepática (25-hidroxilase), formando-se o calcidiol ou mais conhecida como 25-hidroxivitamina D (25-OHD) que possui pouca atividade biológica^{5,8,9,10}. É nesta forma que se encontra armazenada a vitamina D no organismo, apresentando-se como metabolito circulante maioritário com um tempo de semi-vida de duas a três semanas e por isso grande parte dos laboratórios clínicos recorrem a sua quantificação^{5,9,11}.

1.2.2. 1, 25-(OH)₂D renal

Quando o organismo tem a necessidade de interferir nos níveis de cálcio no sangue e nos ossos, parte do metabolito 25-OHD é transportado até ao túbulo renal proximal, onde pela ação da CYP27B1 mitocondrial (1 α -hidroxilase) sofre nova hidroxilação na posição 1^{9,12}. Nesta última etapa de metabolização forma-se o calcitriol ou também designada 1,25-dihidroxivitamina D (1,25-(OH)₂D) que é a forma hormonal ativa⁹. A ação primária da 1,25-(OH)₂D ocorre pelo recetor VDR que se heterodimeriza com o recetor X retinoide e se liga a elementos responsivos da vitamina D que se encontram perto de genes alvo¹⁰.

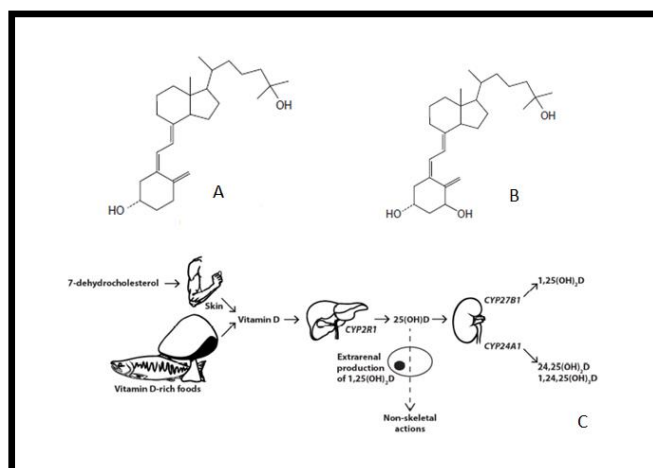


Figura 2: Metabolismo da vitamina D e os metabolitos mais comuns. A. Metabolito 25-OHD que representa as reservas da vitamina D no organismo e o B. Metabolito 1,25-(OH)₂D que representa a forma ativa desta vitamina. Adaptação do artigo¹⁷ e artigo⁵

1.2.3. 1,25-(OH)₂D extra-renal

O papel da vitamina D não se restringe à saúde óssea, apresenta uma ampla influência por todo o organismo, facto que pode ser comprovado pela expressão do recetor VDR em quase todos os tecidos do organismo, assim como a expressão da enzima CYP27B1¹³. Órgãos extra-renais que expressam recetores VDR podem ser os pulmões, próstata, mama, cólon, pâncreas e cérebro, podendo também a placenta apresentar estes mesmos recetores e as próprias células do sistema imune^{6,8}. No rim, esta hormona exerce funções endócrinas, aumentando a absorção intestinal do cálcio e promovendo a função dos osteoclastos, havendo desta forma a manutenção da homeostase do cálcio e fosforo e uma boa saúde óssea¹⁰. Nos órgãos extra-renais a hormona apresenta efeitos paracrinis e autocrinis, não estando relacionada com a regulação da homeostase do cálcio, mas sim da regulação do crescimento e proliferação celular e até mesmo da modulação do sistema imunológico^{6,8}.

1.2.4. 24,25-(OH)₂D e 1,24,25(OH)₃D

Para que haja um controlo por parte do próprio organismo às concentrações destes metabolitos, permanecendo nas concentrações estritamente necessárias, podem ocorrer outras hidroxilações¹⁴. A enzima renal CYP24A1 (24-hidroxilase) pode provocar hidroxilação tanto na 25-OHD como na 1,25-(OH)₂D formando-se respetivamente 24,25-dihidroxitamina D (24,25-(OH)₂D) e 1,24,25-trihidroxitamina D (1,24,25-(OH)₃D)¹⁴. Ambas as formas apresentam uma afinidade deficiente para o recetor VDR diminuindo desta forma a atividade⁵. A medição de metabolitos da vitamina D, como o 24,25-(OH)₂D, pode vir a ser uma alternativa plausível para melhorar a avaliação do metabolismo desta hormona, uma vez que este representa o produto do seu catabolismo¹⁰.

À semelhança do que acontece com a CYP27B1 também a CYP24A1 se pode expandir para outros órgãos proporcionando um controlo local da concentração de metabolitos da vitamina D¹⁴.

1.2.5. C3-epimeros

Outro metabolito de vitamina D, mais prevalente em crianças que em adultos, são os C3-epimeros¹⁴. Este metabolito difere na configuração estereoquímica, mas tem uma estrutura idêntica comparativamente à molécula primária¹⁴. A forma dominante é o C3-epimero-25-OHD₃, podendo sofrer tal como a molécula primária uma hidroxilação na posição 1 pela CYP27B1 e ligar-se tanto ao recetor VDR como à proteína DBP, ainda que com menor afinidade comparativamente à forma não epimerica¹⁴.

1.3. Regulação

A regulação que ocorre sobre os metabolitos da vitamina D vai depender do local onde o recetor é expresso⁵. No caso da expressão ocorrer no rim, o controlo vai ser regulado pela hormona paratiroide (PTH), fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23), cálcio, fosfato e pela 1,25-(OH)₂D^{5,14}. No que respeita à PTH, esta vai estimular a CYP27B1 ao mesmo tempo que inibe a CYP24A1, aumentando os níveis de 1,25-(OH)₂D, havendo estudos que associam uma hipovitaminose D a níveis altos de PTH^{14,15}. Já a FGF23 atua de forma oposta à PTH, estimulando o catabolismo da 1,25(OH)₂D¹⁴. Tanto o cálcio como o fósforo sempre que se encontrarem em elevada concentração vão agir de forma a diminuir a atividade da CYP27B1 e assim levar a uma homeostase dos seus níveis^{5,14}. A 1,25-(OH)₂D controla a sua conversão, suprimindo a atividade da CYP27B1 e estimulando a atividade da CYP24A1 induzindo a sua própria degradação em situações de excesso¹⁴.

No caso dos tecidos extra-renais também se verifica uma regulação ainda que diferente pois estes não contêm recetores para a PTH⁵. A principal forma de regulação que se evidencia neste caso é através da disponibilidade de substrato⁵.

1.4. Doseamento

1.4.1. 1,25-(OH)₂D

No que toca à concentração do metabolito 1,25-(OH)₂D, este encontra-se na sua grande maioria dentro dos limites de normalidade havendo apenas desvios em casos excecionais de algumas patologias associadas⁵. De uma forma geral, em casos de excesso recorre-se a mecanismos de degradação para baixar a concentração da 1,25-(OH)₂D ou caso se verifique o oposto, isto é, houver a necessidade de aumentar a sua concentração o organismo recorre a feedbacks que o proporcionam através da conversão da 25-OHD a 1,25-(OH)₂D⁵. Sempre que ocorrem desvios a este equilíbrio são graves as complicações que podem advir⁵.

Os distúrbios que podem estar associados à síntese da 1,25-(OH)₂D, não implicam uma disfunção na concentração da 25-OHD⁵. Entre alguns distúrbios que podem ocorrer, maioritariamente o problema reside na enzima de síntese, CYP27B1^{5,16}. Um bom exemplo desta situação é na patologia rara raquitismo dependente de vitamina D tipo I, causada pela mutação que inativa a enzima CYP27B1 e leva a uma patologia de raquitismo de início precoce e a síndromes de hipofosfatemias⁵. Outro distúrbio que pode levar a concentrações anormais de calcitriol são as mutações no VDR, que o inativam ou o tornam menos responsivo ao seu substrato, neste caso temos o exemplo do raquitismo dependente de vitamina D tipo II^{5,16}. O recetor torna-se insensível ao substrato e leva a episódios de hipocalcemia e raquitismo de início precoce⁵. Por fim, outro distúrbio que pode levar a uma concentração

neste caso excessiva é a conversão extra-renal exagerada que provoca que altas concentrações da 1,25-(OH)₂D saiam para o espaço extracelular e conseqüentemente para a circulação sistêmica verificando-se um aumento desta concentração⁵. Algumas situações clínicas que se caracterizam por esta disfunção são a sarcoidose, tuberculose, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal entre outras⁵. É por isso de extrema importância haver uma medição dos níveis de 1,25-(OH)₂D⁵.

1.4.2. 25-OHD

Os níveis baixos de 25-OHD observados na população e suas implicações clínicas são considerados atualmente uma problemática de saúde pública¹¹. A identificação deste problema é cada vez mais importante pelo número crescente de estudos que têm sido efetuados que demonstram uma associação entre níveis baixos de vitamina D e o aumento da incidência e progressão de uma vasta gama de doenças¹⁴. Dado a quantidade de suplementos que se encontram disponíveis para o tratamento desta deficiência é importante haver um diagnóstico adequado^{11,17}. Apesar da 25-OHD ser considerada por clínicos como o biomarcador determinante dos níveis de vitamina D, atualmente ainda não se chegou a um consenso sobre os intervalos desejáveis para este metabolito sendo necessário haver uma extrapolação para cada indivíduo, pois, uma enormidade de fatores devem ser considerados^{10,17}. As diretrizes de classificação dos níveis de vitamina D do *Institute of Medicina (IOM)* diferem das diretrizes da *Endocrine Society*¹⁰. O IOM concentra-se na população geral saudável e em apenas ensaios clínicos considerando que níveis superiores a 20 ng/ml são suficientes para garantir a saúde esquelética¹⁰. Já a *Endocrine Society* concentra-se em pessoas com alto risco de deficiência de vitamina D avaliando estudos experimentais e estudos observacionais considerando como dose recomendada valores a acima de 30 ng/ml¹⁰.

1.5. Fatores Condicionantes

A vitamina D varia ciclicamente ao longo do ano em relação a fatores genéticos e fatores ambientais¹⁷. Entre os quais devem ser considerados a exposição solar, época do ano, etnia, idade, índice de massa corporal (IMC), défices nutricionais, terapêuticas recorrentes, patologias antecedentes e tipo de ensaio utilizado^{11,17}.

A exposição solar é considerada a maior fonte de vitamina D para os humanos, sendo influenciada pela latitude, tempo de exposição e hora do dia em que essa exposição acontece e pela estação do ano¹¹. Quando comparada a exposição solar atualmente com aquela que acontecia a alguns anos atrás verificamos uma grande diminuição, fortemente associada aos postos de trabalho que maioritariamente nos dias de hoje são em ambientes fechados e implicam trabalhar até mais tarde ou pela reduzida atividade que acontece ao ar livre^{11,17}. No caso dos países com latitudes mais elevadas há uma redução da possibilidade de horas em

exposição solar, apresentando-se nestes casos uma tendência para hipovitaminoses D em países do Norte da Europa comparativamente aos do Sul¹⁵. Por outro lado, o excessivo uso de protetores solares que podem reduzir até mais de 95% da absorção de UVB quando usada um fator de proteção 30^{17,18}. No que diz respeito à estação do ano, há estudos que demonstram uma variação significativa entre as quatro estações, contudo a hipovitaminose D mantém-se prevalente em todas elas¹¹.

Também a pigmentação da pele foi associada em diversos estudos a uma deficiência em vitamina D, estando as pessoas com maior pigmentação de pele mais protegidas por radiação UVB e dessa forma mais dificilmente ocorre síntese por radiação solar¹⁷. Estudos demonstram ainda que americanos de maior pigmentação apresentam menores concentrações de DBP em comparação com americanos caucasianos¹⁷. Concentração de proteínas DBP está fortemente relacionada com níveis de 25-OHD, em que concentrações altas de DBP são sugestivas de concentrações elevadas deste metabolito¹⁷.

Muita especulação tem surgido em torno de pacientes internados, bem como pessoas acamadas ou com uma atividade funcional limitada^{11,15}. É por isso relevante considerar a idade numa avaliação dos níveis de vitamina D, em que as idades mais avançadas apresentam maior risco de surgimento destas limitações anteriormente referidas^{11,15}.

Outro facto que pode ser relevante é a terapêutica de cada indivíduo¹¹. A polimedicação pode influenciar o metabolismo da vitamina D, estando os antiepiléticos, os antirretrovirais, glucocorticoides e diuréticos incluídos nesses fármacos que induzem o aumento do risco de hipovitaminoses D^{11,15}.

Défice de vitamina D pode ainda estar fortemente relacionado com várias patologias¹⁵. Doentes com Insuficiência Renal Crónica (IRC) avançada apresentam uma deficiência comum em vitamina D, principalmente em indivíduos caucasianos¹⁹. A baixa produção de calcitriol é explicada pela redução da filtração glomerular e perda de CYP27B1, resultando numa maior perda de proteínas de ligação à vitamina D que reduzem a quantidade de substrato (25-OHD)^{11,15,19}. Associado à IRC há uma complicação comum, o hiperparatiroidismo secundário (HPTS)²⁰. Tanto o hiperparatiroidismo primário (HPTP) como o HPTS são caracterizados pelo funcionamento excessivo das glândulas paratiroides, havendo uma superprodução da hormona paratiroide (PTH)^{20,21}. Esta superprodução provoca um distúrbio sistémico, com renovação óssea e calcificação vascular, potenciando riscos de fraturas ósseas e problemas cardíacos²⁰. Estudos demonstram que níveis baixos de vitamina D estão muitas vezes associados a níveis elevados de PTH^{15,22}.

Há ainda vários estudos que demonstram uma associação desta deficiência com neoplasias malignas, osteoporose, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes como esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico, esclerose sistémica, artrite reumatóide, diabetes mellitus^{11,14,15}. As doenças autoimunes são caracterizadas pela perda de homeostase imunológica resultando no reconhecimento alterado e na destruição de tecidos do organismo

por células imunológicas auto-reativas²³. A hipovitaminose D é um achado comum nas doenças autoimunes, contudo ainda é inconclusiva uma relação, não sabendo ao certo se é uma consequência ou uma causa⁶. Há diversos estudos sobre o tema e sobre um possível efeito da suplementação de vitamina D nestes pacientes não havendo ainda um consenso entre todos⁶. Também a insuficiência hepática pode ser uma forte causa de hipovitaminose D, visto ser neste órgão onde ocorre a primeira hidroxilação e consequente formação de 25-OHD¹¹.

Estudos têm sido efetuados em grávidas e lactantes, onde são relatados vários episódios de deficiência de vitamina D, podendo crianças vir a sofrer de retardo no crescimento e deformidades esqueléticas ainda em idades mais jovens ou em idades mais avançadas com o aumento do risco de vir a desenvolver fraturas^{5,7}. Na Suíça é recomendado em casos de hipovitaminose D suplementação durante os primeiros 3 anos de vida, bem como no inverno para crianças mais velhas²⁴. Contudo estudos demonstram que são poucas as prescrições de suplementação por parte dos pediatras para crianças com idade superior a 3 anos²⁴.

De uma forma geral podemos apontar ainda como causas de uma diminuição da biodisponibilidade da vitamina D situações como má absorção de gorduras, obesidade e dieta pobre em alimentos com alto teor de vitamina D^{11,15}. No caso específico de Portugal e da maioria dos países da Europa existem poucos alimentos enriquecidos com vitamina D, devido à implementação de leis que proibiram o enriquecimento de alimentos com esta hormona após surto de intoxicação ocorrido nos anos 50¹⁸. Por outro lado, a crescente popularidade em dietas vegetarianas que afetam adversamente a saúde óssea pela ingestão inadequada da proteína animal, cálcio e vitamina D pode induzir o aumento da população que sofre de hipovitaminose D^{17,25}. É por isso fundamental a devida suplementação neste tipo de situações¹⁷.

1.6. Toxicidade

Devido a uma consciencialização da comunidade médica dos problemas que uma hipovitaminose D pode acarretar e do modo como toda a população num geral pode estar afetada, o teste de vitamina D tornou-se bastante recorrente e consequentemente uma maior incidência de casos suplementados¹⁴. Esta situação pode levar a episódios de intoxicação por vitamina D ou hipervitaminose D²⁶. Esta toxicidade da vitamina D (VDT) é rara, mas com efeitos sérios se não forem identificados a tempo²⁶. A VDT pode ser exógena ou endógena, no primeiro caso geralmente é causada pela ingestão inadvertida ou inadequada de doses altas de fármacos de vitamina D²⁶. No segundo caso, VDT endógena pode advir de uma produção excessiva dos metabolitos 25-OHD e 1,25-(OH)₂D²⁶. Quando se fala em intoxicação por vitamina D caracteriza-se por concentrações séricas de 25-OHD superiores a 150 ng/ml e concentrações normais ou ligeiramente aumentadas de 1,25-(OH)₂D²⁶. Alguns dos sintomas que podem surgir nesta condição são confusão, apatia, vômitos recorrentes, dor abdominal, poliúria, polidipsia e desidratação²⁶.

A VDT e hipercalcemia grave, que é uma das suas manifestações clínicas, estão inteiramente associadas à ingestão excessiva de vitamina D durante um longo prazo, à disfunções da via metabólica da vitamina D ou à presença de uma patologia produtora do metabolismo ativo desta hormona^{17,26}.

1.7. Metodologias de doseamento

No que diz respeito à medição da concentração de vitamina D, tanto o IOM como a *Endocrine Society* consideram o rastreio a nível da população geral desnecessária, aconselhando somente o rastreio dentro dos grupos de risco^{5,7,8,14}. Grupos de risco são considerados os obesos, mulheres grávidas e lactantes, indivíduos com pigmentação mais escura, idosos, pacientes com patologias anteriormente referidas e pacientes com a prescrição referida⁵.

Em 2010 foi promovido o *Vitamin D Standardization Programme* (VDSP), com vista à padronização das medições laboratoriais e dessa forma reduzir a variabilidade que ocorre nas medições de vitamina D¹⁷. O VDSP concentra-se no monitoramento do desempenho e creditação de laboratórios que estejam envolvidos em testes de vitamina D, ao mesmo tempo que desenvolve um sistema padrão de medição de referência, que visa a calibração dos aparelhos de laboratórios clínicos¹⁷.

Existe uma necessidade de padronizar os ensaios pela grande variabilidade de metodologias e pela discrepância que existe muitas vezes dentro destas metodologias principalmente em concentrações mais baixas¹⁷. Têm sido efetuados estudos com o objetivo de comparar as várias metodologias tentando perceber qual o mais vantajoso para cada tipo de metabolito¹⁷.

1.7.1. 25-OHD

No que respeita à medição da concentração de 25-OHD, há duas metodologias dominantes^{5,14,17}. O imunoensaio automatizado, considerado o ensaio utilizado pela maioria dos laboratórios, e a cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa tandem (LC-MS/MS)⁵. Entre estes dois métodos existe uma boa correlação no que respeita a indivíduos saudáveis, contudo tal não se verifica em pacientes que apresentem patologias associadas ou condições clínicas desfavoráveis⁵. Como tal têm surgido uma enorme quantidade de estudos que abordam as limitações dos imunoensaios automatizados⁵.

Entre alguns dos problemas recorrentes deste método estão a falta de preparação da amostra que permitem o aparecimento de interferências, a reatividade cruzada e as concentrações diferentes da proteína DBP^{5,17}. Estas proteínas encontram-se alteradas em certas populações como gestantes, pacientes em terapia intensiva e pacientes com insuficiência hepática⁵.

O LC-MS/MS é o método preferível para um contexto clínico pela padronização, consistência e precisão^{5,17}. Contudo este método é mais complexo e caro, necessitando de técnicos

altamente qualificados para esta metodologia e sem que haja uma adaptação da própria técnica não consegue distinguir o 25-OHD do seu epímero^{5,17}. As maiores diferenças que residem nestes dois métodos é a reatividade cruzada que ocorre nos imunoenaios, podendo apresentar uma variabilidade de 15% da realidade enquanto os ensaios LC-MS/MS apresentam menos de 10%¹⁷.

1.7.2. 1,25-(OH)₂D

Em muitos laboratórios já se recorre à medição de outros metabolitos da vitamina D que dão igualmente informações importantes quanto ao metabolismo desta hormona^{5,14,17}. No caso da 1,25-(OH)₂D é considerado clinicamente essencial para poder ser descoberta uma possível causa de hipercalcemia¹⁶. Este metabolito é difícil de dosar pelas suas peculiares características, circula em concentrações picomolares com meia vida de aproximadamente 4 horas, é lipofílico e muito instável^{16,17}. Há por isso a necessidade de processos mais especializados de medição com manipulação prévia da amostra¹⁷.

Inicialmente usava-se um radioensaio, que foi completamente ultrapassado pelos imunoenaios devido a capacidade destes em medir baixas concentrações pela natureza amplificadora inerente a estas técnicas⁵. Contudo métodos de imunoensaio apresentam uma alta reatividade cruzada para outros metabolitos de vitamina D¹⁶. Outro método muito referenciado é o LC-MS/MS, apesar da baixa sensibilidade que confere¹⁶. Este método tem sido alvo de estudo com o interesse de aumentar a sensibilidade e especificidade, recorrendo-se à transformação química⁵. Uma transformação química possível é a derivatização da vitamina D que resolveria o grande problema desta medição, a baixa eficiência de ionização^{5,16}. Assim, o método apresentaria limites de quantificação mais baixos, sendo possível medir menores quantidades de analito⁵. Contudo, apesar de ficar uma molécula mais facilmente ionizável este processo de derivatização é demorado e exige um grande volume de amostras¹⁶.

1.7.3. 24,25-(OH)₂D e outros Metabolitos

Outro metabolito que pode ser bastante útil quantificar pelos motivos anteriormente referidos é o 24,25-OH₂D, apresentando-se também em baixas concentrações na circulação⁵. O método por excelência é o método LC-MS/MS, mas com melhoramentos adicionais, entre eles a transformação química por derivatização é uma boa opção⁵. Tanto na medição de 24,25(OH)₂D como na medição de 1,25-(OH)₂D é necessário torná-la mais específica, pois, o método padrão de LC-MS/MS é pouco sensível para esta quantificação⁵. Estudos adicionais devem ainda ser efetuados para uma melhor comparação⁵.

Geralmente análises de 24,25-(OH)₂D incorporam análise de outros metabolitos adicionais da vitamina D que poderiam ser considerados como possíveis interferências⁵. Ainda não se sabe

ao certo a sua importância, contudo a sua incorporação no método de LC-MS/MS permite que estes não interfiram na quantificação de outros metabolitos⁵.

2. Objetivo

Sabe-se atualmente que níveis de vitamina D tem implicações clínicas que vão além do metabolismo do cálcio e fósforo. Vários estudos levantam um papel da vitamina D em diversas patologias como doenças autoimunes, vasculares, inflamatórias, neurodegenerativas e neoplasias. Mulheres grávidas com níveis baixos de vitamina D podem acarretar complicações para o feto como retardo no crescimento e deformações esqueléticas. Por estas razões, tem sido evidente um crescente interesse no doseamento desta hormona.

Estudos retrospectivos com a análise dos doseamentos de vitamina D têm sido efetuado por vários países, entre os quais países de elevada latitude onde a incidência de radiação UVB se torna reduzida. Nestes ao contrário do que acontece na maioria dos países da europa há na sua dieta alimentos enriquecidos com vitamina D e grande parte da população encontra-se medicada com suplementos. Em Portugal os estudos com a análise de doseamentos de vitamina D são escassos e com bastantes limitações. Há por isso a necessidade de mais estudos em que sejam avaliados fatores que influenciem níveis mais baixos de vitamina D.

Atualmente ainda não há um consenso quanto a uma enormidade de questões relacionados com a vitamina D. Níveis de suficiência ainda hoje são discutidos, sem que haja um valor universalmente definido como suficiente. Assim como metodologias de doseamento desta hormona, sabe-se agora que o método recomendado é LC-MS/MS, contudo esta metodologia é bastante complexa e pouco prática em laboratórios de diagnóstico. Há por isso uma grande necessidade de debater esta temática de forma mais rigorosa e mais aprofundada.

O objetivo deste projeto de investigação é avaliar esta problemática de caris mundial, recorrendo a um estudo retrospectivo da análise dos doseamentos de vitamina D na população em causa. Observar através dos doseamentos se a população se encontra dentro dos valores ditos suficientes ao mesmo tempo que se tenta fazer um paralelismo com os restantes estudos que demonstram que esta carência é transversão a toda a população. Verificando ainda um conjunto de variáveis que possam estar a influenciar esses baixos níveis. Por fim, evidenciar que défices desta hormona podem provocar sérias complicações clínicas devendo este problema ser encarado como uma problemática de saúde pública.

3. Materiais e Métodos

3.1. Quantificação de 25-OHD

Para avaliação dos níveis de vitamina D o melhor indicador é a 25-OHD, a principal forma circulante de vitamina D com uma meia vida de 2 a 3 semanas e não é regulada pela PTH^{18,27}. A 25-OHD é, portanto, o reflexo das reservas que o organismo apresenta de vitamina D¹⁸.

3.2. Imunoensaio de Eletroquimioluminescência

O metabolito 25-OHD total em soro humano foi detetado quantitativamente recorrendo a um imunoensaio de eletroquimioluminescência no equipamento Cobas® 6000 (Roche)²⁸.

O teste baseia-se na ligação existente da vitamina D (D2 e D3) a uma proteína recombinante DBP^{28,29}. Pela presença de um anticorpo monoclonal específico o método consegue bloquear a reatividade cruzada exercida pela 24,25-(OH)₂D²⁸. Com uma duração total de 27 minutos e usando um princípio de competição, o teste consiste em 3 incubações com propriedades diferentes^{28,29}. Inicialmente a amostra é incubada com um reagente de pré-tratamento 1 e 2 fazendo com que a 25-OHD liberte a sua proteína de ligação^{28,29,30}. A segunda incubação ocorre quando a amostra é tratada com proteínas de ligação da vitamina D que são marcadas com rutério, havendo a formação de um complexo (25-OHD com proteína rutenilada)^{28,29}. Na terceira incubação ocorre a adição de vitamina D biotinizada e micropartículas revestidas por estreptavidina^{28,29}. Todas as proteínas de ligação ruteniladas que não ligaram formam um complexo com a vitamina D biotinizada^{28,29}. Este complexo liga-se ainda às micropartículas pela interação entre a biotina e a estreptavidina^{28,29}. Por fim, numa fase final do teste a mistura é aspirada para a célula de leitura³⁰. As micropartículas ficam fixas à superfície do eletrodo por forças magnéticas e tudo o que não ligou é eliminado por soluções de lavagem³⁰. É o fotomultiplicador que mede a quimioluminescência emitida pela aplicação de corrente elétrica ao eletrodo e permite que haja um resultado final que segue uma curva de calibração que foi produzida pelo analisador³⁰.

Os reagentes essenciais a este teste são de um modo geral o reagente de pré-tratamento 1 e 2, o primeiro com Ditiotreitól e o segundo com Hidróxido de sódio; as micropartículas revestidas com estreptavidina; proteína de ligação da vitamina D marcada com rutério e a 25-OHD com biotina³⁰.

3.3. Níveis de vitamina D

O *Institute of Medicine* (IOM) define como deficiência os valores abaixo de 20 ng/ml e insuficiência valores entre 21 e 29 ng/ml¹⁸. Considera-se, portanto, como suficiência os valores acima de 30 ng/ml.

3.4. População em Estudo

Levantamento de todos os doseamentos de vitamina D (25-OHD) que foram efetuados no SPC no CHUCB durante 4 anos, estando compreendidos entre 01 de janeiro de 2015 até 31 de dezembro de 2018. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética do CHUCB, processo número 89/2018, e durante toda a análise foram respeitados os princípios éticos.

3.5. Análise estatística

As variáveis analisadas em cada pedido foram o número do processo; número do pedido; sexo; idade; data da colheita e serviço de onde é efetuado o pedido. Na população que compreende as idades 19 a 35 anos foi ainda avaliado o diagnóstico.

A variável sexo foi subdividida em sexo feminino e sexo masculino. A idade foi avaliada como valor absoluto, mas também foi categorizada em 5 grupos, crianças até aos 5 anos; dos 6 aos 18 anos; dos 19 aos 35 anos; dos 36 aos 65 anos e por fim a partir dos 66 anos. A data de colheita foi categorizada em meses e em estações do ano. Neste último caso considerou-se inverno os meses janeiro, fevereiro e março; primavera os meses de abril, maio e junho; verão os meses julho, agosto e setembro e outono os meses outubro, novembro e dezembro. A variável serviço onde se efetua o pedido é dividida inicialmente em consulta e internamento e posteriormente faz-se uma análise da especialidade de onde é feito o pedido. Em pacientes com 19 a 35 anos foram ainda consultados pela Dr.^a Emília Krasteva (patologista clínico) os diagnósticos que suscitaram o pedido através do SClínico Hospitalar.

Todos os dados foram analisados através do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 25). As variáveis em estudo são caracterizadas pela percentagem ou contagem, média, mediana, erro do desvio e percentis 25 e 75. Pela distribuição da amostra não apresentar uma normalidade os testes usados serão não paramétricos, neste caso o teste de *Mann-Whitney* e o teste de *Kruskal-Wallis*. Recorre-se ainda a uma correlação de *Pearson*. No estudo houve significância estatística para valores de $p < 0,001$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da População

No total dos 4 anos de estudo foram registados 15968 doseamentos de vitamina D, sendo que 3317 (20,77%) foram do ano 2015, 4547 (28,48%) do ano 2016, 4198 (26,29%) do ano 2017 e 3906 (24,46%) do ano 2018. Obteve-se uma amostra final de 9060 doseamentos, correspondendo cada doseamento a um paciente diferente. Todos os doseamentos descartados pertenciam aos mesmos pacientes que apresentavam vários pedidos ou a controlos de qualidade.

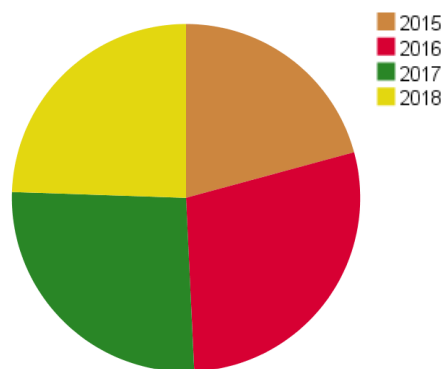


Figura 3: Percentagem dos pedidos de doseamento de vitamina D para os 4 anos.

Avaliou-se o número de pedidos para o sexo feminino e para o sexo masculino e evidenciou-se um aumento no caso do sexo feminino com 5676 (62,65%) pedidos enquanto que o sexo masculino registou 3384 (37,35%) pedidos.

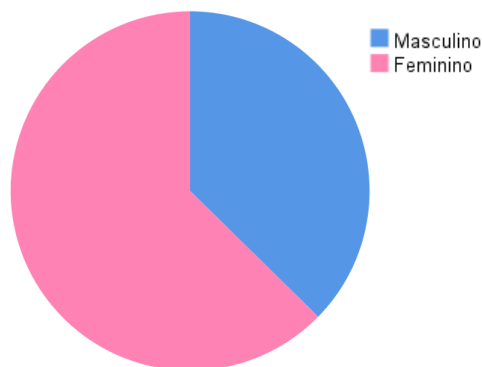


Figura 4: Percentagem dos pedidos de doseamentos de vitamina D para o sexo feminino e sexo masculino.

A amostra apresenta uma larga distribuição relativamente à idade a variar de 1 ano aos 101 anos, com uma média de $62,30 \pm 19,46$ anos e mediana de 65,00 anos (51,00 - 77,00). Verificou-se uma prevalência dos pedidos em idades mais avançadas com o grupo de pessoas dos 36 aos 65 a apresentar 3606 (39,80%) pedidos e o grupo de pessoas a partir dos 66 aos a apresentar 4508 (49,76%) pedidos. Em oposição, grupos de menor idade apresentam menor número de pedidos, grupo de crianças até aos 5 anos obtiveram 42 (0,46%) pedidos, grupo de pessoas dos 6 aos 18 anos obtiveram 295 (3,26%) pedidos e grupo de pessoas dos 19 aos 35 anos obtiveram 609 (6,72%) pedidos.

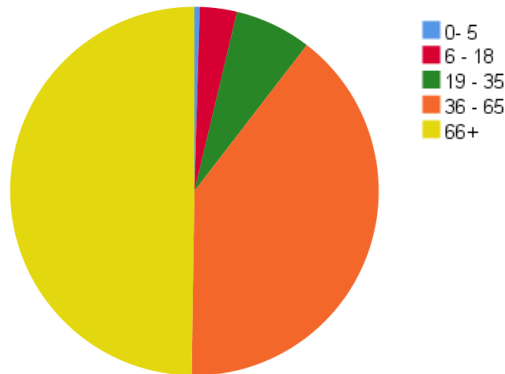


Figura 5: Percentagem de pedidos de doseamento de vitamina D para os diferentes grupos de idades.

Na análise de pedidos por estação de ano, não houve diferenças relevantes entre os grupos. No inverno registaram-se 2360 (26,05%) pedidos, na primavera 2291 (25,29%), no verão 2264 (24,99%) e no outono 2145 (23,68%).

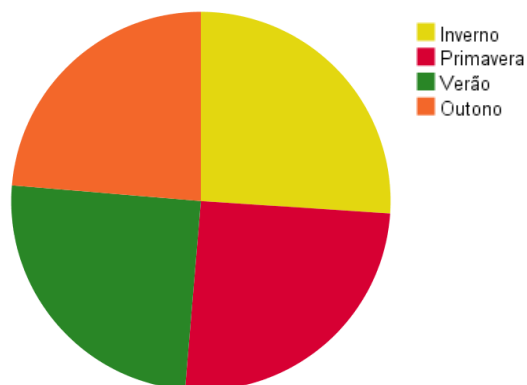


Figura 6: Percentagem de pedidos de doseamentos de vitamina D para as diferentes estações do ano.

A homogeneidade dos pedidos verificada nas estações do ano é reflexo do panorama evidenciado nos meses. Em janeiro registaram-se 811 (8,95%) pedidos de doseamento de vitamina D, em fevereiro 732 (8,08%), em março 817 (9,02%), em abril 747 (8,25%), em maio 739 (8,16%), em junho 805 (8,89%), em julho 758 (8,37%), em agosto 679 (7,49%), em setembro 827 (9,13%), em outubro 827 (9,13%), em novembro 743 (8,20%) e em dezembro 575 (6,35%).

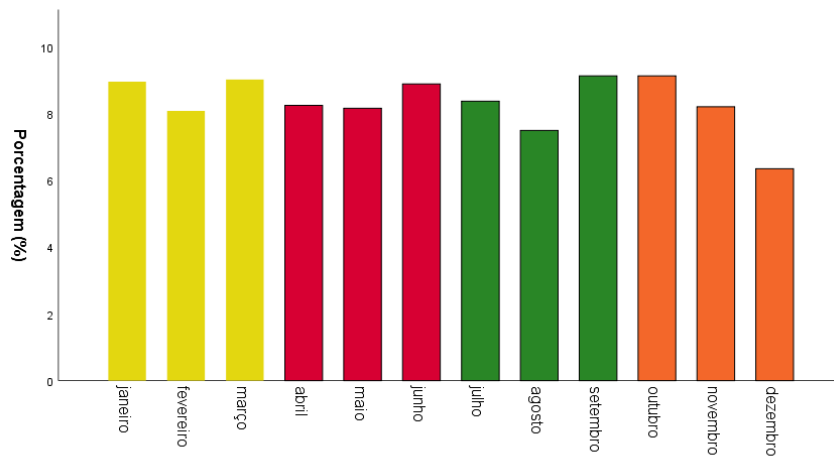


Figura 7: Percentagem de pedidos de doseamentos de vitamina D para os diferentes meses.

Nos pedidos de doseamento de vitamina D observou-se uma tendência para pedidos da consulta com 7045 (77,76%) doseamentos efetuados. Enquanto que no internamento observaram-se 2015 (22,24%) doseamentos.

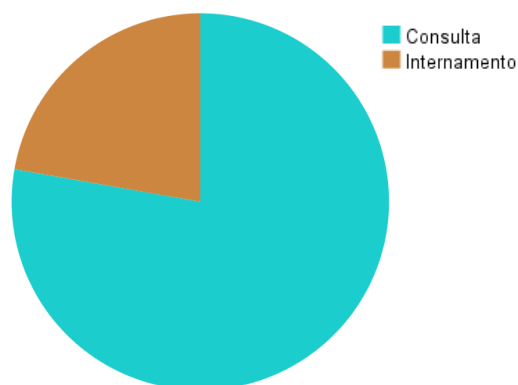


Figura 8: Percentagem de pedidos de doseamentos de vitamina D para o internamento e consulta.

Há uma grande distribuição de pedidos nos vários serviços, sendo que o serviço de medicina (Med.) representa a grande maioria com 3075 (33,94%) pedidos. Os restantes pedidos distribuíram-se por serviço de diabetologia (Diabe.) com 1073 (11,84%) pedidos; serviço de reumatologia (Reu.) com 923 (10,19%) pedidos; pacientes do centro de saúde (C.S.) com 772 (8,52%) pedidos, serviço de pneumologia (Pneu.) com 440 (4,86%) pedidos, serviço de cardiologia (Cardio.) com 241 (2,66%) pedidos, serviço de neurologia (Neu.) com 239 (2,64%) pedido; serviço de gastroenterologia (Gastro.) com 224 (2,47%) pedidos, serviço de imunohemoterapia (I. hem.) com 161 (1,78%) pedidos, serviço de nefrologia (Nef.) com 127 (1,40%) pedidos, serviço de pediatria (Ped.) com 125 (1,38%) pedidos, serviço de planeamento familiar (P.F.) com 120 (1,32%) pedido e serviço de desmielinizantes (Desmi.) com 99 (1,09%) pedidos. Outros foram aqueles serviços cujo a percentagem de pedidos não excede 1% e, portanto, pouco conclusivos.

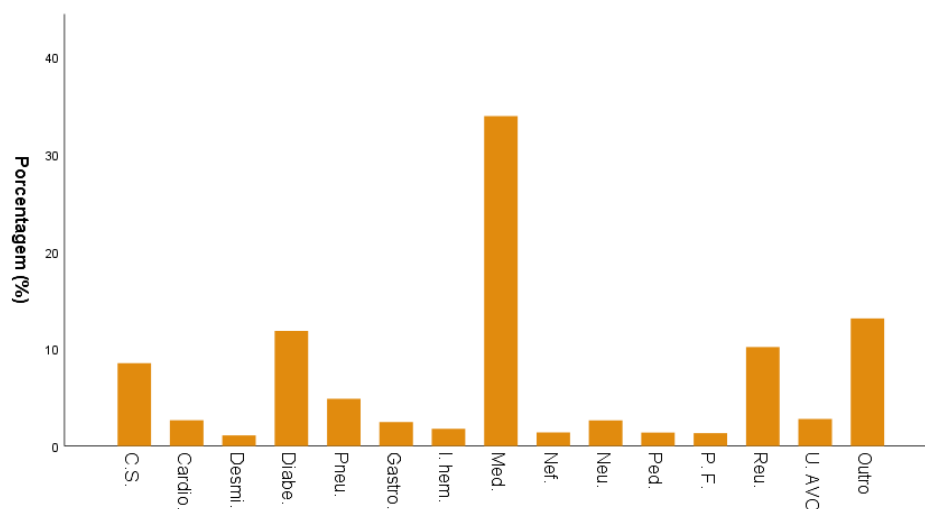


Figura 9: Percentagem de pedidos de doseamentos de vitamina D para os diferentes serviços.

Numa análise especificamente efetuada em pacientes entre 19 e 35 anos avaliaram-se os diagnósticos que motivaram o doseamento de vitamina D. A maioria dos pacientes (187, 30,70%) efetuou o doseamento como análise de rotina (A.R.), enquanto que 83 (13,60%) pacientes efetuaram o doseamento motivados pelo diagnóstico de doenças autoimunes (D. Autoimunes), 24 (3,90%) pelo diagnóstico de Asma ou Hipotireoidismo, 19 (3,10%) pelo diagnóstico de epilepsia ou hipertensão, 17 (2,80%) pelo diagnóstico de espondilartrite, 13 (2,10%) pelo diagnóstico de obesidade e 11 (1,80%) pelo diagnóstico de dislipidemias ou artralguas.

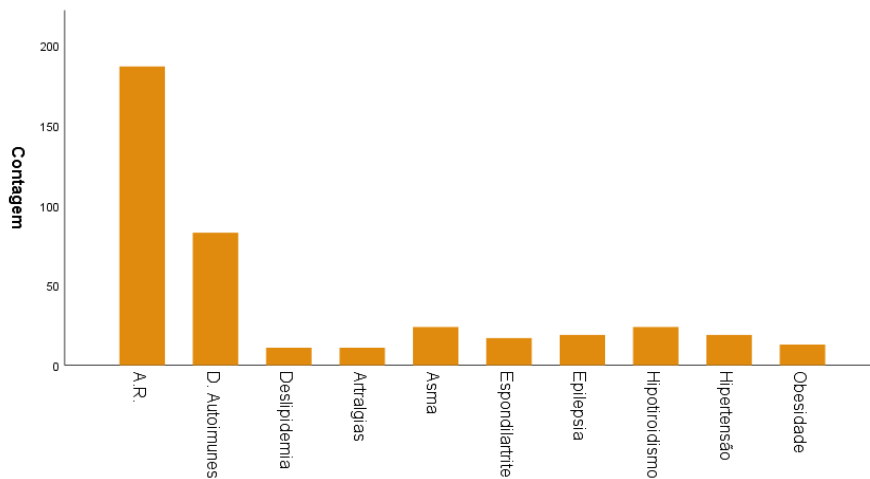


Figura 10: Contagem de pedidos de doseamentos de vitamina D para os diferentes diagnósticos.

4.2. Caracterização dos Níveis de Vitamina D

A vitamina D não segue uma distribuição normal, apresentando uma média de $18,13 \pm 10,53$ ng/ml e uma mediana de 16,60 ng/ml (10,30 - 24,20). Os doseamentos variaram entre 2,90 ng/ml e 127,10 ng/ml. O valor 2,90 ng/ml foi um valor atribuído sempre que o método não conseguia detetar valores, apresentando um limite de deteção de 3 ng/ml.

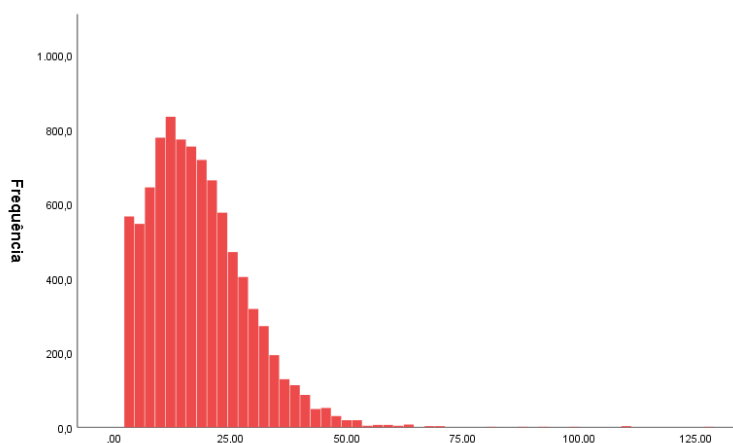


Figura 11: Frequência por cada doseamento de vitamina D.

Nesta análise, observou-se uma tendência para deficiência de vitamina D, sendo que 5654 (62,41%) das pacientes analisados apresentavam valores abaixo de 20 ng/ml. Também fora dos valores recomendados, 2113 (23,32%) pacientes apresentavam insuficiência de vitamina D. Em oposição, apenas 1293 (14,27%) dos pacientes apresentavam suficiência de vitamina D.

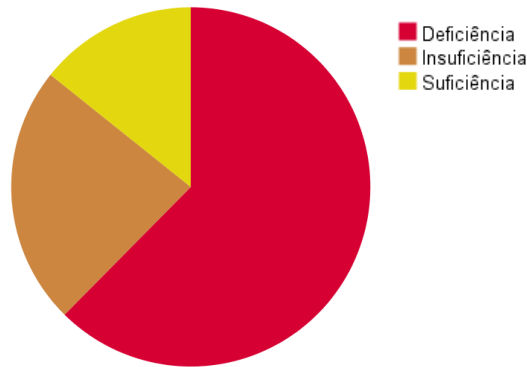


Figura 12: Percentagem para níveis deficientes, insuficientes e suficientes de vitamina D.

4.3. Análise dos Níveis de Vitamina D

Os níveis de vitamina D aumentaram desde o ano 2015 até ao ano 2017 e sofreram uma queda no ano 2018. O ano 2015 apresenta uma média de $15,63 \pm 10,81$ ng/ml e uma mediana de 13,60 ng/ml (7,40 - 21,60), o ano 2016 com uma média de $18,27 \pm 10,51$ ng/ml e uma mediana de 16,70 ng/ml (10,60 - 24,00), o ano 2017 com uma média de $21,02 \pm 10,39$ ng/ml e uma mediana de 19,80 ng/ml (13,20 - 27,40) e o ano 2018 com uma média de $18,52 \pm 9,22$ ng/ml e uma mediana de 17,20 ng/ml (11,80 - 23,50).

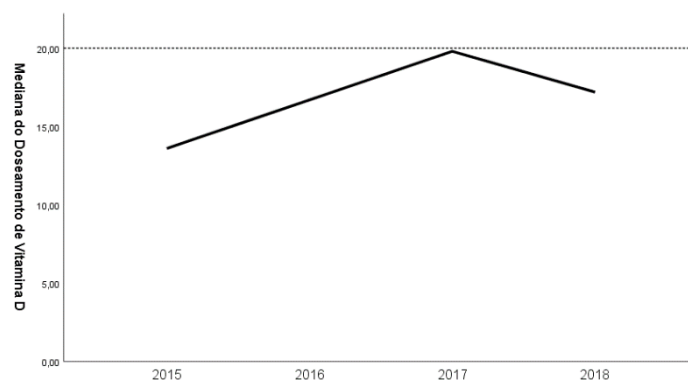


Figura 13: Mediana dos doseamentos de vitamina D ao longo dos anos. Linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência.

Obteve-se uma diferença significativa (* $P < 0,01$) quando comparados os doseamentos de vitamina D entre sexos, com o sexo masculino a apresentar valores de doseamento mais elevados que o sexo feminino. A média para o sexo masculino é $18,47 \pm 10,29$ ng/ml e a mediana é 17,20 ng/ml (10,90-24,40) enquanto para o sexo feminino a média é $17,92 \pm 10,67$ ng/ml e a mediana é 16,30 ng/ml (10,00 - 24,10).

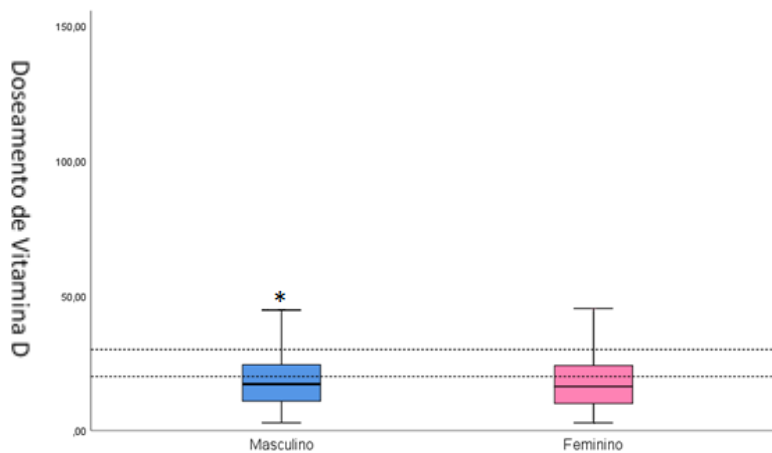


Figura 14: Comparação dos doseamentos de vitamina D no sexo masculino e feminino. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência. * significância em relação ao sexo feminino (* $P < 0,01$)

Nas idades verifica-se uma correlação negativa com os doseamentos de vitamina D, isto é, com o aumento da idade diminuem os doseamentos de vitamina D. Na análise entre a idade e o doseamento, demonstrou uma diferença estatística significativa ($P < 0,001$). Em crianças até aos 5 anos a média é $28,18 \pm 10,86$ ng/ml e a mediana é 26,65 ng/ml (18,35 - 35,48), no grupo de pessoas dos 6 aos 18 anos a média é $23,79 \pm 9,74$ ng/ml e a mediana é 23,10 ng/ml (17,20 - 29,40), no grupo de pessoas dos 19 aos 35 anos a média é $21,04 \pm 11,25$ ng/ml e a mediana é 19,40 ng/ml (13,20 - 26,85), no grupo de pessoas dos 36 aos 65 anos a média é $19,51 \pm 9,89$ ng/ml e a mediana é 18,20 ng/ml (12,50 - 25,20) e no grupo de pessoas a partir dos 66 anos a média é $16,16 \pm 10,53$ ng/ml e a mediana é 14,00 ng/ml (8,20 - 22,20).

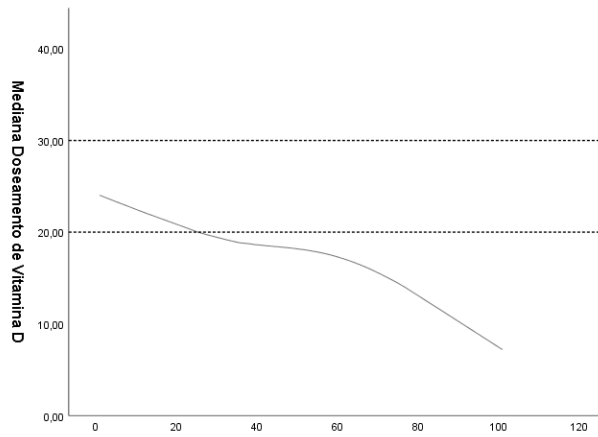


Figura 15: Correlação negativa entre os doseamentos de vitamina D e a idade ($P < 0,001$). Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência.

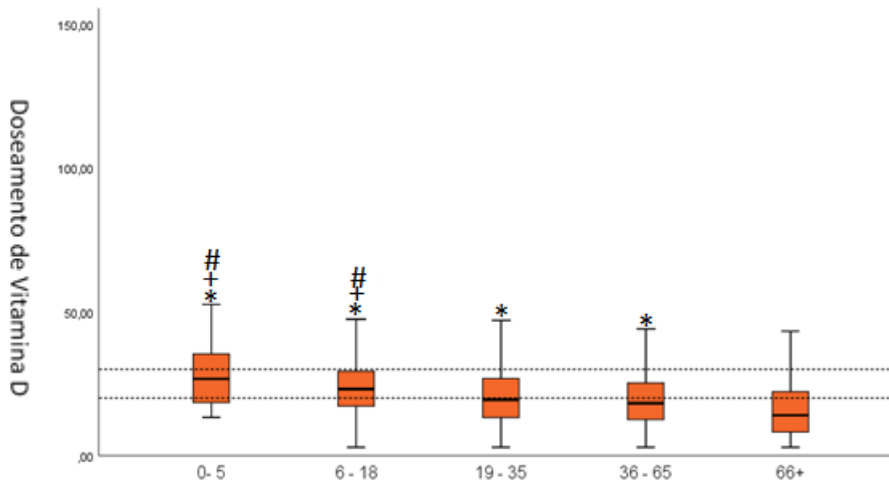


Figura 16: Comparação dos doseamentos de vitamina D com os grupos 1, 2, 3, 4 e 5. Grupo 1: 0-5 anos, grupo 2: 6-18 anos, grupo 3: 19-35 anos, grupo 4: 36-65 anos e grupo 5: mais de 66 anos. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência. * significância em relação ao grupo 5 ($*P < 0,001$); + significância em relação ao grupo 4 ($+P < 0,001$); # significância em relação ao grupo 3 (#grupo1 $P < 0,01$) (#grupo2 $P < 0,001$).

Nas estações do ano obtém-se uma análise estatística significativa ($P < 0,001$), com o verão e o outono a apresentarem os valores de doseamento de vitamina D superiores em relação as restantes estações do ano. No inverno obteve-se uma média de $16,49 \pm 10,18$ ng/ml e uma mediana de 14,65 ng/ml (9,10-21,90), na primavera obteve-se uma média de $17,41 \pm 10,21$ ng/ml e uma mediana de 15,60 ng/ml (9,70-23,10), no verão obteve-se uma média de $19,68 \pm 10,86$ ng/ml e uma mediana de 18,50 ng/ml (11,90-26,00) e no outono obteve-se uma média de $19,05 \pm 10,58$ ng/ml e uma mediana de 18,00 ng/ml (11,50-25,30).

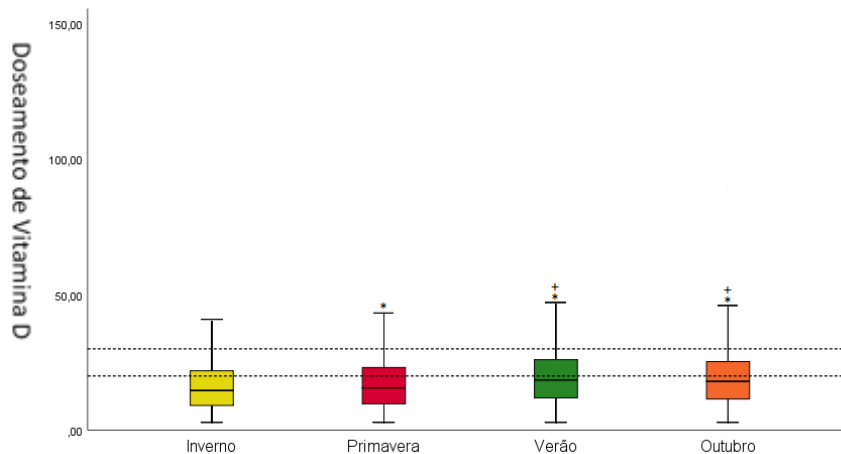


Figura 17: Comparação dos doseamentos de vitamina D com as estações do ano. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência. * significância em relação ao inverno (*primavera $P < 0,01$) (*verão, outubro $P < 0,001$); † significância em relação a primavera ($^*P < 0,001$).

Também os meses apresentam análise estatística significativa ($P < 0,001$) com os meses de agosto, setembro e outubro a apresentarem doseamento mais elevados comparativamente aos outros meses. No mês de janeiro obteve-se uma média de $16,83 \pm 9,84$ ng/ml e uma mediana de 15,40 ng/ml (9,60 - 22,60), no mês de fevereiro $16,21 \pm 9,67$ ng/ml e 14,25 ng/ml (8,80 - 21,98), no mês de março $16,40 \pm 10,93$ ng/ml e 14,10 ng/ml (9,00 - 21,25), no mês de abril $17,00 \pm 9,62$ ng/ml e 15,30 ng/ml (9,70 - 22,70), no mês de maio $17,27 \pm 10,73$ ng/ml e 15,00 ng/ml (9,30 - 22,60), no mês de junho $17,92 \pm 10,26$ ng/ml e 16,50 ng/ml (10,20-23,95), no mês de julho $18,01 \pm 10,30$ ng/ml e 16,65 ng/ml (10,38 - 24,40), no mês de agosto $20,54 \pm 10,80$ ng/ml e 19,40 ng/ml (12,70 - 27,10), no mês de setembro $20,51 \pm 11,25$ ng/ml e 19,40 ng/ml (12,60 - 26,80), no mês de outubro $20,37 \pm 10,66$ ng/ml e 19,60 ng/ml (12,70 - 26,40), no mês de novembro $18,16 \pm 10,97$ ng/ml e 16,80 ng/ml (10,60 - 23,80) e no mês de dezembro $18,30 \pm 9,73$ ng/ml e 17,10 ng/ml (11,30 - 24,10).

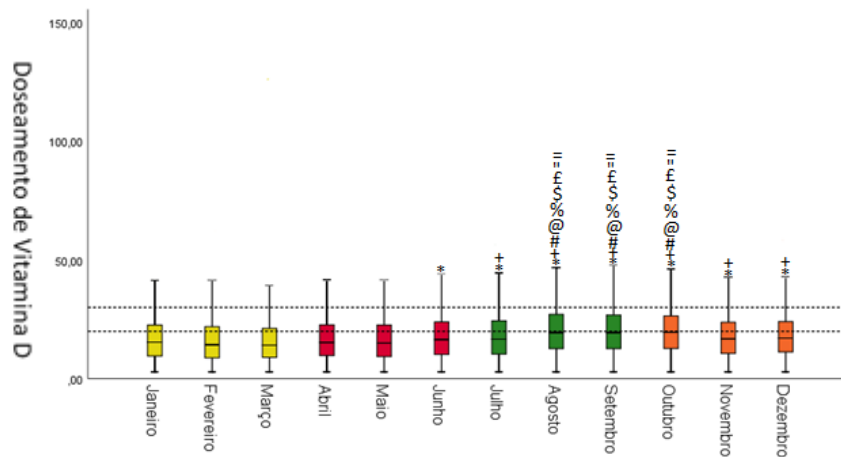


Figura 18: Comparação dos doseamentos de vitamina D em cada mês. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência.

* Significância em relação ao mês de março (*junho $P < 0,05$) (*julho, novembro, dezembro $P < 0,01$) (*agosto, setembro, outubro $P < 0,001$); + Significância em relação ao mês de fevereiro (+julho, novembro $P < 0,05$) (+dezembro $P < 0,01$) (+agosto, setembro, outubro $P < 0,001$); # significância em relação ao mês de janeiro (# $P < 0,001$); @ significância em relação ao mês de maio (@ $P < 0,001$); % significância em relação ao mês de abril (% $P < 0,001$); ^ significância em relação junho (^ $P < 0,001$); £ significância em relação ao mês de julho (£ $P < 0,001$); “ significância em relação ao mês de novembro (“ $P < 0,001$) e = significância em relação ao mês de dezembro (= $P < 0,05$).

Na análise estatística dos doseamentos de vitamina D para internamento e consulta obteve-se uma diferença significativa (* $P < 0,001$). O internamente apresentou níveis de vitamina D mais baixos, com uma média de $14,33 \pm 9,84$ ng/ml e uma mediana de 12,10 ng/ml (6,20 - 20,20), comparativamente com a consulta que apresentou uma média de $19,21 \pm 10,47$ ng/ml e uma mediana de 17,70 ng/ml (11,60 - 25,30).

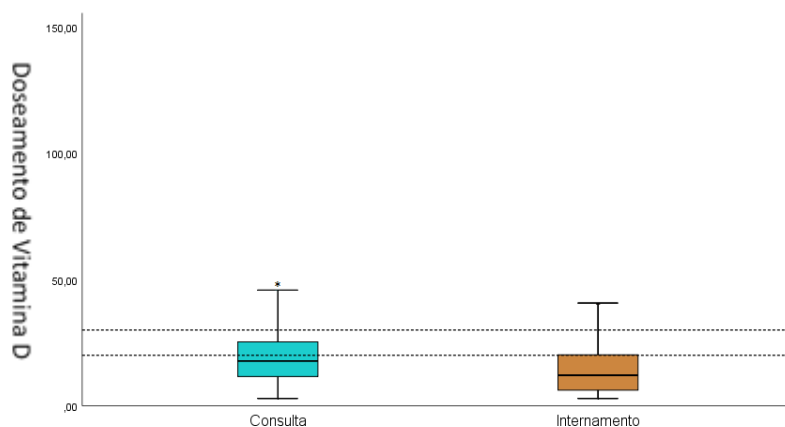


Figura 19: Comparação dos doseamentos de vitamina D com o internamento e consulta. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência.

* significância em relação ao internamento ($P < 0,001$).

O serviço que apresentou maior déficit de vitamina D, foi a imunohemoterapia (I. hem.) com uma média de $14,42 \pm 9,57$ ng/ml e uma mediana de 11,40 ng/ml (7,50 - 20,30). O serviço de medicina (Med.) obteve uma média de $16,66 \pm 10,36$ ng/ml e uma mediana de 15,10 ng/ml (8,70 - 22,50), bem como o serviço de diabetologia (Diabe.) que apresentou a média de $16,65 \pm 9,64$ ng/ml e a mesma mediana, 15,10 ng/ml (9,50 - 22,20), o serviço de gastroenterologia (Gastro.) obteve $16,37 \pm 9,60$ ng/ml e 15,20 ng/ml (9,00 - 22,78), o serviço de cardiologia (Cardio.) obteve $17,71 \pm 10,25$ ng/ml e 16,20 ng/ml (9,70 - 23,55), pacientes provenientes de centros de saúde (C.S.) obtiveram $19,30 \pm 9,75$ ng/ml e 17,80 ng/ml (12,20 - 25,40), o serviço de pneumologia (Pneu.) obteve $19,32 \pm 9,92$ ng/ml e 18,10 ng/ml (11,40 - 25,38), bem como o serviço de nefrologia (Nef.) que obteve $18,94 \pm 10,46$ ng/ml e 18,10 ng/ml (10,20 - 26,10), o serviço de neurologia (Neu.) obteve $19,42 \pm 10,03$ ng/ml e 18,60 ng/ml (12,20 - 26,00), o serviço de reumatologia (Reu.) obteve $22,23 \pm 11,43$ ng/ml e 20,90 ng/ml (14,20 - 28,90), o serviço de desmielinizantes (Desmi.) obteve $24,26 \pm 14,95$ ng/ml e 21,50 ng/ml (14,30 - 29,80), o serviço de planeamento familiar (P.F.) obteve $22,77 \pm 9,87$ e 22,10 ng/ml (15,83 - 30,13) e o serviço de pediatria (Ped.) obteve $25,55 \pm 11,25$ ng/ml e 23,80 ng/ml (17,35 - 32,05).

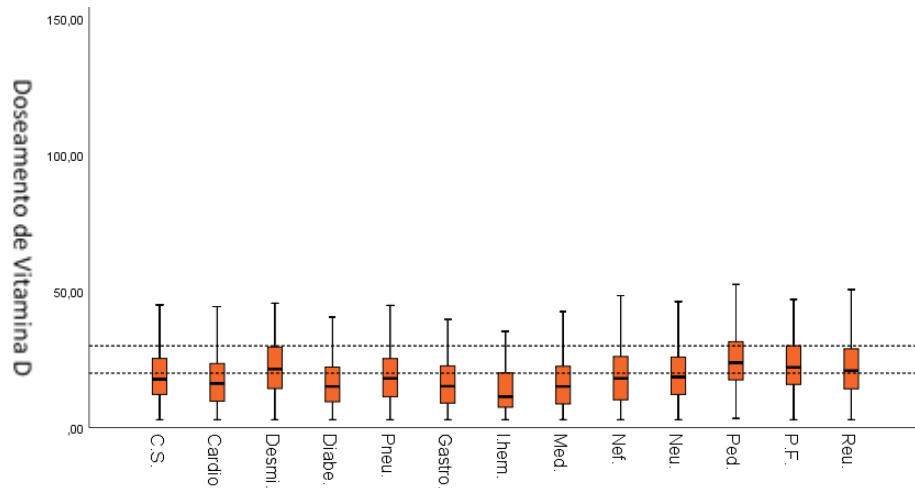


Figura 20: Comparação dos doseamentos de vitamina D nos vários serviços. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência.

Na análise dos vários diagnósticos evidenciou-se que o diagnóstico de epilepsia apresenta a mediana mais baixa com 13,60 ng/ml (9,90 - 26,30) e com a média de $17,42 \pm 9,85$ ng/ml. A obesidade com uma média de $14,65 \pm 5,67$ ng/ml e uma mediana de 14,10 ng/ml (10,55 - 18,50), hipertensão com $17,21 \pm 8,44$ ng/ml e 16,40 (10,40 - 20,20), hipotireoidismo com $18,32 \pm 9,82$ ng/ml e 17,35 ng/ml (12,28 - 23,83), asma com $20,55 \pm 10,27$ ng/ml e 18,35 (12,80 - 28,80), doenças autoimunes (D. Autoimunes) com $19,59 \pm 9,21$ ng/ml e 20,00 ng/ml (12,20 - 24,60), espondilite com $21,82 \pm 11,89$ ng/ml e 19,90 ng/ml (14,30 - 28,80), artralgias com $21,88 \pm 12,57$ ng/ml e 20,50 ng/ml (13,30 - 25,00), análises de rotina (A.R.) com $23,09 \pm 11,43$ ng/ml e 21,90 ng/ml (14,40 - 28,70) e dislipidemia com $24,88 \pm 12,08$ ng/ml e 25,20 (15,60 - 30,40).

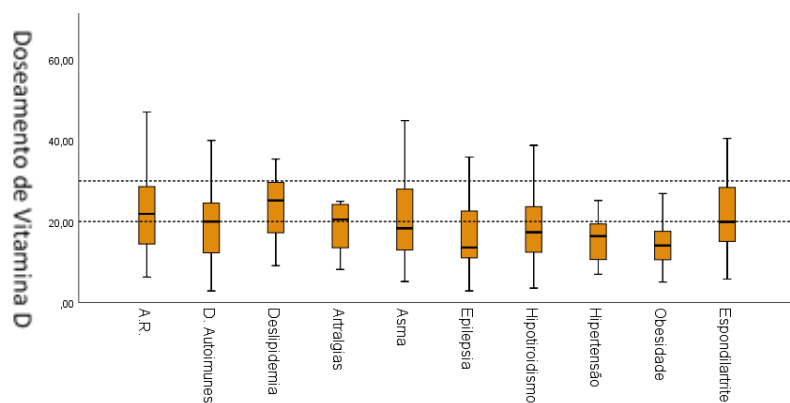


Figura 21: Comparação dos doseamentos de vitamina D nos vários diagnósticos. Primeira linha a tracejado (20,00 ng/ml) limita a passagem de deficiência para insuficiência e segunda linha a tracejado (30,00 ng/ml) limita a passagem de insuficiência a suficiência.

5. Discussão

A realidade que atualmente se vive em numerosas populações em todo o mundo dá conta de um crescente aumento de pedidos de doseamento de vitamina D, muito em causa pela crescente consciencialização do clínico dos efeitos do défice de vitamina D que vão muito além da perda óssea, sendo que essa deficiência se tornou de forma cada vez mais evidente uma problemática que afeta a grande maioria da população¹⁴. Também no presente estudo se demonstra uma elevada prevalência da deficiência em vitamina D relativamente às demais categorias, sendo que também a insuficiência se sobrepõem a valores de suficiência. Ao longo dos quatro anos do estudo o número de pedidos do doseamento de vitamina D foram sofrendo alterações ainda que pouco evidentes. Com o intuito de fazer face ao aumento dos pedidos, o CHUCB teve que implementar uma regra que limitava o intervalo de tempo entre doseamentos no mesmo paciente.

Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) pode-se verificar que nos relatórios efetuados anualmente há a indicação de que o ano 2017 está classificado como extremamente quente e extremamente seco, sendo o segundo ano mais quente desde 1931 com uma temperatura média de ar de 16,33°C³¹. É através da exposição à radiação UVB que ocorre a conversão do 7-deidrocolesterol a vitamina D3, sendo este processo dependente de calor¹⁰. Como tal, é plausível que no ano 2017 se tenha verificado um aumento dos níveis de vitamina D, ainda que com uma média a baixo dos valores recomendados. Dados indicam que quando a radiação UVB atinge a superfície da pele e encontra ainda a pré-vitamina D ou a vitamina D antes de chegar à circulação, estas são convertidas em espécies biologicamente inativas havendo um limiar de 15% de conversão do 7-deidrocolesterol a pré-vitamina D3, e sempre que este é ultrapassado ocorrem mecanismos que previnem a toxicidade desta hormona¹⁴. Por isso exposição prolongada de radiação UVB pode ser responsável pelos baixos níveis de vitamina D evidenciados num ano em que as elevadas temperaturas se fizeram sentir¹⁴.

Apesar de alguns estudos anteriormente efetuados refutarem esta ideia, há estudos que demonstram um dimorfismo sexual no doseamento de vitamina D que se realça pela observação de recetores VDR em tecidos reprodutores como os ovários, útero, próstata, testículo e esperma humano^{7,8,32,33}. Por outro lado, tem sido questionado o papel da vitamina D na gravidez e no feto, com evidências crescentes de que esta hormona pode ter um papel na redução das complicações obstétricas maternas havendo quem defenda um controlo deste parâmetro em grávidas bem como a suplementação em caso de défice¹². Deficiência de vitamina D na gravidez é ainda associada ao aumento do risco de desenvolver pré-eclâmpsia, uma patologia recorrente depois das 20 semanas de gravidez responsável pelo aumento da mortalidade materna e fetal^{14,34}. É por isso explicável o significativo aumento de pedidos no sexo feminino comparativamente com os pedidos no sexo masculino, sendo os níveis mais

baixos verificados no sexo feminino. Ensaios indicam que suplementação com vitamina D reduz a taxa de perda óssea em mulheres mais velhas²⁷. Apresentando este estudo uma população maioritariamente mais velha, e associando o aumento da idade a uma perda óssea pode-se inferir que os baixos níveis verificados no sexo feminino podem advir desta situação³⁵.

Concentrações elevadas de vitamina D estão associadas a uma idade jovem, peso corporal dentro das normas e estilo de vida saudável incluindo uma boa alimentação e exercício físico¹⁰. Contudo a maioria da população em estudo são pessoas com mais de 35 anos e principalmente com mais de 66 anos, o que de certa forma reflete uma percentagem de deficiência em vitamina tao elevada. A fraqueza muscular e a perda óssea associada à idade anteriormente referida potenciam um aumento do risco de quedas, fragilidade e perda de independência³⁵. Este aumento do risco de quedas e fraturas em idosos tem sido associado a um défice de vitamina D, pela sua influência na saúde óssea e muscular³⁵. Esta associação tem sido alvo de vários estudos, que encontraram uma relação entre deficiência desta hormona e um prejuízo na função muscular ou baixo desempenho físico em idosos, contudo ainda se mantém alguma incerteza quanto a esta hipótese^{35,36}. Na análise efetuada demonstrou-se haver uma crescente deficiência em vitamina com o aumento da idade, que vêm corroborar com as situações anteriormente descritas bem como com a redução da síntese cutânea durante o envelhecimento³⁷. Se por um lado se considera os idosos um grupo de risco, crianças que ainda se alimentem somente do leite materno ou que o tenham feito em crianças podem apresentar baixas reservas de vitamina D, uma vez que esta fonte de alimentação apresenta baixa concentração desta hormona³⁶. Esta informação pode ser indicativa dos níveis deficientes que se verificam também na população mais jovem.

A quantidade necessária de radiação para se obter níveis de vitamina D suficientes é extremamente moldada por um conjunto de fatores que muitos deles não podem ser controlados, como a estação do ano, condições climáticas, latitude, cor de pele ou então controlados como a quantidade de tempo em exposição, tipo de roupa e uso de protetores solares⁷. Há quem ainda considere que a radiação ultravioleta é um carcinógeno da pele podendo a exposição a este ser prejudicial, não havendo por isso um consenso sobre a exposição a esta radiação³⁶. Países de maior latitude caracterizam-se por períodos de inverno mais duradouros e como tal menor exposição¹⁷. Portugal apesar de ser um país com boa exposição solar, até no verão a média dos níveis de vitamina D permanece abaixo dos valores de suficiência, muito por responsabilidade do estilo de vida moderno que limita a exposição solar e obriga as pessoas a espaços fechados bem como pela perda de independência da população mais idosa ou mesmo pelo diagnóstico de doenças crónicas que impeçam atividades ao ar livre e à exposição solar^{10,35,38}. Foram nos meses de agosto, setembro e outubro que este estudo registou as maiores médias de doseamento de vitamina D, equivalendo ao meio do verão e início do outono, meses onde a temperatura de forma geral tende a ser maior e as pessoas tentem a passar longos períodos ao ar livre.

O metabolismo da vitamina D está associado a uma variedade de doenças crônicas e agudas estando relacionada a um aumento de mortalidade e resultados negativos no nascimento³⁹. No estudo efetuado evidenciou-se que pacientes provenientes do serviço de internamento apresentavam médias de doseamento significativamente mais baixas quando comparados com pacientes provenientes da consulta. Esta tendência pode esclarecer que pacientes que se encontrem em situação de debilidade apresentam uma inclinação para desenvolver défices desta hormona. Por outro lado, em pacientes internados durante largos períodos de tempo pode-se explicar essa tendência pela falta de radiação solar, o que se verifica em muitos idosos que mesmo em suas casas se encontram acamados e sem capacidade de mobilidade própria.

No que diz respeito as várias especialidades que efetuaram os pedidos denota-se uma tendência na medicina. Num olhar atento nesta especialidade conclui-se que os pacientes que aqui se encontram apresentam uma gama bastante alargada de patologias e com idades tendenciosamente mais elevadas, o que condiz com a necessidade de pedidos em populações de risco, no caso os idosos⁵. Este motivo explica os baixos doseamentos que foram notados nesta especialidade. Nas especialidades de neurologia, nefrologia, imunohemoterapia, gastroenterologia, pneumologia, diabetologia, cardiologia e centros de saúde foi também evidenciado uma tendência para concentrações deficientes. Estes achados podem ser explicados pelos vários estudos que têm sido conduzidos para provar uma ligação entre as diferentes condições clínicas a uma regulação perturbada da vitamina D e polimorfismos do gene VDR⁴⁰. Recentemente foi encontrado em pacientes com doenças cardiovasculares um aumento da frequência de deficiência em vitamina D⁴¹. Doenças cardiovasculares estão fortemente associados a pacientes em hemodialise, a terapia mais comum para a doença renal terminal, sendo a deficiência em vitamina D comum entre pacientes em dialise⁴². Outras evidências recentes dão conta que a vitamina D regula a resposta imune, estimulando-a ou inibindo-a conforme as situações⁴³. Sabe-se que a doença inflamatória intestinal (DII) é caracterizada pela inflamação do trato gastrointestinal e por um ataque imunológico contra a flora microbiana, em que o hospedeiro usa as células T para se proteger⁴⁴. A forma ativa da vitamina D, 1,25-(OH)₂D, demonstrou suprimir os sintomas da DII inibindo a resposta das células T⁴⁴. Também infeções do trato respiratório inferior estão significativamente associadas a uma deficiência de vitamina D e a certos polimorfismos do gene VDR⁴⁰. Outros estudos focam ainda uma associação entre os baixos níveis da hormona com a patologia diabetes mellitus tipo 1⁴⁵.

Ainda que insuficientes, as especialidades reumatologia, planeamento familiar, pediatria e desmielinizantes apresentam médias mais elevadas comparativamente com as especialidades referidas anteriormente. Vários achados comuns de uma baixa concentração de vitamina D em pacientes com esclerose múltipla, em mulheres grávidas e feto e as mais variadas patologias da saúde óssea tem alertado o clínico para uma intervenção atempada sobre esses

casos^{7,14,46,47,48}. São várias as recomendações para uma suplementação adequada em casos de maior risco^{10,18}.

Níveis baixos de vitamina D bem como polimorfismo no recetor da vitamina D foram encontrados em várias doenças autoimunes como é o caso de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico, esclerose sistémica, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais e algumas patologias associadas à tiroide como tiroidite de Hashimoto e doença de Graves^{23,46}. Contudo não é claro se a deficiência de vitamina D é causa ou consequência da doença⁴⁶. No presente estudo, todas as doenças autoimunes anteriormente referidas encontram-se agrupadas dentro da categoria de diagnóstico de doença autoimune, em que a média ficou no limiar de deficiência para insuficiência.

Síndrome metabólica (SM) caracteriza-se pelo aumento da glicose plasmática em jejum, obesidade, níveis elevados de triglicéridos, redução do colesterol HDL (lipoproteína de elevada densidade) e hipertensão³⁷. Apesar de não se saber ao certo qual a via de patogénese da SM sabe-se que contribui para a resistência à insulina e dislipidemias³⁷. Há estudos que sugerem que baixas concentrações de 25-OHD estão associadas a um aumento da incidência de SM³⁷. Na população em estudo observou-se uma incidência de pedidos de doseamento em diagnósticos de dislipidemias, hipertensão e obesidade. Na hipertensão e na obesidade as médias de vitamina D mantiveram-se com valores deficientes, já nas dislipidemias observou-se um ligeiro aumento dos doseamentos ainda que permaneça em valores insuficientes.

Outros estudos têm demonstrado que as concentrações baixas de vitamina D também podem estar associadas a atopias e infeções do trato respiratório através do efeito que os níveis desta hormona têm na regulação do sistema imunológico⁴⁹ (artigo33). Neste estudo o diagnóstico de asma foi analisado, tendo sido obtida uma média insuficiente para a concentração desta hormona. É ainda recorrentemente associada a deficiência de vitamina D a patologias endócrinas, sendo o hipotiroidismo a endocrinopatia mais comum na população^{10,50}.

Há uma grande diversidade de doenças reumáticas, entre elas, neste estudo foi analisado maioritariamente o diagnóstico de espondilartrite e um comum sintoma das doenças reumáticas, artralguas⁵¹. Na espondilartrite há dados que sugerem que um aumento da atividade da patologia está associado a baixas concentrações da vitamina D⁴⁸. De igual forma uma associação de artralguas à deficiência desta hormona está descrita em alguns achados⁵¹. No presente estudo verifica-se em ambos os casos valores de vitamina D abaixo da suficiência.

Sabe-se que pacientes em terapia antiepiléptica de longo prazo têm uma predisposição para deficiência de vitamina D⁵². Esta situação é corroborada pelo presente estudo que apresenta um conjunto pacientes com diagnóstico de epilepsia com uma média de doseamentos extremamente baixos.

Muitas variações que ocorreram dentro dos vários diagnósticos podem ser reflexo de estilos de vida diferentes, como a prática de exercício físico, diferenças regionais, alimentação e suplementação em vitamina D³⁷. Apesar de muitos estudos terem sido efetuados até ao momento, ainda há muita especulação por parte da comunidade científica do papel exato da vitamina D em cada patologia referida anteriormente. Havendo, no entanto, em algumas delas já elucidações objetivas que permitem ao clínico uma suplementação adequada.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A vitamina D é atualmente encarada como uma hormona indispensável ao bom funcionamento e crescimento do organismo. São cada vez mais os estudos que demonstram que um défice de vitamina D pode estar associado a um conjunto de complicações clínicas que de certa forma predis põem o organismo para um maior risco de morbilidade. É por isso fundamental que a população mais afetada por estas complicações faça uma monitorização adequada com a implementação de uma dieta saudável e rica em alimentos fortificados por esta hormona assim como o uso de suplementação em casos mais preocupantes.

Vários estudos até ao momento foram feitos com o intuito de perceber os doseamentos da população no geral, havendo uma forte tendência para défices de vitamina D. Estes estudos incidem maioritariamente em países de baixa exposição solar, sendo que até ao momento poucos foram feitos em Portugal. Através deste projeto de investigação conseguiu-se perceber que também na população em estudo os défices são significativos e alvos de uma preocupação generalizada visto a ampla distribuição que adquirem. Apesar da correlação existente entre défices de vitamina D e a idade da população, também a população jovem se encontra maioritariamente em carência desta hormona. Por outro lado, denota-se que nos meses do verão os níveis tendem a aumentar ainda que dentro de limites deficientes. Era expectável, contudo que nos meses do verão se criassem reservas para os meses onde a radiação seria menor, contudo apenas se nota um ligeiro prolongamento de medias superiores até ao mês de outubro. Alvo de uma grande incerteza, permanece ainda a ideia se o sexo tem algum tipo de influência sobre a deficiência de vitamina D que se tem verificado. Neste projeto os resultados sugerem essa associação, verificando-se no sexo feminino uma tendência acentuada de deficiência, contudo tem que ser considerado o número superior de pedidos em mulheres comparativamente com os homens.

Associado a um défice de vitamina D está ainda um estilo de vida moderno que as pessoas têm cada vez mais tendência em adotar, menor tempo de exposição solar, uso de protetores solares que diminuem a absorção da radiação bem como o uso de certas roupas mais tapadas em meses mais frios.

As principais limitações sentidas neste estudo foram a elevada heterogeneidade da amostra e a falta de informação clínica adicional dos vários pedidos. Era essencial para este estudo ter conhecimento de um conjunto de variáveis que poderiam intervir nos doseamentos de vitamina D como atividade diária, mobilidade, uso de suplementos ou outros fármacos e patologias antecedentes.

Pelo elevado número de estudos que relatam uma associação de hipovitaminoses D com certas patologias, é crucial que futuramente seja elaborada uma análise mais detalhada em que haja uma seleção controlada dos pacientes, que compare os níveis de vitamina D que se verificam nessas patologias com níveis de vitamina D numa população saudável. Bem como

dentro de cada patologia, avaliar uma progressão/regressão em pacientes com valores normais ou com hipovitaminoses D. Cada paciente deve ser visto de uma forma isolada, com uma avaliação dos doseamentos tendo em conta os parâmetros anteriormente referidos, e que sejam efetuados vários pedidos para o mesmo doente a fim de se fazer uma monitorização mais adequada a cada paciente.

III. Relatório de Estágio

1. Caracterização do SPC¹

O SPC é certificado pela norma ISO 9001:2015 e creditado pela *Join Comission* Internacional, cumprindo todos os requisitos exigidos por estas entidades. Participa em programas internacionais de avaliação Externa da Qualidade de diversas entidades e organizações científicas, tais como, NEQAS (*National External Quality Assessment Site*), INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge), SEQC (Sociedade Espanhola de Química Clínica), ATCC (*American Type Culture Colection*) e EQAS (*External Quality Assurance Services*).

No último ano, do dia 01 de janeiro de 2018 até ao dia 31 de dezembro de 2018, o SPC realizou num total 1186214 análises. Destas, 11970 eram referentes a pedidos de autoimunidade, 831525 de bioquímica, 1250 de citometria de fluxo (CMF), 190997 de hematologia, 1739 de imunohemoterapia, 81149 de imunologia, 36058 de microbiologia, 19148 de proteínas, 7788 de virologia e 4590 para o exterior.

2. Processo Pré-analítico⁵³

O SPC dispõe de um sistema informático de laboratório (SIL) que gere todo o processo pré analítico, analítico e pós-analítico. As requisições de análises têm origem no serviço de urgência geral, serviços de internamento das diversas especialidades, consultas de rotina e centros de saúde e são registadas eletronicamente no SIL que posteriormente gera um pedido de colheita. A colheita é efetuada pelo serviço de patologia clínica (exceto Urgência Geral) segundo as instruções de colheita e em tubos de colheita específicos.

O sistema de cores na tampa de cada tubo diferencia-os consoante a finalidade da amostra, pela presença ou ausência de anticoagulante. Tubos com tampa de cor castanha ou de soro não apresentam qualquer anticoagulante, promovendo a ativação da cascata da coagulação, destinando-se por exemplo a doseamento da glicose, creatinina, entre outros. Os tubos com tampa verde, contêm anticoagulante citrato de sódio e destinam-se a estudos da coagulação e os vários fatores que possam estar a influenciar a coagulação. Os tubos com tampa de cor de rosa com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) aplicam-se para a realização de hemogramas e outras contagens de células sanguíneas como populações linfocitárias. Existem ainda uns tubos de tampa roxa com anticoagulante citrato de sódio, para estudos da velocidade de sedimentação (VS), estes apresentam-se com um diâmetro mais reduzido para facilitar o teste e proporcionar uma melhor leitura. Recentemente na

secção de hematologia passou a usar-se um novo tubo de tampa cor de rosa escuro, thromboExact, estritamente em casos de baixa contagem plaquetária, estes tubos contêm um anticoagulante, sulfato de magnésio, que lhes confere maior precisão e baixa interferência, dando um valor de plaquetas real. Grande parte das amostras da secção de microbiologia vêm em contentores estéreis, em zaragatoa e em garrafas de hemocultura.

A distribuição das amostras assim que chegam ao serviço é efetuada pelas várias secções do laboratório de patologia clínica. Os tubos devem inicialmente passar pelo pré-analítico ou cobas® p 612, um distribuidor que lê o código de barras de cada tubo e direciona as amostras consoante os testes pedidos e a urgência do pedido. Amostras que não podem passar pelo pré-analítico são imediatamente direcionadas para as secções apropriadas.

Através do cobas® p 612 consegue-se fazer um rastreamento da amostra ao longo de todo o processo, mesmo após esta ser arquivada. Este aparelho identifica o tipo de tubo, conseguindo remover a tampa no caso dos tubos de soro e efetuar alículas caso seja pedido. Fornece informações relevantes que se podem verificar ocasionalmente como volume insuficiente ou amostra hemolisada.

Após esta separação automática das amostras, estas são entregues às respetivas secções. No laboratório de hematologia são recebidos essencialmente tubos de hemograma e tubos de coagulação. Para além disto chegam ainda amostras de medula óssea e líquidos biológicos. Após o estudo estar concluído as amostras são enviadas para o pré-analítico para serem posteriormente arquivadas. Todas as amostras que não forem possíveis ser arquivadas pelo pré-analítico serão arquivadas manualmente.

No laboratório de microbiologia as amostras são muito diversificadas, devendo ser processadas de imediato ou então colocada em condições adequadas até ser efetuado o seu processamento. No que diz respeito às urinas, fezes, expetorações, secreções brônquicas, lavados bronco-alveolar, aspirados brônquicos e líquidos biológicos como o líquido pleural, líquido ascítico e líquido sinovial ou articular estes devem ser transportados para o laboratório e conservados no frigorífico a 2-8°C. Por outro lado, exsudados vaginais/uretrais, espermoculturas, pus, líquido cefalorraquidiano e biopsias devem ser transportados para o laboratório e conservados em estufas a 35°C. No fim a amostra deve voltar a ser guardada no local apropriado até que o resultado esteja pronto.

No laboratório de imunoquímica chegam essencialmente amostras de soro e urina. De uma forma menos frequente chegam também líquidos biológicos. Uma vez mais estas amostras devem ser armazenadas em frigoríficos a 2-8°C caso não seja possível o teste ser efetuado no prazo pretendido, atendendo que há parâmetros que têm um número restrito de minutos/horas para serem efetuados caso contrário fica inviável. Há análises que pelo seu número reduzido de pedidos não justifica serem efetuadas todos os dias, sendo por isso efetuadas apenas duas vezes por semana.

3. Processo Analítico e Controlo de Qualidade⁵³

O Processo analítico engloba a realização das análises e validação técnica, gerido com total rastreabilidade pelo SIL. Todos os procedimentos efetuados são monitorizados e registados.

Para proceder à validação técnica, o serviço possui um programa de Controlo de Qualidade Interno e Externo nas diferentes áreas laboratoriais:

✓ **Controlo de Qualidade Interno:**

O Protocolo de controlo de qualidade do SPC define que para cada parâmetro efetuado manualmente ou num equipamento autoanalisador, pelo menos dois níveis diários de controlo de qualidade interno devem ser efetuados com o objetivo de validação de todo o processo analítico. No laboratório de microbiologia, à exceção do sistema Vitek que tem um controlo interno diário da solução salina, faz-se semanalmente a cultura de um microrganismo definido pela secção, sendo a estirpe desse microrganismo enviada para a entidade externa ATCC.

✓ **Controlo de Qualidade Externo:**

A avaliação externa da qualidade é efetuada na sua generalidade com uma periodicidade mensal e os seus resultados são avaliados pelo SPC com o objetivo de garantir a qualidade dos seus resultados.

4. Processo Pós-analítico e Validação Biopatológica⁵³

O Processo pós analítico engloba a validação biopatológica das análises e o envio dos resultados ao médico prescriptor. A validação biopatológica é efetuada segundo uma avaliação global do resultado obtido, tendo em conta o diagnóstico do doente, compatibilidade dos resultados obtidos, patologias associadas e histórico de análises realizadas anteriormente. Após validação o resultado fica de imediato disponível a ser consultado eletronicamente pelo médico prescriptor.

5. Trabalho Desenvolvido no Estágio

5.1. Hematologia

5.1.1. Contextualização Teórica

A hematopoiese inicia-se com uma célula-tronco, uma célula pluripotente que se pode renovar ou dar origem às distintas linhagens⁵⁴. Nas primeiras semanas de gestação o local de hematopoiese é o saco vitelino, enquanto que das 6 semanas até aos 6/7 meses ocorre maioritariamente no fígado e baço, sendo que a partir desta altura o local mais importante para este processo passa a ser a medula óssea⁵⁴.

Existe uma regulação na medula através da capacidade de autorrenovação das células-tronco, de modo que a celularidade em condições normais de saúde permanece constante⁵⁴. As células precursoras têm capacidade de responder a fatores de crescimento hematopoéticos com o aumento de produção seletiva de uma ou outra linhagem celular de acordo com as necessidades⁵⁴.

A eritropoiese é o processo pela qual se obtêm os eritrócitos, que se forma a partir de uma célula-tronco comum a todas as linhagens e sofre posterior diferenciação⁵⁴. O primeiro precursor eritroide com estrutura identificável na medula óssea é o proeritroblasto, que vai sofrer uma série de divisões e forma o eritroblasto⁵⁴. Cada estrutura identificável vai sofrendo alterações como a redução progressiva de tamanho, o aumento do conteúdo em hemoglobina no citoplasma, a diminuição da quantidade de RNA e o aumento gradual da condensação da cromatina⁵⁴. Quando o núcleo é expulso do eritroblasto ainda na medula, chega-se ao estado de reticulócito, ligeiramente maior que o eritrócito⁵⁴. Para que ocorra a passagem ao último estado tem que ocorrer a perda total de RNA, surgindo o eritrócito maduro⁵⁴. A principal forma de regulação do eritrócito é através da eritropoetina que é maioritariamente produzida no rim⁵⁴. Como não apresenta qualquer reserva e é estimulada para produzir através da tensão de oxigénio, uma hipoxia (baixo teor em oxigénio) vai estimular a produção de eritropoetina e conseqüentemente eritropoese⁵⁴.

A principal função dos eritrócitos é o transporte de O₂ aos tecidos e o retorno de CO₂ dos tecidos aos pulmões, com o auxílio da hemoglobina (Hb) que é uma proteína presente nos eritrócitos⁵⁴. Cada Hb A normal do adulto consiste em 4 cadeias polipeptídicas $\alpha_2\beta_2$, cada uma com um grupo heme⁵⁴. No sangue normal também se pode encontrar outro tipo de Hb como é o caso de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A2 (HbA2), as quais para além de apresentarem as cadeias α normais apresentam γ e δ respetivamente em vez de β ⁵⁴. A mudança de HbF para Hb adulta ocorre essencialmente entre os 3 a 6 meses após o nascimento⁵⁴. A Hb forma um tetrâmero com as suas 4 cadeias juntamente com o grupo

heme⁵⁴. No processo de ligação e libertação de O₂ as cadeias de globina vão se movimentar umas sobre as outras, sendo o processo mediado pela afinidade à molécula de O₂⁵⁴.

Uma das principais complicações hematológicas são as anemias, caracterizadas pela diminuição da Hb no sangue abaixo dos valores de referência para uma determinada idade e género⁵⁴. As anemias podem ser classificadas em microcíticas, normocíticas e macrocíticas quando analisados os índices hematimétricos⁵⁴. Há ainda um conjunto de achados clínicos que permitem a confirmação ou não do diagnóstico de anemia bem como uma melhor classificação da mesma⁵⁴.

Outra linhagem distinta que se pode formar a partir da célula-troco são os leucócitos ou glóbulos brancos, estes dividem-se em dois grandes grupos, os fagócitos e imunócitos, o primeiro grupo é constituído pelos monócitos e granulócitos que se subdividem em neutrófilos, eosinófilos e basófilos; já o grupo dos imunócitos é constituído pelos linfócitos e pelos plasmócitos⁵⁴. A função destes dois grupos é essencialmente a proteção do organismo contra infeções e está inteiramente relacionada com as imunoglobulinas (Ig) e com o sistema do complemento⁵⁴.

Relativamente aos leucócitos são inúmeras as patologias que lhes estão associadas, entre elas encontram-se as leucemias, subdivididas em leucemia crónica caracterizada por uma progressão mais lenta e leucemia aguda que é mais agressiva⁵⁴. Estas ainda se podem subdividir em linfóides e mielóides⁵⁴. Uma leucemia linfóide aguda é causada pelo acumular de linfoblastos na medula óssea sendo considerada a doença maligna mais comum na infância; as leucemias linfóides crónicas são devido a uma acumulação de linfócitos maduros no sangue tanto do tipo celular B como do tipo T; as leucemias mielóides agudas são a forma mais comum em adultos sendo que a incidência aumenta com a idade; as leucemias mielóides crónicas podem ocorrer a qualquer idade, sendo caracterizadas por um distúrbio clonal de uma célula tronco pluripotente, estão associadas à presença do cromossoma Filadelfia⁵⁴.

Em condições normais de saúde o sistema encontrasse com concentrações desejáveis das células anteriormente referidas, funcionando como uma regulação do nosso organismo, que em caso de dano vascular esta apto para se defender⁵⁴. Numa situação de dano vascular a hemostasia normal vai depender da interação íntima entre a parede vascular e as plaquetas circulantes e dos fatores de coagulação⁵⁴. O sistema hemostático tem que ser um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, sendo os principais componentes responsáveis as plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, componentes do mecanismo fibrinolítico e vasos sanguíneos⁵⁴.

A coagulação do sangue envolve um sistema biológico de amplificação, por proteólise vai ocorrer ativação de uma cascata de proteínas precursoras circulantes, os fatores enzimáticos da coagulação, que geram trombina⁵⁴. Esta vai converter o fibrinogénio solúvel do plasma em fibrina, sendo que a fibrina vai infiltrar os agregados de plaquetas nos locais de lesão

vascular⁵⁴. O funcionamento dessa cascata de enzimas necessita de uma concentração localizada dos fatores de coagulação circulantes nos sítios de lesão⁵⁴.

5.1.2. Esfregaço Sanguíneo⁵³

Este teste permite efetuar uma contagem e identificação de anormalidades nas células sanguíneas. Desta forma há uma análise da morfologia celular ao mesmo tempo que há a descoberta de achados clínicos. Este exame é geralmente pedido em anemias e leucemias que apresentam uma contagem automática fora dos valores esperados. A técnica para este exame deve ser efetuada de forma a se obter uma camada de sangue fina o suficiente para que se consiga visualizar ao microscópio todos os constituintes celulares.

Técnica:

- ✓ Numa superfície limpa colocar a lâmina;
- ✓ Colocar uma gota de sangue com o auxílio de um capilar junto à extremidade onde irá identificar a lâmina;
- ✓ Segundo um ângulo de 45° colocar uma segunda lâmina em contacto com a gota e efetuar um movimento em direção à extremidade de identificação sem que haja contacto com a zona;
- ✓ A segunda lâmina segue de seguida um movimento contrário, deslizando no sentido oposto à identificação;
- ✓ Todo o processo deve ser efetuado de um modo sincronizado e rápido evitando que numa fase inicial a gota seque;
- ✓ Identificar a lâmina;
- ✓ Deixar secar o esfregaço;
- ✓ Corar;
- ✓ Visualizar ao microscópio.

Um bom esfregaço apresenta cabeça que se encontra aproximadamente no local onde foi colocada a gota, corpo que se concentra numa região intermédia e cauda apresentando-se numa região final do esfregaço.

5.1.3. Colorações em Hematologia⁵³

No laboratório de hematologia são efetuados vários tipos de coloração, sendo essencialmente de amostras de sangue periférico e medula óssea, apesar de também se poder fazer de forma menos frequente coloração de fluidos biológicos.

5.1.3.1. Colorações Automáticas

Relativamente ao sangue periférico e aos líquidos biológicos podem ser feitas de forma automática, através de uma citocentrífuga, ou de forma manual sendo que em ambos os casos usa-se a coloração *May Grunwald Giemsa*.

O equipamento utilizado é o *Aerospray*® com a capacidade de corar até 12 lâminas. As lâminas são colocadas num carrossel iniciando sempre na posição 1 e assim sucessivamente havendo sempre equilíbrio de cargas. A base de funcionamento do equipamento é bastante idêntica aquela que acontece nas centrífugas, um rotor que neste caso se encontra ligado a um carrossel onde são colocadas as lâminas. Durante a aplicação dos reagentes o rotor adquire uma velocidade de 20 rotações por minuto (RPM) e para a secagem aproximadamente 1000 RPM. Como este aparelho também pode funcionar num programa de *citospin* que é a forma ideal de fazer esfregaços de alguns líquidos biológicos, apresenta um menu onde se deve seleccionar qual o programa pretendido e só posteriormente dar início a essa execução. No caso do *citospin* o rotor pode adquirir velocidades que podem ir de 100 a 2000 RPM. Para se fazer a coloração é necessário seleccionar ainda no menu inicial que tipo de coloração se pretende fazer.

5.1.3.2. Colorações Manuais (17)

Na medula óssea é estritamente necessário um procedimento de coloração manual, tanto para a coloração de *May Grunwald Giemsa* como para a coloração de *Peerls*.

5.1.3.2.1. Coloração de *May Grunwald Giemsa*

Coloração que apresenta a junção de dois corantes: corante *May Grunwald* que é uma solução eosina e azul de metileno em álcool metílico e corante *Giemsa* é uma combinação de eosina e derivados de azul metileno. A combinação destes 2 corantes permite a coloração de todas as estruturas celulares.

Técnica:

Para esfregaços sanguíneos:

- ✓ Cobrir a lâmina com solução *May Grunwald* previamente filtrada (1.5 ml) durante 2 minutos;
- ✓ Adicionar água destilada neutra (0,75 ml) durante 3 minutos;
- ✓ Lavar com água e deixar secar na vertical;
- ✓ Cobrir a lâmina com solução *Giemsa* diluída (1 ml de água para duas gotas de *Giemsa*) durante 5 minutos;
- ✓ Lavar com água e deixar secar a lâmina na vertical.

Para esfregaços de Sangue Medular:

- ✓ Cobrir a lâmina com solução May Grunwald previamente filtrada (1.5 ml) durante 3 minutos;
- ✓ Lavar com água e deixar secar na vertical;
- ✓ Cobrir a lâmina com solução Giemsa diluída (1 ml de água para duas gotas de Giemsa) durante 20 minutos;
- ✓ Lavar com água e deixar secar a lâmina na vertical.

5.1.3.2.2. Coloração de Pearls

Esta coloração é feita através de um *kit* de coloração para detecção de ferro iônico (Fe^{3+}) livre nas células, que apresenta um conjunto de 3 reagentes: Reagente 1 (Hemacianoferrato(II) de potássio); reagente 2 (Ácido clorídrico); reagente 3 (solução de “*Nuclear fastread*”). Estes reagentes funcionam como corante 1 (mistura 1:1 do reagente 1 e 2) e corante 2 (reagente 3). Este último reagente vai permitir por ótima evidencia de precipitados de ferro ao nível do citoplasma celular.

Técnica:

- ✓ Fixar as amostras de medula óssea secas ao ar com metanol, durante 3 minutos;
- ✓ Deixar secar ao ar;
- ✓ Mergulhar as amostras na solução corante 1 preparada anteriormente e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos;
- ✓ Deitar água destilada sobre as amostras;
- ✓ Mergulhar as amostras no corante 2 e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos;
- ✓ Deitar água destilada sobre as amostras;
- ✓ Deixar secar ao ar.

5.1.3.2.3. Coloração para Pesquisa da Malária

Inicialmente deve ser feito um teste rápido que determina a presença do antígeno da malária. Esta coloração visa o aparecimento de uma morfologia.

Técnica:

- ✓ Cobrir-se as lâminas com o corante Giemsa diluído de 1:20 com água tamponada (pH 7,2) durante 20-30 minutos;
- ✓ Lavagem das lâminas com água tamponada durante 3 minutos;
- ✓ Deixar as lâminas secar.

5.1.4. Hemograma⁵⁵

Esta análise é efetuada no analisador DxH 800 totalmente automatizado da Beckman Coulter que foi projetado para fornecer um hemograma completo (CBC), incluindo a contagem de glóbulos vermelhos (RBC), contagem de glóbulos brancos (WBC) e a sua diferenciação, contagem de reticulócitos, contagem de plaquetas e contagem de glóbulos vermelhos nucleados (NRBC) em amostras de sangue total. No caso da contagem de glóbulos vermelhos e de células nucleares está disponível também para outros fluidos corporais.

Este analisador é baseado numa tecnologia que permite eliminar coincidência celular, estendendo a linearidade para os parâmetros testados e uma maior precisão para baixos níveis ao mesmo tempo que apresenta um canal de citometria de fluxo aumentando o desempenho. Usa sete parâmetros distintos que são analisados para cada evento celular: a medição de volume, a condutividade, três medidas da dispersão que vão dar informações sobre a granularidade e superfície da membrana, a medição da perda de luz axial que faz a análise da transparência celular e por fim a dispersão de luz de baixo ângulo que dá um índice de complexidade celular.

Os tubos devem ser colocados em cassetes, sendo que cada uma tem a capacidade de suportar até 5 tubos e colocados em agitação aproximadamente 10 minutos. Decorrido esse tempo são colocados no aparelho em modo de amostragem automático, onde as amostras são sujeitas a uma agitação imediatamente antes da sua aspiração. Para amostras pediátricas e tubos abertos há a possibilidade de um modo de amostragem manual que facilita a análise.

O equipamento incorpora um conjunto de cinco reagentes: a *Coulter DxH Cleaner* um agente de limpeza para constituintes que entrem em contacto com as amostras de sangue; *Coulter DxH Cell Lyse* um agente de lise de eritrócitos para a determinação quantitativa de hemoglobina, enumeração de glóbulos vermelhos nucleados e contagem e determinação da dimensão de leucócitos; *Coulter DxH Diff Pack* para realizar a lise dos eritrócitos e conservar os leucócitos; *Coulter DxH Retic Pack* para limpeza de glóbulos vermelhos e coloração de reticulócitos; *Coulter DxH Diluent* para utilizar como diluente tampão isotónico em combinação com um agente de lise sem cianeto para contagem e determinação da dimensão das células sanguíneas.

5.1.5. Coagulação⁵⁶

Para a efetuar o estudo dos parâmetros da coagulação recorre-se ao equipamento ACL TOP 700 Beckman Coulter, um equipamento que se baseia em 3 métodos essenciais, o método coagulimétrico ou turbidimétrico, método cromogénico e método imunológico.

O método coagulimétrico ou turbidimétrico avalia o tempo necessário para haver formação de um coagulo na amostra, percebendo que coagulação chegou ao fim com a mudança da densidade ótica. A luz passa através de um meio onde o fibrinogénio vai ser convertido em

fibrina, que por sua vez absorção da luz incidente. A luz chega a um fotoreceptor que deteta uma diminuição de luz uma vez que esta a ser absorvida pela fibrina. A absorção da luz por parte da fibrina aumenta à medida que a formação de coágulos progride, isto é, à medida que se dá a coagulação vai sendo absorvida maior quantidade de luz pela amostra e consequentemente chega menor quantidade ao fotodetector, portanto a transmitância da luz pela amostra diminui continuamente. Consoante a luz detetada no fotodetector vai ser emitido um sinal, esse sinal é processado via *software* através de uma série de algoritmos que determina o ponto de coagulação.

Outro método usado é o cromogénico que pode ser considerado direto ou indireto. No direto o analito de interesse atua diretamente sobre um substrato sintético especificado enquanto que num teste indireto o analito de interesse reage com uma quantidade fixa de enzima a fim de formar um complexo inativo, sendo depois a atividade da enzima medida usando um substrato sintético específico. Seguindo um princípio calorímetro é depois medida a absorvância da amostra numa cuvete com um sensor ótico a detetar a luz que passa e vai converter em sinal elétrico que vai ser interpretado pelo sistema para dar valor aos testes pedidos.

O método imunológico é usado com o intuito de se medir diretamente a quantidade de analito, sendo que será uma medição da concentração física e não da atividade através da mudança de densidade ótica. Tem algumas semelhanças ao método turbidimétrico, contudo este baseia-se na formação de complexos antigénio-anticorpo para afetar a transmissão da luz. O sensor ótico vai medir a absorvância através da luz que incide na cuvete, sendo esta absorvida pela solução aí presente de maneira que quantos mais complexos antigénio-anticorpo maior será a absorção. A quantidade de luz que chega ao fotodetector é posteriormente convertida em um sinal elétrico que dará o valor esperado.

Podemos dividir este aparelho em dois, uma parte que se encontra a temperatura ambiente e outra que está refrigerada, permitindo assim que os reagentes se encontrem nas suas condições ótimas. Posteriormente pode ser dividido em áreas consoante a sua funcionalidade, a área para diluentes, a área para reagentes e a área para amostras.

Os tubos devem ser sujeitos a uma centrifugação antecipada a fim de haver uma divisão dos componentes, onde os componentes de maior densidade depositam, como é o caso dos glóbulos e plaquetas e o plasma ficando na parte superior. Diariamente são efetuados 4 testes, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), o Tempo de Protrombina (PT), os D-Dímeros e o fibrinogénio. Os restantes testes são efetuados quando o volume de amostras o justifiquem, entre eles estão os testes dos vários fatores de coagulação, para a proteína C (PC), Proteína S livre (PS), Antitrombina (AT), para o anticoagulante lúpico (AL), Antigénio do Fator *Von Willebrand* (FVW:Ag) e Cofator *Ristocetin* do Fator de *Von Willebrand* (FVW:CoR), estes dois últimos para diagnosticar a doença de *Von Willebrand* (DVW).

5.1.6. Estudo da Função Plaquetária^{57,58}

O teste da função plaquetária é um parâmetro essencial para uma correta avaliação da hemóstase primária a fim de investigar distúrbios que poderiam levar ao sangramento ou ao aparecimento de hematomas, tendo ainda especial interesse na monitorização de medicamentos antiagregantes de plaquetas.

Neste teste ocorre a simulação *in-vitro* do processo de adesão e agregação de plaquetas aquando de uma possível lesão vascular, caso haja alguma disfunção será detetada. Sendo que as disfunções podem ser adquiridas, herdadas ou induzidas por agentes inibidores da atividade plaquetária. O teste é feito usando cartuchos PFA, sendo estes cartuchos de colagénio/epinefrina e cartuchos de colagénio/ADP. O primeiro a ser usado é o cartucho de colagénio/epinefrina para detetar disfunções plaquetárias induzidas por defeitos nas plaquetas, doença de von willebrand (VWD) ou exposição a gentes inibidores da atividade plaquetária. Por fim o cartucho colagénio/ADP vai funcionar como uma confirmação, indicando se um possível resultado anormal do primeiro cartucho possa ter sido provocado pelo ácido acetilsalicílico (ASA) ou qualquer fármaco com ASA. De realçar que todos os reagentes dos cartuchos usados desempenham um papel importante no processo *in-vivo* da hemóstase primária.

Cada cartucho deve ser usado uma única vez, sendo constituído por um capilar, um reservatório e uma membrana bioquímica ativa com um orifício central circular. A amostra é aplicada no reservatório sendo posteriormente aspirada através do capilar e do orifício, portanto, as plaquetas encontram-se num elevado fluxo. A membrana está revestida de colagénio e a fixação deste às plaquetas desencadeia o primeiro estímulo fisiológico para que ocorra ativação plaquetária. A membrana pode ainda estar revestida por outros agonistas fisiológicos como é o caso da epinefrina ou ADP, que após contacto com as plaquetas proporcionam a libertação das substâncias contidas nos grânulos. Com a posterior formação de agregados e conseqüente formação do trombo vai ocorrer uma diminuição gradual no fluxo sanguíneo até ao seu termino. A avaliação é dada segundo o tempo desde o início do teste até o tampão de plaquetas fechar o orifício, sendo este o tempo de oclusão (TO) em segundos. Os resultados devem sempre ser avaliados tendo em conta a história clínica, o quadro clínico e outros resultados laboratoriais.

Antes de aplicar a amostra deve-se garantir a mistura adequada do anticoagulante citrato, para isso deve-se inverter cuidadosamente o tubo 3 a 4 vezes. Posteriormente adiciona-se 800 µl em cada reservatório evitando formação de possíveis bolhas.

5.1.7. Estudo da hemoglobina⁵⁹

As hemoglobinopatias constituem todas as doenças genéticas da Hb podendo afetar tanto a estrutura (variantes da hemoglobina) como a expressão (talassemias) das frações da Hb. No

sangue, pode circular na forma de HbA0 ($\alpha 2\beta 2$), na forma HbA2 ($\alpha 2\delta 2$) e na forma HbF ($\alpha 2\gamma 2$), sendo a primeira mais abundante. Esta distribuição difere na composição de cadeias de globina. Por outro lado, a quantificação da forma glicosilada da hemoglobina (HbA1c) permite o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com diabetes.

O equipamento HA-8180T da Beckman Coulter é um analisador capaz de detetar, identificar e quantificar variantes de Hb e medir HbA1c, HbA0, HbF e HbA2 através de amostras de sangue total humano. Usando cromatografia de troca catiónica de fase reversa, a amostra de sangue é diluída com solução de lavagem de hemólise e enviada para uma coluna que vai fracionar a amostra nos diversos componentes da Hb tendo por base a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

5.1.8. Trombofilia^{60,61}

Trombofilia é definida como o aumento do risco para o desenvolvimento de coágulos sanguíneos, podendo ter uma causa hereditária ou adquirida. O trombo pode estar no sistema vascular venoso ou arterial, sendo que uma trombofilia venosa está relacionada com problemas na coagulação e vai provocar trombose venosa profunda ou embolia pulmonar. No que toca à trombose venosa pulmonar um aumento pode estar associado às mutações nos fatores II e V, como tal a possível deteção de mutações nestes fatores pode ajudar no diagnóstico desta patologia.

A mutação do fator II ou protrombina ocorre no nucleótido 20210 na região 3' não transcrita do gene ocorrendo a troca de guanina por adenina, aumentando os níveis de protrombina. Enquanto que a mutação no fator V ocorre no nucleótido 1691 havendo a troca de guanina por Adenina, ocorrendo a substituição do aminoácido arginina por glutamina na proteína deste fator, que se traduz clinicamente em resistência à clivagem pela Proteína C ativada. A ocorrência destas mutações é baixa, a primeira incide em 2% e a segunda em 5% da população.

O sistema do GeneXpert® é um teste completamente automatizado que integra a preparação da amostra, extração e amplificação de ácidos nucleicos e a deteção de uma sequência alvo através de amostras simples ou complexas, com recurso a ensaios da reação em cadeia da polimerase em *Real Time* (RT-PCR). O sistema fornece cartuchos descartáveis de utilização única que já vêm completamente preparados com todos os reagentes necessários ao ensaio de PCR, bem como as sequências alvo para cada tipo de teste específico. O ensaio irá ocorrer no próprio cartucho diminuindo assim o risco de contaminação cruzada entre amostras. Também as condições de temperatura e tempo da reação de PCR são asseguradas pelo sistema, bem como asseguram um controlo interno.

No caso do ensaio Xpert® HemosIL® FII & FV ocorre a deteção dos alelos do fator II e V numa amostra de sangue total com citrato de sódio. Ao cartucho deve ser adicionado 50 µl de amostra após ligeira agitação para homogeneizar e posteriormente colocado no sistema.

5.1.9. Velocidade de Sedimentação^{62,63}

A velocidade de sedimentação é um dos testes laboratoriais que comprovam a existência de uma resposta inflamatória, contudo pouco conclusiva devido a uma enormidade de fatores que podem afetar o resultado. O princípio deste teste baseia-se na velocidade em que os glóbulos vermelhos sedimentam numa suspensão de plasma sanguíneo. Esta velocidade vai depender da forma dos eritrócitos e das proteínas do plasma, sendo fortemente influenciada por proteínas plasmáticas como é o caso do fibrinogénio, β -globulina, α e γ -globulinas e albumina. Se por um lado a rigidez e alterações morfológicas provocam uma diminuição da sedimentação das hemácias, a hemodiluição e possível presença de proteínas como as referidas anteriormente vão provocar um aumento da mesma. Essas proteínas que se apresentam com elevado peso molecular vão ligar-se à membrana celular diminuindo o potencial zeta levando a formação de empilhados de hemácias que vão ter tendência a se depositar mais facilmente.

Este teste tem especial interesse em processos infecciosos, inflamatórios ou neoplásicos a fim de avaliação da extensão da doença, podendo também avaliar a resposta à terapêutica instituída.

Este teste é relativamente simples e usa uma técnica de *Westergren*. As amostras de sangue venoso com citrato de sódio são colocadas em tubos transparentes com diâmetro interno de 2,5 mm. Imediatamente antes do teste, os tubos devem ser agitados a fim de garantir que a sedimentação ainda não se tenha iniciado. Esta técnica exige que o tubo esteja completamente na vertical e permaneça em repouso até ao fim da análise. Inicialmente o sistema vai fazer uma primeira leitura ao tubo que vai servir de referência para o resultado final. Ocorrem medições posteriores aos 30 minutos e após uma hora, momento em que vai sair os valores medidos nessas duas ocorrências, sendo considerado o segundo como o valor final. É de especial interesse que no fim de cada análise se verifique que o nível esteja num local visível para o aparelho, caso tal não seja possível deve ser feita uma análise manual através de uma coluna graduada.

5.1.10. Citometria de Fluxo⁶⁴

Devido aos avanços que têm ocorrido na técnica de citometria de fluxo nos últimos anos, tem sido uma técnica bastante utilizada para o diagnóstico e monitoramento de rotina de pacientes com cancro e deficiências imunológicas. Esta técnica permite uma análise de vários parâmetros em simultâneo, fornecendo uma contagem e análise de partículas biológicas numa suspensão.

A técnica concentra-se principalmente em três passos: preparação da amostra, aquisição dos dados e por fim a análise destes dados. No que diz respeito à preparação da amostra, vai depender da amostra em questão e da suspeita clínica. Maioritariamente as amostras que

chegam para a citometria de fluxo são de sangue periférico, medula óssea, lavado bronco-alveolar e líquidos biológicos. Consoante a suspeita é adicionado um painel de anticorpos monoclonais específicos que estão ligados a fluorocromos. Os anticorpos ligam-se aos antigénios que estão a ser estudados durante a incubação, sendo que todos os anticorpos que não ligaram são removidos por lavagem. Numa fase seguinte, a aquisição dos dados é feita no citómetro. Este aparelho é constituído por uma fonte de iluminação que vai emitir luz para a amostra; sistema de fluídos que torna possível que passe uma só célula de cada vez e os fotodetetores que recebem os sinais por parte das células. De realçar que cada fluorocromo tem um comprimento de onda específico e assim consegue haver distinção por parte do fotodetector de qual o fluorocromo que emite fluorescência. Numa última fase, a análise dos dados ocorre pela análise de gráficos XY que se formam pelo sistema após a aquisição dos dados.

5.2. Microbiologia

5.2.1. Contextualização Teórica

A microbiologia centra o seu papel nos microrganismos responsáveis por infeções, percebendo a sua patogénese e que tipo de doença provocam⁶⁵. Ao mesmo tempo que estuda a sensibilidade desses microrganismos a agentes antimicrobianos, no sentido de melhorar a terapêutica implementada⁶⁵. A microbiologia médica engloba 4 grandes áreas, contudo nesta secção o foco recai sobre a bacteriologia, sendo que as restantes são estudadas em outros laboratórios do SPC⁶⁵.

Dentro do grande grupo das bactérias, há as bactérias gram-positivas que podem apresentar-se como cocos como é o exemplo de *Streptococcus* catálase negativa e *Staphyococcus* catálase positiva ou negativa em raros casos; ou apresentar-se como bacilos, destes há os formadores de esporos como é o exemplo do *Clostridium* e os não formadores de esporos que é o caso da *Listeria*⁶⁵. Outro grande grupo das bactérias são as bactérias gram-negativas, apresentando-se também morfologia em cocos com a *Neisseria*, ou em bacilos, neste caso podem se subdividir em anaeróbios facultativos, aeróbios e anaeróbios⁶⁵. No primeiro caso, anaeróbios facultativos, encontramos as *Enterobactereaceas* entre estas podemos especificar a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Proteus*⁶⁵. Já nos aeróbios encontramos predominantemente as *Pseudomonas* e nos anaeróbios os *bacteroides*⁶⁵. Outros grupos de bactérias são as espiraladas como é o caso das *Espiroquetas* (*Treponema*), as bactérias parasitas intracelulares como a *Rickettsia*, *Coxiella* e *Chlamydia* e as que não apresentam parede celular como é o caso do *Mycoplasma*⁶⁵.

O crescimento bacteriano ocorre por um processo assexuado denominado divisão binário⁶⁵. Este crescimento está inteiramente dependente da espécie bacteriana, da presença ou ausência de nutrientes ou de fatores de crescimento especiais⁶⁵. Entre vários fatores, os que influenciam de forma significativa o crescimento microbiano são temperatura, pH, oxigénio, pressão osmótica e luz⁶⁵.

Após do termino da incubação é importante fazer uma caracterização das colónias formadas, isto é, as características morfológicas, o aspeto, o tamanho, cor, forma, odor, hemólise das colónias⁶⁵. Seguidamente procede-se a uma identificação mais específica como os estudos bioquímicos; testes de sensibilidade aos antimicrobianos; caracterização antigénica para casos em que os microrganismos crescem muito lentamente ou não conseguem crescer em meios de cultura, usando-se anticorpos específicos para a pesquisa desses antigénios⁶⁵. Tem-se ainda a caracterização genotípica, que estuda sequências genómicas específicas de microrganismos conseguindo desta forma perceber qual o microrganismo responsável pela infeção causada⁶⁵. Em casos em que os microrganismos não podem ser isolados pelos métodos tradicionais de cultura o diagnóstico passa por testes serológicos, testes estes que possibilitam identificar anticorpos resultantes da presença microrganismo⁶⁵.

No que diz respeito a infeções associadas a cuidados de saúde que ocorrem em hospitais e lares de terceira idade os microrganismos responsáveis são mais resistentes aos antibióticos, logo mais difíceis de tratar⁶⁵. Alguns dos microrganismos mais conhecidos por causar infeções a nível hospitalar são o *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Clostridium difficile*⁶⁵.

5.2.2. Meios de Cultura

As amostras são semeadas em meios de cultura, maioritariamente em meios sólidos, mas em algumas amostras específicas a sementeira é efetuada em meio líquido⁶⁵. Os meios líquidos são mais sensíveis pois permitem o crescimento de microrganismos em pequeno número, sendo a turvação a indicação de que ocorreu crescimento bacteriano⁶⁵. Em contrapartida, o crescimento em meios sólidos é visto sob a forma de colónias, que permitem uma identificação presuntiva de algumas espécies mais estudadas⁶⁵. Cada meio apresenta componentes próprios que o direciona para o crescimento de um microrganismo específico ou um grupo de microrganismos⁶⁵. Desta forma consegue-se que haja uma melhor orientação no que diz respeito à identificação final do agente patogénico que pode estar a causar infeção⁶⁵. Consoante isso os meios são considerados meios enriquecidos quando contêm nutrientes específicos para facilitar o crescimento de uma estirpe bacteriana; meios seletivos quando têm substâncias que vão inibir grande parte dos microrganismos permitindo que apenas o microrganismo de interesse cresça; meios diferenciados que são ricos em hidratos de carbono com indicadores de pH e por fim meios especiais que permite o crescimento de um microrganismo em específico⁶⁵.

5.2.2.1. Meios Líquidos⁶⁶

Caldo Todd Hewitt + Antibióticos: caldo de enriquecimento seletivo para o cultivo de *Streptococcus* do grupo B na mulher grávida; a composição favorece o crescimento da bactéria em amostras mistas, e os antibióticos, ácido nalidixico e colistina, inibem grande parte dos microrganismos gram-negativos.

Caldo de Carne: meio de crescimento para inóculos pequenos; composto por nitrogénio, vitaminas, fontes de carbono, dextrose como fonte de energia sem que seja suficiente para poder haver acumulação de metabolitos tóxicos e cloreto de sódio que proporciona um bom equilíbrio osmótico.

Meio Tetrionato: meio de enriquecimento para crescimento da *Salmonella*; composto por sais biliares que impedem o crescimento de bactérias gram-positivas e iodo que impede o crescimento das restantes espécies fecais.

Meio Lowenstein: meio de isolamento de micobactérias; constituído por ovos.

5.2.2.2. Meios Sólidos⁶⁶

Gelose de Sangue: meio de isolamento que facilita o crescimento de microrganismos fastidiosos e da maior parte das espécies que se podem encontrar em amostras clínicas; a presença de sangue permite determinar hemólise melhorando a identificação das bactérias.

Gelose MacConKey: meio de isolamento seletivo e de diferenciação para a deteção de *Enterobacteriaceae*; deteta a fermentação da lactose com mudança de cor para vermelho neutro; lactose positiva com colónias rosa com ou sem contorno de halo de sais biliares e cristal violeta; lactose negativa com colónias incolores ou ligeiramente bege.

Gelose de Chocolate *Haemophilus*: meio seletivo para o isolamento das diferentes espécies de *Haemophilus* a partir de uma amostra mistas; meio enriquecido com fatores X (hemina) e V (NAD); e seletivo pela combinação entre agentes antimicrobianos e antifúngicos.

Gelose de Chocolate + PlyViteX: meio de isolamento para crescimento de estirpes fastidiosas pertencentes ao género *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus pneumoniae*; meio enriquecido com fatores X e V.

Gelose SS: meio de isolamento seletivo e diferencial para *Salmonella* e *Shigella*; deteta fermentação de lactose com formação de colónias rosa, caso contrário forma colónias incolores; reduz o tiossulfato e produz H₂S formando colónias com centro negro; colónias de *Salmonella* são incolores ou amarelo pálido, podendo apresentar ou não centro negro; colónias de *Shigella* são incolores, rosa pálido ou alaranjadas sem centro negro.

Gelose Yersinia: meio de isolamento seletivo para deteção e diferenciação de diversas espécies de *Yersinia*; composto por manitol e vermelho neutro que permite diferenciação pela coloração das colónias e composição em colato, desoxicolato, cristal violeta, irgasan e antibióticos que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas e maioria de bactérias gram-negativas.

Candida: meio para isolamento seletivo de leveduras e identificação direta de *Candida albicans*; colónias azuis pela hidrólise do substrato cromogenico de hexosaminidase ou colónias rosa pela hidrólise de um segundo substrato que diferencia culturas mistas e orienta a identificação de outras espécies.

Gelose Sabouraud: meio seletivo para isolamento de leveduras e fungos a partir de amostras mistas; bom crescimento de estirpes fúngicas pelo nível de peptonas e dextrose, com o pH ligeiramente ácido da gelose a favorece o crescimento de fungos em relação às bactérias; bactérias gram-negativas e gram-positivas inibidas pela presença de gentamicina e Cloranfenicol.

Gelose Campyloesel: meio seletivo para isolamento de *Campylobacter* intestinal; composto por agentes redutores que conferem boa capacidade nutritiva e agentes antibióticos e antifúngicos que inibem contaminantes; colónias são pequenas e acinzentadas.

Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro: meio de isolamento seletivo de bactérias fastidiosas gram-positivas e detecção de hemólise; composto por ácido nalidixico e colimicina que inibe muitas bactérias gram-negativas e *Bacillus*.

MRSA ID: cultura e vigilância do MRSA para identificação de doentes hospitalizados que necessitem de isolamento; aparecimento de colónias verdes produtoras de α -glucosidase na presença de antibiótico cefoxitina; mistura seletiva do meio inibe a maioria das bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* bem com leveduras.

Gelose Mueller Hinton: meio de sensibilidade a antibióticos e sulfamidas; destinado para a realização de antibiogramas por difusão de discos; composição permite o crescimento de bactérias não fastidiosas detetadas em patologias, com baixa concentração em timina que proporciona o crescimento somente em torno do disco.

Gelose de Chocolate + gelose PolyVitex VCAT3: meio de isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*; composto por fatores X e V e por agentes antimicrobianos e antifúngicos que o tornam seletivo.

Meio Granada: meio seletivo para determinação e identificação de *Streptococcus* do grupo B.

5.2.3. Condições de Cultura

Após a sementeira, as culturas são incubadas em estufas num tempo, temperatura, humidade e atmosfera específica ao microrganismo em estudo⁶⁵. Para microrganismos de crescimento rápido são necessárias 18 a 24 horas de incubação, enquanto que para microrganismos de crescimento lento podem levar de 48 a 96 horas, ou 4 a 8 semanas no caso específico da *Mycobacterium tuberculosis*⁶⁵. No que diz respeito à temperatura os fungos precisam de 30°C, as bactérias apresentam uma temperatura ótima entre 35 a 37°C e no caso específico do *Campylobacter* precisa de 42°C⁶⁵. As atmosferas usadas podem ser em aerobiose no caso da maioria dos microrganismos; atmosfera carboxílica, rica em CO₂; atmosfera em microaerofilia, pobre em CO₂ no caso do *Campylobacter* e atmosfera em anaerobiose, sem O₂⁶⁵.

5.2.4. Colorações em Microbiologia⁵³

Cada bactéria tem uma parede celular com constituintes próprios, por isso quando expostas a corantes específicos apresenta uma coloração característica⁶⁵. Nesta secção recorre-se à coloração de Gram que se apresenta como um método de diagnóstico muito importante, permitindo uma distinção eficaz de bactérias gram-positivas de gram-negativas e a observação da morfologia da bactéria⁶⁵. Por outro lado, a coloração de Ziehl-Neelsen (coloração ácido resistente) que é usada na pesquisa de micobactérias como é caso da *Mycobacterium tuberculosis*, agente responsável pela tuberculose⁶⁵.

5.2.4.1. Coloração de Gram

Técnica:

- ✓ Após o esfregaço estar feito e seco, fixar à chama;
- ✓ Cobrir a lâmina com violeta de cristal e deixar atuar durante 2 minutos;
- ✓ Lavar com água corrente;
- ✓ Cobrir lâmina com lugol e deixar atuar 1 minuto;
- ✓ Lavar com água corrente;
- ✓ Descorar com álcool-acetona durante 30 segundos;
- ✓ Lavar com água corrente;
- ✓ Cobrir com safranina diluída 1/10 e deixar atuar durante 1 minuto;
- ✓ Lavar com água corrente;
- ✓ Deixar secar.

5.2.4.2. Coloração de Ziehl-Neelse

Técnica:

- ✓ Após o esfregaço estar feito e seco, fixar pelo calor;
- ✓ Cobrir lâmina com Fucsina básica, aquecendo ligeiramente até obter emissão de vapores;
- ✓ Deixar atuar durante 3-4 minutos, aquecendo periodicamente sem deixar secar o corante;
- ✓ Deixar arrefecer e lavar com água corrente;
- ✓ Descorar totalmente com álcool-ácido;
- ✓ Lavar com água corrente;
- ✓ Cobrir a lâmina com Azul de Metileno e deixar atuar durante 30 segundos;
- ✓ Lavar com água corrente.

5.2.5. Amostras Biológicas⁵³

5.2.5.1. Urina

Sempre que solicitado um exame cultural este é efetuado em Gelose de Sangue e MacConKey, a sementeira é feita com ansa de 1 µl para contagem de colónias. Caso haja suspeita de candidíase a cultura é também feita em meio de Candida. No caso dos meios de Gelose de

Sangue e MacConKey a incubação é a 35 °C durante 18 a 24 horas, já para os meios de Candida a incubação é feita a 30 °C durante 24 a 48 horas.

Caso seja pedido exame citológico, devesse separar uma alíquota para efetuar a análise do sedimento urinário no equipamento SediMax, que fará a análise automática. Sempre que solicitado a pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) prepara-se um esfregaço e efetua-se coloração de Ziehl-Neelsen. Se for incluído exame cultural de BAAR deve ser separada uma alíquota da amostra para frasco de centrifuga de 50 ml e enviar para o sector das Micobactérias.

Se houver pesquisa de antígenos urinários para *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus Legionella pneumophila*, a análise é efetuada através de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral que faz a deteção qualitativa dos antígenos anteriormente referidos. Este teste é rápido o que permite um diagnóstico atempado e dessa forma um tratamento antibiótico mais cedo, tendo em consideração que ambas as doenças causadas pelo agente em questão devem ser descobertas numa fase inicial.

5.2.5.2. Aparelho Respiratório

As expetorações e secreções brônquicas requerem um exame macroscópico inicial. Estas amostras podem ser consideradas como purulentas; hemoptoica ou salivares, sendo esta última classificação alvo de rejeição. São efetuadas duas lâminas por estiramento, uma delas para coloração de Gram e outra para coloração de Ziehl-Neelsen. No primeiro caso avalia-se o número de células epiteliais e polimorfonucleares e possível presença de microrganismo e no segundo caso permite a pesquisa de BAAR.

A sementeira é efetuada por quadrantes em Gelose de Sangue que precisa de uma atmosfera de CO₂, Gelose de Chocolate *Haemophylus* e MacConKey, o último exclusivo para pacientes em serviço de internamento, e incubam todos a 35 °C durante 24 a 48 horas.

Sempre que relevante fazer um exame micológico, a amostra é semeada em Sabourand e é incubado a 30 °C num período de 24 a 48 horas. O exame cultural de BAAR requer separação de alíquota para a secção das Micobactérias.

Nas restantes amostras respiratórias, lavado bronco-alveolar (LBA) e aspirado brônquico efetua-se exame microscópico. As lâminas no LBA são efetuadas por citocentrifugação (1500rpm durante 5 minutos) e no aspirados brônquico, após inicial centrifugação (2000 rpm durante 10 minutos), efetuam-se por estiramento. As lâminas são posteriormente coradas, uma para Gram e outra para Ziehl-Neelsen.

O exame cultural no LBA é efetuado diretamente do produto com uma ansa de 10 µl para contagem das células em Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) e incuba a 35 °C durante 48 horas, em atmosfera de CO₂. No aspirado brônquico deve-se proceder a uma centrifugação (2000 rpm durante 10 minutos) anteriormente à sementeira, que será efetuada nos mesmos meios e condições que as amostras de expetorações e secreções brônquicas.

5.2.5.3. Hemocultura

O sistema de detecção microbiana juntamente com as garrafas de cultura *BacT/ALERT 3D®* é usado para detetar a presença ou ausência de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras em amostras de sangue ou em fluidos corporais normalmente estéreis. Sempre que haja uma suspeita de septicemia o paciente em causa deve efetuar esta análise. Este conjunto constitui um meio de cultura com condições nutricionais e ambientais adequadas para os microrganismos infecciosos que são encontrados maioritariamente na corrente sanguínea e noutros fluidos corporais. As garrafas assim que inoculados são colocados no aparelho e é iniciada uma incubação. A garrafa sofre monitorização de 10 em 10 minutos ao longo do período de incubação detetando a presença ou ausência de microrganismos que estão a crescer no fundo do frasco, caso haja um resultado positivo o sistema dá alarme, terminando assim o tempo de incubação. O tempo de incubação varia consoante a suspeita clínica, sendo geralmente 5 dias, exceto em casos de suspeita de Endocardite, Brucelose ou bactérias do grupo AHCEK que incubam 28 dias e em exames micológicos que incubam 14 dias.

A detecção dos microrganismos é conseguida pela monitorização da presença de dióxido de carbono dissolvido no meio de cultura. Os microrganismos metabolizam substratos existentes no próprio meio de cultura libertando dióxido de carbono, que vai ser detetado por um sensor permeável ao gás, sensor calorimétrico. O sensor, que se encontra instalado no fundo de cada garrafa de cultura, muda de cor assim que se encontra na presença de dióxido de carbono, isto é, muda de verde-azulado para amarelo. A mudança de cor vai ser reconhecida pelo sistema através da reflexão de luz, que ao haver mudança para amarelo vai provocar um aumento das unidades de refletancia, cores mais claras, maior refletancia.

Em caso de hemocultura positiva, procede-se à passagem para meios sólidos e prepara-se um esfregaço para coloração de Gram. A passagem é feita com auxílio de uma seringa sendo essencial que a tampa da garrafa seja desinfetada com álcool a 70% antes de qualquer manuseamento. No caso das hemoculturas em aerobiose e hemoculturas pediátricas é feita nos meios de Gelose de Sangue que precisa de uma atmosfera em CO₂ e Gelose de MacConKey que incubam 24 a 48 horas a 35°C, no caso das hemoculturas em anaerobiose é feita em Gelose de Sangue que precisa de uma atmosfera de anaerobiose e Gelose de Chocolate Polyvitex que necessita de uma atmosfera em CO₂, incubam a 35°C de 48 a 72 horas. A sementeira é efetuada por quadrantes em ambos os casos.

5.2.5.4. Cateter Vascular

Sempre que se efetua o estudo de um cateter é porque estamos a associar uma infeção bacteriana a esse produto, nesses casos acompanhado pelo cateter deve vir sempre uma hemocultura. Caso não se verifique esta condição, a amostra deve ser rejeitada.

O exame cultural é realizado em Gelose de Sangue com uma incubação a 35 °C num período de 24 a 48 horas em atmosfera de CO₂. O procedimento baseia-se na técnica semi quantitativa de *Maki*, isto é, a ponta do cateter é rolada ao longo de toda a placa para que posteriormente se efetue a contagem das colónias que cresceram e se possa perceber se estamos perante um resultado positivo ou negativo. Considera-se um resultado positivo sempre que a contagem for superior a 15 unidades formadoras de colónias (UFC).

5.2.5.5. Fezes

Numa coprocultura deve se ter em conta o aspeto das fezes, fezes moldadas devem ser rejeitadas. Por outro lado, amostras de paciente do serviço de internamento só devem ser processadas caso o paciente esteja internado a menos de 3 dias. A sementeira ocorre em MacConKey, meio SS e meio *E. coli* com uma incubação de 24 horas a 35 °C; em meio *Yersinia* que incuba durante 24 horas a 30 °C; em meio *Campylobacter* que incuba durante 48 horas a 42 °C numa atmosfera de Microaerofilia e em meio líquido Tetrationsato juntamente com 4 gotas de lugol que incuba durante 6 horas a 35 °C, seguindo se uma passagem para o meio SS. No caso do meio *E. coli*, só se verifica quando o paciente tem uma idade igual ou inferior a 5 anos.

5.2.5.5.1. Testes Rápidos Imunocromatográficos

Os testes rápidos das fezes de forma geral funcionam como um imunoensaio cromatográfico qualitativo de fluxo lateral. Uma membrana de nitrocelulose é fixada com antigénios ou com anticorpos, consoante o que se pretender detetar, em formato de linhas ou pontos. A amostra é adicionada em uma extremidade do dispositivo e vai migrar sobre este por ação capilar até à extremidade oposta. Quando ocorre esta migração, a amostra vai passar pelas zonas onde estão fixos esses anticorpos ou antigénios, e dessa forma caso a amostra contenha o analito alvo vai desencadear uma reação. Os testes já vêm projetados para que se desenvolva sempre uma linha controlo que se encontra na extremidade mais longínqua do dispositivo que procura a validação do teste, percebendo se o volume de amostra foi suficiente. Caso não se verifique essa linha de controlo o teste não deve ser considerado viável. Os testes de fluxo lateral podem ser considerados competitivos ou “ensaios *sandwich*”, no primeiro caso um resultado positivo é dado pela ausência de linha na área de teste, já no segundo caso deve ser dado um resultado positivo se na área de teste obtivermos linha.

5.2.5.5.1.1. Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes⁶⁷

A grande maioria das doenças pode levar ao aparecimento de sangue nas fezes, sendo que muitas vezes sem qualquer sintoma inicial já é possível chegar-se à descoberta de algumas dessas patologias por estes aparecimentos. Dentro dessas doenças podemos destacar o cancro do colon, úlceras, pólipos, colite, entre outras.

O teste rápido Fecal Occult Blood (FOB) Rapid Test (HEALGEN®) detetar valores tao baixos quanto 12µg de hemoglobina/g fezes. É um teste recomendado essencialmente para exames de rotina, monitoramento hospitalar de pacientes que se encontrem em situações de sangramento e para rastreamento do cancro colorretal ou sangramento gastrointestinal de qualquer fonte. O procedimento passa por recolher amostra para um tubo de coleta, este tubo já vem preparado com 3 ml de tampão de extração. Após homogeneização da amostra com o tampão, adicionar 3 gotas desse preparado à cassete e ler o resultado após 5 minutos.

5.2.5.5.1.2. Pesquisa de *Crypto-Giardia*⁶⁸

A criptosporidiose é uma doença diarreica causada por parasitas microscópicos do gênero *Cryptosporidium*. É um parasita bastante resistente devido à existência de uma casca externa, protegendo-o contra potenciais desinfetantes. Este parasita comumente chamado de “Crypto”, fica alojado no intestino. Por outro lado, a giardíase é uma doença diarreica vista em todo o mundo, causada por um parasita protozoário flagelado, *Giardia intestinalis*, mais conhecida como *G. lamblia* e *G. duodenalis*. Este parasita causa distúrbios gastrointestinais maioritariamente em países em desenvolvimento pelo difícil acesso a água potável e saneamento básico.

O Rapid-VIDITEST Crypto-Giardia visa a deteção de antigénios de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de fezes humanas. Para a realização do teste, com o auxílio do bastão retira-se a amostra, aproximadamente 125 mg. Homogeneizar o conteúdo do frasco, que contém inicialmente tampão, a fim de obter uma boa dispersão da amostra. Dispensar 4 gotas do frasco numa cassete e esperar 10 minutos pelo resultado final.

5.2.5.5.1.3. Pesquisa de *Helicobacter pylori*⁶⁹

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa que se aloja na mucosa do estômago e do duodeno sendo responsável por úlceras peptídicas e gastrites crónicas. Apresenta uma forte relação com malignidades gástricas, sendo a infeção por esta bactéria considerada umas das infeções crónicas mais frequentes do mundo, como tal tornou-se fundamental a implementação de uma ferramenta de diagnóstico rápida.

O teste rápido Pylori-Strip (CORIS BioConcept) é um teste altamente sensível e específico que deteta a presença de antigénios de *H. pylori* nas amostras fecais. A amostra fecal deve ser diluída em 14 gotas de tampão para que possa ocorrer migração da amostra. O resultado demora 10 minutos a ficar totalmente visível.

5.2.5.5.1.4. Pesquisa de *Clostridium difficile*⁷⁰

Após tratamento com antibióticos é possível que existam alterações da flora normal, ficando por isso exposta a organismos oportunistas como é o caso do *Clostridium difficile*, uma bactéria anaeróbia que cresce no intestino capaz de produzir estirpes toxigénicas e não toxigénicas. As primeiras, responsáveis pela forma mais leve da doença gastrointestinal ou

pela grande maioria dos casos de colite pseudomembranosa, carregam genes que vão codificar toxinas, estando essas toxinas associadas ao início da doença. Enquanto as segundas, não toxigênicas, não carregam genes para toxinas. A estirpe toxigênica do *C. difficile* produz dois tipos de toxinas, designadas A e B, ou apenas produz a toxina B. A primeira, toxina A é uma *enterotoxina* prejudicial aos tecidos, sendo considerada a responsável pelos sintomas clínicos. Enquanto a toxina B é referida como citotóxica do organismo. Ambas as estirpes, toxigênicas e não toxigênicas, são grandes produtoras de glutamato desidrogenase, sendo por isso considerado um bom marcador para a detecção da presença da bactéria em questão.

O teste TECHLAB® C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® deteta em simultâneo o antigénio glutamato desidrogenase e as toxinas A e B em um único poço de reação. Um resultado positivo no teste de glutamato desidrogenase do *C. difficile* confirma a presença deste microrganismo, sendo que um resultado negativo indica o contrário. Um resultado positivo no teste de toxinas A e B confirma a presença de *C. difficile* toxigénico em amostras fecais. O procedimento do teste inicia-se com a preparação da amostra, juntando 750 µl de diluente com 1 gota de conjugado e 25 µl de amostra. De seguida, retirar 500 µl deste preparado para o poço de reação e esperar 15 minutos para adicionar 300 µl de solução de lavagem ao poço onde se vai efetuar a leitura. Após essa membrana absorver toda a solução de lavagem, adicionar 2 gotas de substrato e esperar 10 minutos pelos resultados.

5.2.5.5.1.5. Pesquisa de Rotavirus e Adenovirus⁷¹

Rotavirus e Adenovirus são muito comuns em gastroenterites graves que ocorrem em bebés e crianças, e de forma menos frequente em adultos. Os principais sintomas da gastroenterite são vômitos e diarreias aquosas. Os sintomas aparecem geralmente após 1 ou 2 dias de infeção e podem durar até 3 dias no caso do Rotavirus e 5 a 8 dias no caso do Adenovirus.

O CERTEST Rotavirus + Adenovirus deteta em simultâneo a presença de Rotavirus e Adenovirus em amostras fecais. O procedimento passa por recolher amostra com o auxílio de uma vareta para um tubo de coleta que contém diluente, aproximadamente 125 mg de amostra. Após homogeneização, deitar 4 gotas numa cassette e esperar 10 minutos pelos resultados.

5.2.5.5.1.6. Pesquisa de Norovirus⁷²

O teste RIDA® QUICK Norovirus é efetuado para detetar Norovirus em amostras de fezes. O teste necessita de uma inicial preparação da amostra com a adição de 0,5 ml de reagente A, 0,5 ml de reagente B e 50 µl de amostra e posterior homogeneização. Após 5 minutos de sedimentação, retirar 150 µl do sobrenadante e aplicar na cassette. A leitura do teste é efetuada após 15 minutos.

5.2.5.5.1.7. Pesquisa de Parasitas⁷³

Mini Parasep® SF é um concentrador de parasitas fecais, com tubos com a solução preparada, 3,3 ml de fixador e uma gota de surfactante, sendo apenas necessário introduzir a amostra no tubo. Quando for recolhida a amostra fecal esta deve estar nivelada com a colher de recolha que vem na extremidade do tubo. Procede-se de seguida à homogeneização da amostra e solução com o auxílio do *Vortex*. O tubo é centrifugado em posição invertida, a zona onde está a amostra deve ficar para cima. Após centrifugação grande parte da amostra passou o filtro, devendo ser tudo descartado à exceção da parte que contem a amostra final. O sobrenadante deve ser removido e o sedimento pipetado para uma lâmina para ser visto ao microscópio.

5.2.5.6. Exsudado Vaginal/Uretral

Se o pedido tiver exame citológico, inicialmente a zaragatoa com soro deve ser colocada a 35°C durante 30 minutos. É efetuado um esfregaço que deve ser visto ao microscópio em objetiva de 40X e avaliasse o número de células epiteliais e de polimorfonucleares e pesquisa de *Trichomonas*. O esfregaço é efetuado por pressão da zaragatoa contra a lâmina.

A lâmina que vem juntamente com as zaragatoas deve ser corada pela coloração de Gram.

Caso o pedido tenha exame cultural, a sementeira é efetuada por quadrantes em Gelose de Sangue e Gelose Chocolate VCAT que incubam a 35°C durante 48 horas numa atmosfera de CO₂ e em Gelose Candida que incuba a 30°C durante 48 horas. Para o exame cultural o pedido deve trazer uma zaragatoa com carvão ou em meio de Stuart.

5.2.5.7. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

Todas as grávidas às 34/35 semanas de gestação efetuam de forma rotineira a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Como tal, chegam ao laboratório sempre duas zaragatoas, uma do exsudado vaginal e outra do exsudado retal. Ambas as zaragatoas são colocadas em meio líquido Todd-Hewitt durante 24 horas em estufas a 35°C. Ocorre posteriormente a passagem para meio Granada que incuba novamente a 35°C durante 24 horas em atmosfera de anaerobiose.

5.2.5.8. Espermocultura

O exame citológico permite avaliar o número de células epiteliais e polimorfonucleares e pesquisar *Trichomonas*. A amostra é colocada numa lâmina e observada em objetiva de 40X no microscópio.

Juntamente com a amostra é enviada uma lâmina que deve ser corada pela coloração de Gram.

No exame cultural é adicionado 25 µl de amostra aos meios de Gelose de Sangue que incuba numa atmosfera de CO₂ a 35°C durante 48 horas, de MacConKey que incuba a 35°C durante 24

horas, de Gelose de Chocolate VCAT que incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C durante 48 horas e de Gelose Candida que incuba a 30°C durante 48 horas. A sementeira ocorre por quadrantes.

5.2.5.9. Líquidos Biológicos

Na secção da microbiologia chegam principalmente quatro líquidos biológicos, líquido pleural; líquido ascítico; líquido sinovial e líquido pericárdico. Espera-se que em condições normais estes líquidos estejam em condições estéreis, como tal qualquer microrganismo que seja encontrado nestes líquidos deve ser estudado.

5.2.5.9.1. Líquido Pleural

Sempre que chegue amostra em quantidade suficiente deve ser centrifugada para haver concentração da mesma (2000 rpm durante 10 minutos) com rejeição do sobrenadante.

Quando o pedido apresenta exame microscópico, preparam-se duas lâminas para posterior coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, sendo que no caso da coloração de Ziehl-Neelsen a lâmina é efetuada por citocentrifugação.

O exame cultural processa-se em Gelose de sangue que incuba numa atmosfera em CO₂, em Gelose Chocolate Haemophilus e em MacConKey e inoculação em hemocultura pediátrica (1 a 3 ml) ou em caldo de carne. Os meios de cultura sólidos incubam todos a 35°C durante 24 a 48 horas. Sementeira ocorre por quadrantes.

Caso o pedido inclua cultura para BAAR, separa-se uma alíquota da amostra e envia-se para sector das Micobactérias.

5.2.5.9.2. Líquido Ascítico

Tal como para o líquido pleural, sempre que possível ocorre concentração da amostra.

Preparam-se dois esfregaços, um para coloração de Gram e outro para coloração de Ziehl-Neelsen. Sobre cada lâmina devem ser dispensadas apenas uma gota.

A sementeira é efetuada por quadrantes em Gelose de Sangue que incuba em atmosfera em CO₂ e em MacConKey e inocular em hemocultura pediátrica (1 a 3 ml) ou passar para caldo de carne. Os meios são incubados a 35°C durante 24 a 48 horas.

Caso o pedido inclua cultura para BAAR, separa-se uma alíquota da amostra e envia-se para sector das Micobactérias.

5.2.5.9.3. Líquido Sinovial ou Líquido articular

O procedimento é bastante semente ao que ocorre com o líquido ascítico, mudando apenas os meios de cultura onde ocorre a sementeira da amostra. Processa-se a amostra em Gelose de Sangue e Gelose de Chocolate VCAT que incubam ambas em atmosferas de CO₂, em

MacConKey e inoculação em hemocultura pediátrica ou caldo de carne. Os meios de cultura incubam a 35°C durante 24 a 48 horas.

5.2.5.10. Pus

Neste caso, a amostra pode chegar ao laboratório de duas maneiras distintas, em meio de portagerme ou em zaragatoas, sendo sempre preferível o primeiro caso.

Quando enviado em portagerme deve sempre verificar-se que a condição de anaerobiose foi mantida, não havendo qualquer contacto com oxigénio. Quando processada, a tampa do frasco é desinfetada com álcool a 70%, e de seguida com o auxílio de uma seringa dispensar uma gota nos respetivos meios e na lâmina caso seja pedido exame microscópico. A lâmina é posteriormente corada pela metodologia de coloração de Gram. O exame cultural é feito em Gelose de Sangue que incuba em atmosfera de CO₂, em Gelose de Sangue que incuba em atmosfera de anaerobiose, em MacConKey e em caldo de carne. Estes meios incubam a 35°C durante 24 a 48 horas. Em casos específicos a sementeira é feita em Gelose Candida que incuba a 30°C durante 48 horas.

No caso de chegarem duas zaragatoas ao laboratório, uma seca e outra em meio de transporte, coloca-se a primeira em caldo de carne, e com a restante efetua-se o exame cultural. Os meios usados são os mesmos para pús em portagerme, à exceção de não se semear em Gelose de Sangue que incuba em atmosfera em anaerobiose. Se o pedido tiver exame microscópico, deve passar-se a zaragatoa numa lâmina, sendo esta posteriormente corada pela coloração de Gram. Sempre que chegar apenas uma zaragatoa, é colocada em caldo de carne e semeada em meio solido à posteriori no caso de haver crescimento, turvação do meio.

5.2.5.11. Líquido Cefalorraquidiano

O tubo que deve sempre ser processado é o tubo 3. Se o pedido tiver exame citológico este é realizado em câmara de contagem de *Nageotte*, e se por outro lado tiver exame microscópico são preparadas duas lâminas para posterior coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen.

No caso de o pedido conter exame cultural, deve ocorrer uma centrifugação inicial de 10 minutos a 2000 r.p.m.. A sementeira é efetuada a partir do sedimento formado na centrifugação e realizada por quadrantes em Gelose de Sangue e Gelose Chocolate com incubação a 35°C numa atmosfera de CO₂ durante 24 a 48 horas e em Sabouraud que incuba a 30°C durante 48 horas. Num frasco de hemocultura pediátrico deve ser inoculado 1 a 3 ml de amostra ou alternativamente em caldo de carne. Para o caso de o pedido ter exame cultural de BAAR devem ser colocadas 3 a 4 gotas em meio de Lowenstein e guardar na estufa.

Deve proceder-se à pesquisa de antigénios capsulares sempre que o diagnóstico seja de suspeita de meningite.

5.2.5.12. Biopsia

Sempre que possível quando chegar uma amostra de biopsia esta deve ser reduzida em pequenas partes com a ajuda de um bisturi. O exame cultural é efetuado em meio MacConkey e Gelose de Sangue que incubam a 35° durante 24 horas, o segundo numa atmosfera em CO₂, inocular ainda em caldo de carne. No caso de não ser possível reduzir a amostra, deve ser inoculada em caldo de carne a totalidade da amostra e após 24 horas transferir para os meios referidos anteriormente caso haja crescimento bacteriano. Para o exame microscópico prepara-se uma lâmina para posterior coloração de Gram.

5.2.5.13. Pesquisa de MRSA

A amostra é enviada em zaragatoa, sendo a pesquisa de MRSA feita no exsudado nasal. A sementeira deve ser efetuada em meio cromogéneo MRSA por quadrantes que incuba a 35°C de 24 a 48 horas. A zaragatoa após a sementeira deve ser colocada em meio líquido Todd-Hewitt que também deve incubar a 35°C. No caso do meio sólido dar um resultado negativo, deve ser confirmado passando o meio líquido para o meio cromogéneo MRSA.

5.2.6. Testes de Identificação Manual⁵³

5.2.6.1. Teste da Catalase

A catálase é a enzima responsável pela destruição dos peróxidos formados nas reações de oxidação. Quando há destruição de peróxidos há formação de duas moléculas de água e uma molécula de oxigénio que provoca libertação de bolhas. Sempre que a amostra apresente efervescência estamos, perante um caso de catálase positiva.

Numa lamina coloca-se uma gota de reagente (teste ID color Catalase da Bio-Merieux®) e mistura-se com uma ou duas colónias da amostra em estudo. O efeito das bolhas é praticamente imediato.

O teste permite a distinção de bactérias gram-positivas do género *Streptococcus* (catálase negativa), de bactérias do género *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria* (catálase positiva).

5.2.6.2. Teste da Coagulase

Caso o teste anterior tenha sido positivo este teste deve ser realizado para detetar a produção de coagulase que permite identificar *Staphylococcus aureus*, que é considerada a única espécie de *Staphylococcus coagulase* positiva patológica para o Homem.

S. coagulase forma uma reação de aglutinação com as partículas de latex do teste que estão revestidas com anticorpos monoclonais da *S. coagulase*.

Utilizando o teste Slidex® StaphPlus, colocam-se duas gotas de latex no cartão em círculos diferentes, uma para o teste e outra para o controlo. Misturar uma ou duas colónias da amostra no círculo de teste e agitar lentamente o cartão até passarem 30 segundos. O resultado é considerado positivo se houver aglutinação nos 30 segundos caso contrário é dado como negativo.

5.2.6.3. Teste de Resistência à Novobiocina

Este teste permite a diferenciação de duas espécies *Staphylococcus* coagulase negativa, a *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, o primeiro é sensível e o segundo resistente a novobiocina. Neste caso, este teste só é realizado no caso da prova de coagulase ser negativa.

Preparação de uma suspensão de NaCl com colónias da amostra de concentração 0,5 na escala de *MacFarland* e posterior inoculação em meio Muller-Hinton com disco de novobiocina e incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.

No caso de se verificar halo de inibição superior a 16 mm em redor do disco é considerada sensível à novobiocina e portanto estamos perante a espécie *S. epidermis*. Se por outro lado houver crescimento em redor do disco é considerada resistente à novobiocina e portanto é um *S. saprophyticus*.

5.2.6.4. Tipagem de *Streptococcus* β-hemolíticos

Este teste permite diferenciar os *Streptococcus* β-hemolíticos em grupos consoante os antígenos expressos segundo uma classificação de Lancefield. Após extração dos antígenos é possível identificá-los através de anti-soros preparados com partículas de latex que estão sensibilizadas com anticorpos específicos. Estes vão fixar os antígenos correspondentes e assim provocar uma aglutinação que é bem visível a olho nu.

Para que ocorra a extração do antígeno, 2 a 3 colónias da amostra são misturadas com 400 µl de enzima de extração, com incubação a 37°C durante 10 a 15 minutos. Posteriormente, é colocado em cada poço de uma carta o respetivo anti-soro, onde deve ser adicionado também 25 µl do preparado anterior sem que haja junção das duas gotas. Com o auxílio de um bastonete misturar as gotas e iniciar um movimento rotativo durante 1 minuto para se ver a aglutinação.

Deve ser efetuado um controlo positivo para validação do teste funcionando da mesma forma que a amostra sem que seja necessária uma primeira fase de extração.

A ausência de aglutinação é indicativa de um resultado negativo, e o aparecimento de aglutinação nítida é indicativo de um resultado positivo, sendo que uma aglutinação fraca deve ser desprezada. Pode verificar-se o aparecimento de aglutinação em mais do que um poço, nesses casos deve ser repetido o isolamento e posteriormente o teste.

5.2.6.5. Teste de Inibição à Bacitracina

Este teste vem complementar o anterior, permite distinguir *Streptococcus* B-hemolíticos do grupo A através da aplicação de discos de bacitracina que inibe somente o grupo A.

Efetua-se a sementeira desta espécie numa placa de Gelose de Sangue com um disco de bacitracina de 0,04 unidades que incuba a 35°C durante 18 a 24 horas.

Sempre que se verifique qualquer tipo de inibição o teste deve ser dado como positivo.

5.2.6.6. Teste da Optoquina

Dos *Streptococcus* sabe-se que *pneumococcus* é sensível à optoquina. Por isso o teste de sensibilidade à optoquina permite fazer uma identificação presuntiva rápida desta estirpe.

Semeia-se em placa de Gelose de Sangue as colónias a identificar, a partir de uma cultura pura, e coloca-se um disco de optoquina que incuba a 35°C durante 18 a 24 horas.

Quando se verificar uma inibição ao redor do disco (12 a 35 mm) estamos perante um resultado positivo logo, perante um *pneumococcus*. Caso esta inibição não ocorra é dado como negativo.

5.2.6.7. Teste dos fatores X, V e XV

Este teste permite a identificação de *Haemophilus influenzae*, devido a dependência pelos fatores X e V em simultâneo. Por isso se usa o meio de Muller-Hinton onde esta espécie não cresce pela ausência destes fatores.

Sementeira no meio Muller-Hinton a partir de cultura pura das colónias a identificar, com 3 discos, um de fator V outro de fator X e outro com os dois em simultâneo, em formato de triângulo. Os discos devem estar a uma distância razoável para não haver sobreposição de crescimento. O meio incuba é a 37°C durante 18 a 24 horas.

Em caso de estarmos perante *H. influenzae*, o crescimento vai ocorrer exclusivamente em torno do disco com os fatores em simultâneo. No caso de ser *H. parainfluenzae* vai desenvolver se em torno não só do disco com os fatores em simultâneo como também em torno do disco com o fator V.

5.2.6.8. Pesquisa de β -lactamases

Este teste pesquisa as resistências de alguns microrganismos específicos. Sobre uma lâmina é colocado um disco de Cefinase humidificado com gota de água. Com uma ansa, retirar colónias isoladas e colocar na superfície do disco.

Para um resultado negativo não se deve verifica qualquer mudança de cor, enquanto que um resultado positivo implica a mudança de cor amarela para vermelho na zona onde foram aplicadas as colónias.

Os resultados são adequados consoante o microrganismo, no microrganismo *Haemophilus influenzae* um resultado positivo após um minuto traduz-se numa resistência à ampicilina e sensibilidade às cefalosporinas. Nos microrganismos *Neisseria gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis* um resultado positivo decorrido um minuto implica resistência à penicilina. Um resultado positivo no caso do *Enterococcus faecalis* decorridos 5 minutos é indicativo de resistência à penicilina e à ampicilina.

5.2.6.9. Teste de Hidrolise da Ureia

Este teste controla a capacidade das bactérias de decompor ureia pela presença da enzima urease. A presença da urease é verificada através da alcalinidade do meio de ureia após inoculação da bactéria em estudo. A alcalinidade é testada pela mudança do indicador vermelho fenol pela produção de amoníaco.

Este é efetuado no estudo de gastroenterites, para diferenciar uma intoxicação por *Salmonella* que é urease negativa de um *Proteus* que é urease positiva. Esta diferenciação torna-se relevante na medida em que ambas as espécies produzem ácido sulfúrico apresentado colónias com um ponto negro no meio de SS.

No teste ocorre a junção de 400 µl de meio de ureia a 2 ou 3 colónias do microrganismo que se pretende estudar com incubação de 4 a 24 horas a 37°C.

Um resultado negativo é demonstrado pela permanência da cor rosa no meio, enquanto que um resultado positivo é demonstrado pela mudança de cor do meio para vermelho pela viragem do indicador vermelho fenol.

5.2.7. Testes de Identificação Serológica⁵³

5.2.7.1. Identificação Serológica de *E. coli* 0157:H7

Uma grande maioria das estirpes de *E. coli* que se isolam nas fezes humanas não são consideradas patogénicas, contudo algumas são responsáveis por diarreias graves tanto em crianças como adultos, entre elas as estirpes enteroinvasivas e as estirpes enterotoxigenas. Para identificar estirpes patogénicas recorre-se à identificação de 3 tipos de antigénios específicos, K (envólucro), O (somático) e H (flagelar). Uma das estirpes reconhecida como patogénica é a estirpe *E. coli* 0157:H7 capaz de provocar enterocolite hemorrágica grave.

Numa lâmina são colocadas duas gotas em separado, uma de anti-soro e uma de NaCl que irá funcionar como controlo negativo. Em cada um dos círculos ressuspender uma porção de amostra e agitar durante 1 minuto. O teste é considerado positivo sempre que se forme aglutinação no círculo.

5.2.7.2. Identificação Serológica da *Salmonella*

Segundo a classificação de *Kauffmann-White*, o género de *Salmonella* apresenta mais de 1000 serotipos com uma combinação de antígenos diferentes. A identificação desses serotipos concentra-se na deteção de antígenos O (somático) e H (flagelar) por uma reação de aglutinação com anti-soros específicos.

A divisão inicial das *Salmonellas* é pelos diferentes grupos O que dentro destes se subdividem em diferentes antígenos H, havendo uma grande variedade de serotipos diferentes.

Na análise do antígeno O usa-se uma lâmina com duas gotas, uma de anti-soro Bacto-Salmonella O e uma de NaCl, funcionando como controlo negativo. Junta-se uma porção da amostra em estudo para os diferentes círculos e ressuspende-se com posterior agitação de 1 minuto. Em resultados positivos ocorre uma aglutinação.

5.2.8. Testes de Identificação Automática⁵³

A fim de uniformizar o procedimento, diminuir erros sistemáticos e facilitar a identificação de microrganismos usa-se uma identificação automática que visa o reconhecimento do microrganismo através de cartas de identificação específicas para cada grupo de microrganismos.

As cartas de identificação podem identificar o grupo das gram-negativas (NG), para identificação de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, podendo ainda identificar grupos seletivos de bactérias gram-negativas não fermentadoras e membros da família *Vibrionaceae*. No caso das gram-positiva (GP), as cartas permitem identificar *Streptococcus*, *Staphylococcus* e um grupo selecionado de bacilos gram-positivos. Há cartas para o caso de estarmos perante a identificação de uma levedura (YST) permitindo identificação das leveduras mais prevalentes. Por outro lado, há cartas de identificação para microrganismos fastidiosos (NH) que apresentam um crescimento difícil como a *Neisserias*, *Haemophilus*, *Campylobacter*. Por fim, estão ainda disponíveis cartas para a identificação de microrganismos anaeróbios e bactérias da família *Corynebacterium* (ANC) concebida para a identificação destas bactérias.

As amostras que se devem usar para esta identificação têm que ser culturas puras com o máximo de 24 horas e para cada identificação deve ser efetuada uma placa. Para se efetuar a identificação deve se preparar um tubo com 3 ml de solução salina repicada com colónias isoladas da amostra a identificar numa concentração de 0,55 a 0,65 na escala *McFarland*. No caso das leveduras a concentração é de 1,8 a 2,5 na escala *McFarland*, já nos microrganismos de crescimento difícil é de 2,9 a 3,3 na escala *McFarland* e no caso dos Anaeróbios/*Corynebacterium* é de 2,7 a 3,3 na escala *McFarland*. É importante que a suspensão esteja homogeneia para se poder introduzir as cartas no tubo, dessa forma a amostra chega até aos poços e sofre incubação já no aparelho.

5.2.9. Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos⁵³

Anteriormente foram referidos testes de suscetibilidade a antimicrobianos manuais, neste tópico apresenta-se uma forma mais automatizada de chegar a essas suscetibilidades. Estes testes são essencialmente para microrganismos que apresentem algumas resistências a antimicrobianos habitualmente usados, mas a sua indicação estende-se a qualquer microrganismo causador de infeção. Deve-se ter em consideração que os antimicrobianos são escolhidos de acordo com o espectro de ação e com as suas propriedades farmacocinéticas.

Se por um lado se consegue identificar com maior precisão um microrganismo, também se consegue através de cartas de suscetibilidade identificar possíveis resistências desses mesmos microrganismos a antibióticos continuamente usados contra estes. Tal como no caso das cartas de identificação, também as cartas de suscetibilidade se dividem em grupos consoante o microrganismo que estejamos a estudar. Para gram-negativas há a AST-N192 e AST-N222, sendo esta última utilizada apenas em microrganismos que sejam oxidase positiva. Para gram-positivas há a AST-P619 e AST-P586, a última carta é utilizada exclusivamente em microrganismos que sejam catalase negativos. E para leveduras há a AST-YS06.

As cartas do antibiograma são colocadas também em tubos, em cada tubo deve conter 3 ml de solução salina com uma suspensão do tubo de identificação. A quantidade de suspensão depende de cada grupo de microrganismo, em gram-negativos pipeta-se 145 µl, em gram-positivo e no antifungigrama pipeta-se 280 µl.

A cassete com as cartas é colocada posteriormente na câmara de enchimento, aí devem permanecer até que este seja finalizado. Ocorre posterior transferência para a câmara de leitura/incubação das cartas onde o leitor/incubador guarda as cartas de teste com a amostra em ambiente com temperatura controlada. A leitura das cartas é feita de hora a hora com sensores fotométricos. O resultado baseia-se na alteração da cor no caso das cartas de identificação e na alteração da turvação no caso das cartas de suscetibilidade.

5.2.10. Testes de Biologia Molecular GenXPert-PCR®

5.2.10.1. Xpert® Carba-R⁷⁴

A progressão global de organismos não suscetíveis a carbapenemos, isto é, *Enterobacteriaceae* produtoras de *carbapenemases*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* é um problema de saúde pública grave. Estas bactérias apresentam um tratamento limitante, com resistência a todos os agentes beta-lactâmicos e ainda a diversas classes de agentes antimicrobianos. A progressão evidenciada deve-se à grande diversidade de enzimas hidrolisantes de carbapenemos que têm vindo a surgir e pela capacidade dos genes de se disseminarem entre as diversas espécies bacterianas.

O gene de resistência determinante da *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) está associado a linhagens clonais bem-sucedidas de bactérias que apresentam vantagem seletiva em unidades hospitalares. Do mesmo modo, os organismos que contêm o gene codificado *New Delhimetallobeta-lactamase* (NDM) foram introduzidos na Europa por indivíduos que, na maioria dos casos, visitaram a Índia ou o Paquistão. Um terceiro mecanismo de resistência a carbapenemos, a via mediada por *Verona integron-mediated metallo-beta-lactamase* (VIM) tem sido uma fonte de preocupação na Europa desde há vários anos. *Metallo-beta-lactamases* adicionais, como as da classe *imipenemase* (IMP), foram reconhecidas no Japão e noutros países asiáticos à vários anos e estão agora a alastrar-se a nível global, ao passo que a *oxacillinase* (OXA-48) de classe D, que frequentemente medeia a resistência de baixo nível a carbapenemos, mas não a resistência ao espectro alargado de beta-lactamases, está agora a alastrar rapidamente na Europa.

Este teste visa a deteção e diferenciação rápida das sequências dos genes blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaOXA-48 e blaIMP-1 que estão associados a não suscetibilidade a carbapenemos em bactérias gram-negativas obtidas a partir de amostras de zaragatoas retais em doentes de risco. São necessárias culturas concomitantes para recuperar o organismo para efetuar tipagem epidemiológica, testes de suscetibilidade antimicrobiana e para posterior identificação confirmatória de bactérias não suscetíveis a carbapenemos.

5.2.10.2. Xpert® CT/NG⁷⁵

Chlamydia trachomatis (CT) é um grupo de bactérias gram-negativas que funciona como parasita intracelular obrigatório de células eucariotas pela sua incapacidade de sintetizar ATP. A espécie CT é constituída por pelo menos 15 serotipos diferentes responsáveis por doenças em humanos, sendo que destes o serotipo D e K estão associados a infeções genitais tanto em homens como mulheres. Sem tratamento a CT pode provocar um quadro clínico variado, podendo levar à infertilidade no caso das mulheres. *Neisseria gonorrhoeae* (NG) são diplococos gram-negativos causadores da doença gonorreia, que se encontra classificada como a segunda doença sexualmente transmitida bacteriana mais frequente. Tal como a CT também esta bactéria não apresenta motilidade. No caso dos homens as infeções originam sintomas e desse modo o início de um tratamento, enquanto que nas mulheres a frequente ausência de sintomas provoca o surgimento de complicações por falta de tratamento adequado.

O teste em questão tem como intuito a deteção e diferenciação automática de DNA genómico de CT e de NG para ajudar no diagnóstico de doença urogenital clamidia e gonorreia. Este ensaio permite utilizar urina de homens e mulheres, zaragatoa endocervical e zaragatoa vaginal.

5.2.10.3. Xpert® MRSA NxG⁷⁶

Staphylococcus aureus é considerado um agente patogénico humano que provoca infeções comunitárias ou associadas a cuidados de saúde. Meticilina foi introduzida como tratamento a esta infeção como alternativa a penicilina que se tornou ineficaz, contudo após algum tempo foram identificadas estirpes resistentes a este fármaco, MRSA. Essa resistência é conferida quando *Staphylococcus aureus* adquire um complexo de gene *mec* que contem o gene *mecA* e *mecC* denominados de cassette cromossómica estafilocócica (SCC). O controlo do MRSA é de extrema importância pelos valores significativos de morbidade e mortalidade expressos chegando a atingir 33%.

O teste em questão visa a deteção de DNA de MRSA diretamente a partir de zaragatoas nasais em pacientes de risco para colonização nasal.

5.2.10.4. Xpert® MTB/RIF⁷⁷

A infeção por *Mycobacterium tuberculosis* é uma infeção maioritariamente de natureza pulmonar que afeta uma grande parte da população onde o risco de transmissão é muito elevado. Devido ao número excessivo de mortes que ocorrem por esta infeção é importante que o diagnóstico seja rápido e exato para que possa haver um tratamento adequado e o devido controlo de propagação. O tratamento envolve a administração prolongada de múltiplos fármacos, sendo que de uma forma geral é bastante eficaz. Contudo por vezes as estirpes provocadoras desta infeção criam resistências aos fármacos, dificultando o tratamento. Há essencialmente 4 fármacos de primeira linha, a isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Quando ocorre resistência a rifampicina esta geralmente não ocorre isolada, indicando resistência também por parte de outros fármacos anti-tuberculose. Tuberculose multirresistente é definida como uma doença causada por uma estirpe bacteriana que apresenta pelo menos resistência à isoniazida e à rifampicina. Resistências a fármacos de primeira linha implicam pedido de suscetibilidade a antibióticos não só de primeira com de segunda linha. Deteção molecular de mutações no gene *rpoB* que está fortemente associada a resistência a rifampicina acelera o diagnóstico de suscetibilidade a fármacos e de tuberculoses multirresistentes e desta forma permitir ao clínico adequar melhor o tratamento.

Este teste visa a deteção de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de expectoração e possíveis mutações do gene *rpoB*. Este teste não se aplica a pacientes em tratamento de suspeita clínica tuberculose.

5.3. Imunoquímica

5.3.1. Contextualização Teórica⁷⁸

Num laboratório de química clínica e de imunologia podemos encontrar um grande número de parâmetros que se podem efetuar, esses parâmetros estão associados aos mais variados sistemas do nosso organismo:

✓ O rim está intimamente envolvido na manutenção da composição dos vários fluidos corporais, na formação de glóbulos vermelhos através da produção de eritropoietina, no controlo da formação de vitamina D e essencialmente na eliminação dos produtos residuais do metabolismo que está relacionada com a taxa de filtração glomerular. Os parâmetros analíticos que podem auxiliar um diagnóstico no rim são a ureia, creatinina, cálcio e fosfato.

✓ A glândula da tiroide é responsável pela formação da triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Por sua vez, a hormona estimulante da tiroide (TSH) estimula a glândula da tiroide a produzir T4 e T3. As duas patologias mais comuns à glândula da tiroide é o hipotiroidismo ou hipertiroidismo. O hipotiroidismo primário é caracterizado por baixos valores de T4 e elevados valores de TSH enquanto que o hipotiroidismo secundário é caracterizado por baixos valores de ambas as hormonas, TSH e T4. O hipertiroidismo primário é caracterizado por elevados valores de T4 e baixos valores de TSH enquanto o hipertiroidismo secundário é caracterizado por valores altos de ambas as homonas, T4 e TSH.

✓ O fígado está envolvido na síntese de grande parte das proteínas e como tal uma desregulação hepática poderá acarretar complicações clínicas. As principais doenças que se podem distinguir no fígado são as hepatites, cirrose, doenças biliares e insuficiência hepática fulminante. Hepatite é clinicamente acompanhada com níveis baixos de aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT). Por outro lado, cirrose e insuficiência hepática fulminante, podem ser acompanhadas de níveis de proteínas totais e albumina baixos.

✓ No coração a doença mais recorrente é a doença arterial coronariana, que afeta as artérias. Esta patologia pode incluir episódios de oclusão trombótica de fluxo sanguíneo coronário causando uma síndrome coronária aguda. Em casos de baixa necrose esta síndrome pode traduzir-se em enfarte do miocárdio. Os testes primários a nível laboratorial para o diagnóstico de doenças coronárias são os marcadores cardíacos, como a troponina cardíaca que deriva do musculo cardíaco. Há ainda um conjunto de fatores de risco associados à progressão da doença como marcadores lipídicos (colesterol, triglicéridos e frações lipoproteicas específicas) homocisteína

(HCy) e proteína C-reativa (PCR). No caso da Hcy é um aminoácido que agrava a trombose enquanto que a PCR é um marcador inflamatório.

5.3.2. Metodologia pelo Cobas® 6000⁷⁹

A secção possui um equipamento cobas® 6000 que junta a química clínica com a imunologia, sendo este composto por uma unidade central e uma combinação de até 3 módulos analíticos consoante a necessidade do laboratório, neste caso um modulo c501 e 2 módulos e601. Tanto o modulo c501 como o modulo e601 são analisadores totalmente automáticos que garantem a integridade e o volume da amostra e a deteção dos níveis de líquido e coágulo. Este equipamento pode efetuar medições em soro, plasma, urina, LCR, líquido pleural e líquido ascítico.

5.3.2.1. Cobas®6000: c501^{78,79}

O módulo c501 utiliza uma unidade fotométrica estando habilitado a efetuar um grande número de ensaios de química clínica com medição de proteínas, enzimas, substratos e eletrólitos.

O modulo c501 usa ensaios fotométricos ou imunoturbidimétricos. No primeiro caso, os ensaios fotométricos, medem a energia radiante que é absorvida ou transmitida determinando a concentração de um analito final pela razão entre o comprimento de onda e intensidade dessa radiação. Especificamente podemos referir a calorimetria que compara a cor de uma amostra em estudo com um conjunto de padrões definidos com concentração conhecida ou também a espectrofotometria. Para o caso da medição da concentração de complexos antigénio-anticorpo e outras proteínas séricas de grandes dimensões usa-se um imunoensaio turbidimétrico. Este imunoensaio mede a redução da transmissão de luz devido à formação de partículas, detetando uma pequena diminuição em um sinal grande.

Pela técnica de fotométrica fazem-se os seguintes parâmetros: Ácido úrico, Ureia, Bilirrubina (direta e total), Cálcio, Creatina cinase, Colesterol (HDL e LDL), Creatinina, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo, GGT, Glicose, AST, ALT, Magnésio e Amicacina.

Pela técnica de imunoturbidimetria são feitos os seguintes parâmetros: Fator Reumatoide, Cadeias leves livres (K e lamda), Alfa-1-antitripsina, Lipoproteína a, Haptoglobulina, Recetor solúvel da Transferrina, Transferrina, Proteína C Reativa C3, C4, IgA, IgG, IgM, Beta-2-microglobulina e ECA.

A unidade com o elétrodo seletivo de iões ISE mede sódio, potássio e cloro por potenciométrica indireta. Este princípio baseia-se numa membrana semipermeável a um ião em estudo. Sempre que esse ião passa pela membrana irá criar uma diferença de potencial que é determinada por um elétrodo e dessa forma calcular uma concentração. Neste caso a concentração do ião sódio, potássio e cloro em amostras de soro, plasma e urina.

5.3.2.2. Cobas®6000: e601⁷⁹

O modulo e601 realiza uma ampla gama de testes de imunoensaio usando uma tecnologia de eletroquimioluminescência. Por este tecnica fazem-se os seguintes parâmetros: Ferritina, PSA (total e livre), TSH, T3 e T4 livres, Folatos, Vitamina B12, Vitamina D, Paratormona, CA 19.9, CEA, CA 72.4, CA 15.3, Tiroglobulina, Ac-HCV, Ac-HIV I/II, ACHBs, AgHBs e AchBc.

5.3.3. Metodologia pelo Cobas®4000: e411⁸⁰

O equipamento cobas e411 é um analisador completamente automatizado que se baseia num imunoensaio de eletroquimioluminescência. As determinações são quantitativas e qualitativas de ensaios in vitro para um grande número de testes, entre eles o doseamento do proBNP, hormona anti-mulleriana e da pro-calcitonina.

5.3.4. Metodologia pelo Architect^{TM78,81}

O ARCHITECTTM, realiza uma serie de testes que se baseiam num imunoensaio enzimático quimioluminescente. Estes imunoensaios utilizam substratos quimioluminescentes que reagem com várias enzimas que funcionam como marcadores. A reação enzimática que ocorre gera luz que apresenta uma razão linear com a concentração de analito. Alguns dos parâmetros doseados por este aparelho são marcadores cardíacos (creatina cinase (CK-MB), mioglobina, troponina e homocisteína), cortisol, estrogénio, hormona folículo-estimulante (FSH), vírus da hepatite A, B e C (vírus da hepatite C (HCV), antigénio e anticorpo), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus linfotópicos da célula T humana, hormona luteinizante (LH), progesterona, prolactina, globulina de ligação de hormonas sexuais (SHBG), testosterona, *treponema pallidum*, vírus *Epstein-Barr*, rubéola, citomegalovirus, anti-tiroglobulina, anti-peroxidase.

Com a finalidade de perceber se uma infeção é atual ou já é antiga é realizado também o teste da Avidéz, que se baseia na afinidade da imunoglobulina G (Ig) para o antigénio do vírus, sabendo que esta afinidade vai aumentando progressivamente ao longo do tempo. Por isso a avidéz pode ser definida como a força de ligação do antigénio do vírus a uma população de IgG. Uma infeção primaria apresenta baixa afinidade e consequentemente baixa avidéz, uma infeção antiga apresenta alta afinidade, logo alta avidéz. Este teste tem um papel importante na gravidez.

5.3.5. Metodologia pelo ImmunoCAP^{78,82}

O Phadia[®] 250 apresenta uma enormidade de sistemas, que se destinam à execução de testes de alergias com ensaios do ImmunoCAP e autoimunidade com ensaios do EliA. Os ensaios do ImmunoCAP incluem entre outros a pesquisa de alergias a microrganismos, grama, ervas

daninhas, pólenes de árvores, ácaros, gatos, cachorros e outros animais com pelo, insetos, venenos e alérgenos alimentares. É considerada alergia um conjunto de reações de hipersensibilidade por parte do sistema imunitário a agentes que em condições normais não causaria qualquer problema à grande maioria das pessoas.

O resultado obtido é totalmente quantitativo permitindo a confirmação ou exclusão de uma suspeita de sensibilização alérgica, com a identificação do alérgeno agressor. Pode-se observar ainda níveis séricos de anticorpo ao longo do tempo e deteta se os pacientes necessitam de testes adicionais.

A metodologia é a ELISA indireto, que se baseia em reações antigénio-anticorpo. Nesta técnica um antigénio que se encontra no poço de reação reage com os anticorpos presentes na amostra que se pretende estudar, sendo posteriormente detetado pela adição de um segundo anticorpo. Este segundo anticorpo contra as imunoglobulinas que estão a ser detetadas está ligado a uma enzima que na presença de um substrato apropriado reage para formar um produto fluorescente, podendo ser quantificado por fluorescência.

5.3.6. Diagnóstico por técnicas de Biologia Moleculares

Recorrendo-se a técnicas de biologia molecular estuda-se o vírus da hepatite C e a carga viral da imunodeficiência humana (HIV) usa-se o aparelho cobas® 4800. Por outro lado, para quantificar vírus respiratórios usam-se dois equipamentos também eles através de técnicas de biologia molecular, o *MagNA Pure Compact* e o o CFX96™ *Real-Time System*.

5.3.6.1. Estudo do HCV e Carga Viral do HIV⁸³

O sistema completamente automatizado cobas® 4800 utiliza uma tecnologia de PCR em tempo real para conseguir a amplificação e deteção do material genético. Este equipamento subdivide-se em cobas® x480 e cobas® z480. No primeiro ocorre extração e purificação dos ácidos nucleicos. Para que ocorra a extração é necessário que as células sofram uma lise e assim libertar os ácidos nucleicos para a solução com micropartículas magnéticas. Estas micropartículas ligam-se aos ácidos nucleicos pela afinidade para com estes. Com as sucessivas lavagens que ocorrem posteriormente todos os restantes constituintes da célula são desprezados, ficando somente os ácidos nucleicos ligados às micropartículas. A eluição dos ácidos nucleicos é feita com um eluente que provoca a quebra de ligação entre os ácidos nucleicos e as micropartículas que ficam fixas no fundo do poço por força magnética. Obtém-se os ácidos nucleicos purificados e prontos para serem quantificados numa segunda etapa⁸³. Já no termocicladorcobas® z480 vai ocorrer a reação de PCR em tempo real. A técnica de PCR em tempo real é efetuada por ciclos, sendo que consoante o ciclo a temperatura vai alterando. Inicialmente tem que ocorrer uma desnaturação das cadeias do ácido nucleico que se pretende quantificar, seguida de um *annealing* dos *primers* que se encontram marcados por fluoróforos. Por último ocorre uma extensão.

5.3.6.2. Quantificação de Vírus Respiratórios ^{84, 85}

O equipamento MagNA Pure Compact é responsável pela extração dos ácidos nucleicos com um processamento bastante parecido ao anterior. Libertação dos ácidos nucleicos por lise celular e ligação deste a micropartículas, após remoção do restante conteúdo celular os ácidos nucleicos são libertados e purificados. Neste caso o processo não é totalmente automatizado, sendo necessário haver uma adição manual de todos os reagentes necessários à reação. No fim é colocado no aparelho CFX96™ Real-Time System, onde irá ocorrer o PCR em tempo real. A interpretação dos resultados é feita de forma automática através de algoritmos validados.

5.3.7. Eletroforese de Proteína ^{78,86}

A composição proteica que se conhece atualmente, foi em grande parte devido a técnicas de eletroforese. A separação de proteínas do soro e plasma em uma solução eletrolítica pela aplicação de corrente elétrica levou ao reconhecimento de 4 frações proteicas, a albumina; α ; β e γ . Estas 4 frações proteicas foram identificadas e quantificadas oticamente pela mudança no índice de refração nas fronteiras entre essas bandas. Com a evolução dos meios usados percebeu-se que a fração α se podia dividir em dois grupos, α_1 e α_2 . A eletroforese de proteínas séricas e urinárias é, portanto, considerada uma técnica para a triagem de amostras com anormalidades proteicas como gamopatias ou padrões inflamatórios.

Através do instrumento HYDRASYS semi-automatizado que vem equipado com aplicador de amostras, migração por eletroforese e coloração consegue-se a separação de proteínas séricas em 5 frações principais recorrendo a géis HYDRAGEL PROTEIN (E). Um sistema de digitalização pode ainda ser fornecido pelo HYDRASYS 2 SCAN que permite a leitura de géis de agarose. Essa leitura dá um perfil de proteínas para a sua análise quantitativa relativa. Tal não seria possível com a visualização direta do gel que daria um resultado qualitativo.

O princípio do teste baseia-se na separação de proteínas por eletroforese em gel de agarose. Os passos automatizados incluem, o carregamento da amostra nos aplicadores com recurso ao pipetador ASSIST, aplicação da amostra, seguida de migração por eletroforese, secagem, coloração e secagem final.

5.3.8. Caracterização Imunológica de Imunoglobulinas ⁸⁷

A imunofixação de imunoglobulinas é uma técnica usada para caracterizar qualquer achado monoclonal suspeito, que foi previamente detetado por eletroforese de proteínas. Através do Kit HYDRAGEL IF conseguimos uma separação e caracterização de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas com recurso a anti-soros específicos.

A metodologia, modo de funcionamento e aplicações são os mesmos da eletroforese de proteínas através do instrumento HYDRASYS semi-automatizado. Este ensaio é extremamente sensível, detetando e identificando até componentes monoclonais muito pequenos.

O princípio do ensaio é bastante semelhante ao referido anteriormente adicionando um passo de imunofixação. Ocorre inicialmente uma eletroforese em gel de agarose seguindo-se uma imunofixação, isto é, após ocorrer a separação das proteínas de acordo com a sua carga o gel é incubado com diferentes anti-soros que vão ser específicos para cadeias pesadas gama (IgG), alfa (IgA) e mu (IgM) e para cadeias leves livres e ligadas de Kappa (K) e Lambda (λ). Após remoção de excessos de anti-soros efetua-se a coloração.

5.3.9. Análise de Urinas⁸⁸

O SediMax acoplado ao leitor de fitas AUTIONMaxle é um sistema totalmente automatizado que combina a análise dos sedimentos urinários com a análise química da urina.

SediMax é um analisador de sedimentos de urina que combina microscopia de campo claro e contraste de fase, conseguindo assim a captura de imagens de alta qualidade em um sistema ótico, levando a resultados mais precisos.

As tiras de reagentes do AUTIONMaxle permitem a eliminação do erro humano e diminuição do tempo e trabalho de processamento. Todas as amostras de urina que tenham uma análise sumária são colocadas no equipamento e analisados os seguintes parâmetros: glicose, proteína, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos.

5.3.10. Imunoensaios Cromatográficos

Estão disponíveis um conjunto de testes rápidos que visam a deteção qualitativa de drogas de abuso e seus metabolitos, e um teste de gravidez. A metodologia destes testes foi descrita anteriormente.

5.3.10.1. Testes das Drogas de Abuso⁸⁹

O One Step Drug Screen Test Device em amostras de urina é um imunoensaio que se baseia na ligação competitiva. As drogas que se encontram na amostra competem com o seu conjugado por um local de ligação em anticorpos específicos. Como todos os imunoensaios competitivos um resultado positivo implica o não aparecimento de uma linha na zona de teste ao mesmo tempo que aparece uma linha na zona de controlo. Um resultado negativo é dado pelo aparecimento de duas linhas, uma na zona de teste e outra na zona de controlo.

São transferidas 3 gotas de urina para o poço da amostra no dispositivo de teste e contabilizados 5 minutos para serem lidos os resultados. O tempo de leitura não pode ultrapassar os 10 minutos.

5.3.10.2. Teste de Gravidez⁹⁰

VISITECT GRAVIDEZ é um imunoenensaio *sandwich* que determina a presença de gonadotrofina coriônica humana (hCG), um marcador de gravidez. Este teste pode ser efetuado tanto na urina como no soro estando habilitado a detetar baixas concentrações deste marcador. A hormona glicoproteica hCG é segregada pelo tecido placentário e excretada na urina aproximadamente 20 dias após o último período menstrual. Sendo por isso considerada um bom marcador para confirmação de uma gravidez. Contudo, há complicações clínicas como neoplasias trofoblásticas e não trofoblásticas que podem estar associadas a níveis de hCG elevados.

O procedimento é bastante idêntico ao teste anterior, mudando apenas a quantidade de amostra, neste caso transfere-se apenas 2 gotas para o poço da amostra. Caso seja usado soro e não urina, espera-se 15 minutos para ler os resultados.

5.3.11. Testes de Imunofluorescência⁹¹

A imunofluorescência indireta (IFA) baseia-se na reação dos anticorpos presentes na amostra com antigénios que revestem os poços da lâmina. Após a ligação entre antigénios e anticorpos ocorre uma lavagem para libertar todos os componentes que não se ligaram, seguindo-se uma revelação do complexo formado, antigénio-anticorpo, pela globulina anti-humana que esta previamente marcada com fluoresceína e visto em microscópio de fluorescência.

O resultado final terá em consideração a diluição até onde se verificou a positividade, daí a importância das diluições. Sempre que se observar fluorescência de morfologia coco-bacilar de cor verde a reação é positiva, sendo que para ser negativa não pode haver fluorescência.

5.3.11.1. *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA⁹¹

A *Coxiella burnetii* é capaz de causar febre Q, uma doença sistémica que pode originar pneumonia atípica, síndrome febril, hepatite e endocardite. A IFA é das técnicas mais usadas para o diagnóstico, com alta sensível e específica para detetar a resposta IgM. Estes anticorpos apresentam-se como uma forma de diagnóstico de uma fase aguda da doença pois aparecem a partir da segunda semana da doença aguda e tornam-se indetetáveis a partir do terceiro mês. Após uma infeção inicial, mais propriamente a partir das 4 a 8 semanas já se pode detetar um pico de IgG. Por outro lado, quer para uma confirmação quer para uma monitorização terapêutica da doença crónica, é essencial que haja uma deteção de anticorpos IgA.

Para pesquisa de *Coxiella burnetii* em soro humano recorre-se à determinação de anticorpos IgG, IgM e IgA com recurso a um kit de imunofluorescência indireta (IFA). O procedimento de deteção dos anticorpos é diferente. Para deteção dos anticorpos IgG, começa-se por fazer um conjunto de diluições, destas retiram-se 5 µl para um poço da lâmina, cada diluição com um poço distinto, e a lâmina fica a incubar em camara húmida durante 30 minutos a 37°C. Após se verificar que as lâminas estão secas, adiciona-se a cada poço 5 µl de anti-IgG humana e a lâmina volta a incubar nas mesmas condições. Junta-se por fim uma gota de meio de montagem e cobre-se com uma lamela, isto para todos os poços. Por fim é examinado no microscópio de fluorescência em objetiva de 400X. No que diz respeito à deteção dos anticorpos IgM e IgA, eles são submetidos a uma diluição inicial de 1/2. Posteriormente adiciona-se 10 µl dessa diluição a 50 µl de adsorvente de IgG. A amostra deve ser agitada vigorosamente e procede-se a novas diluições a partir desta nova amostra. Os passos que se seguem são iguais aos descritos para a deteção de anticorpos IgG com duas exceções, a incubação inicial após adição das amostras diluídas no caso da deteção do anticorpo IgM deve ser de 90 minutos e para o anticorpo IgA mantém os mesmos 30 minutos referidos anteriormente. A outra exceção é referente à solução que se adiciona a fim de detetar os anticorpos, no caso de pretendermos detetar anticorpos IgM é adicionada anti-IgM humana, caso se pretenda identificar anticorpos IgA, adiciona-se anti-IgA humana. Ao longo do todo o processo temos dois controlos, o positivo e o negativo. Os controlos não sofrem qualquer diluição e no segundo caso não são tratados com adsorvente, sendo apenas pipetados nos poços da lâmina como qualquer amostra de soro diluída e é lhe adicionado a solução contra o anticorpo que se pretende estudar, tal como se fosse uma amostra.

5.3.11.2. *Rickettsia conorii* IFA IgG⁹²

Rickettsia conorii é responsável por uma doença endémica que produz febre escaro-nodular mediterrânea. A caracterização desta doença passa por períodos febris, exantema e mancha negra no local da picada da carraça. A técnica que se usa para diagnóstico é a IFA pelo facto de conseguir resultados numa fase inicial da doença, pela simplicidade e pela ausência de reações cruzadas, conseguindo detetar anticorpos IgG e IgM. Estes anticorpos têm comportamentos bastante diferentes no que toca a infeções primárias ou a reinfeções, sendo que no caso de infeções primárias vamos encontrar tanto anticorpos IgG como IgM, estas últimas aparecem primeiro. Relativamente a reinfeções não se verifica o mesmo, em grande parte dos casos não se verifica a presença de anticorpos IgM, sendo o diagnóstico apenas possível através de anticorpos IgG.

O procedimento é bastante idêntico ao efetuado no teste anterior, inicia-se com diluição da amostra inicial e posterior pipetagem de 20 µl das soluções diluídas para poços da lâmina. Após a incubação de 30 minutos em camara húmida a 37°C e a lâmina estar seca, pipetar 20 µl de anti-IgG humana em cada poço. A lâmina repete a incubação tal como referida anteriormente. Por fim procede-se à montagem da lâmina para esta ser vista ao

microscópio de fluorescência em objetiva de 400X. Em caso de positividade nas diluições anteriores, efetuar outras diluições para se poder retirar mais conclusões. Também neste teste se verifica a mesma situação em relação aos controlos.

6. Conclusão

Após o término deste estágio é importante fazer um balanço de todos os aspetos positivos e negativos, com a perspetiva que num geral foi um estágio que cumpriu com os objetivos. Permitiu-me evoluir tanto a nível pessoal como a nível profissional, na medida em que um contacto direto com as áreas laboratoriais de hematologia, microbiologia e imunoquímica permitiram ganho de conhecimento a nível técnico e ganho de autonomia em realidade laboral. A oportunidade de vivenciar situações praticas e reais, intervindo ativamente foi muito vantajoso não só para perceber quais as áreas em que sinto mais à vontade como para despertar o interesse em outras que até ao momento não me interessavam. Considero portanto que o balanço num geral é muito positivo e me trará mais confiança num contexto profissional, bem como uma melhor adaptação a outras situações que surjam e uma facilidade acrescida de interagir positivamente com as restantes pessoas.

Os aspetos negativos ou melhor dizendo, aspetos menos positivos acabaram por ser ofuscados por todo o espírito de entreaajuda que se viveu ao longo do estágio, onde todos os colaboradores do SPC se demonstraram sempre disponíveis a ajudar e a transmitir aquilo que sabiam. Contudo a maior limitação que senti foi numa parte inicial do estágio onde por questões de insegurança e falta de prática em contexto laboratorial houve algum nervosismo e ansiedade que me limitavam, mas com o decorrer do estágio todos esses receios foram-se dissipando, o que permitiu uma melhor abordagem na prática diária.

De momento fica um sentimento de saudade da rotina laboratorial bem como de todos os colaboradores, que me permitiram fazer deste estágio uma experiência única e muito vantajosa.

IV. Bibliografia

1. <http://www.chcbeira.pt/?cix=729&ixf=seccao&lang=1>. Consultado a 20/05/2019.
2. Leung, Raymond YH, et al. "Serum metabolomic profiling and its association with 25-hydroxyvitamin D." *Clinical Nutrition* (2019).
3. Chiang, Chien-ming, et al. "Effects of Vitamin D Supplementation on muscle strength in athletes: a systematic review." *The Journal of Strength & Conditioning Research* 31.2 (2017): 566-574.
4. Alves, Márcia, et al. "Vitamina D-importância da avaliação laboratorial." *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* 8.1 (2013): 32-39.
5. Dirks, Niek, et al. "The when, what & how of measuring vitamin D metabolism in clinical medicine." *Nutrients* 10.4 (2018).
6. Bivona, Giulia, et al. "The immunological implication of the new vitamin D metabolism." *Central-European journal of immunology* 43.3 (2018)
7. Holick, Michael F. "Vitamin D deficiency." *New England Journal of Medicine* 357.3 (2007): 266-281.
8. Schuch, Natielen Jacques, et al. "Vitamina D e doenças endocrinometabólicas." *Arq Bras Endocrinol Metab* 53.5 (2009): 625-33.
9. Lai, Yu Tsun, et al. "Determination of vitamin D in tears of healthy individuals by the electrochemiluminescence method." *Journal of clinical laboratory analysis* (2019).
10. Muscogiuri, Giovanna, et al. "Mechanisms in endocrinology: vitamin D as a potential contributor in endocrine health and disease." *European journal of endocrinology* 171.3 (2014): R101-R110.
11. Santos, Maria Joana, et al. "Carência de Vitamina D numa População Hospitalar: Uma Fotografia pela Perspetiva Laboratorial." (2015).
12. Moon Rebecca J, et al. "Vitamin D, and Maternal and Child Health." *Calcif Tissue Int.* 2019.
13. Sassi, Francesca, et al. "Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator." *Nutrients* 10.11 (2018).
14. Herrmann, Markus, et al. "Assessment of vitamin D status-a changing landscape." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 55.1 (2017): 3-26.
15. Santiago, Tânia, et al. "Hipovitaminose D em doentes internados num Serviço de Medicina Interna." (2012).
16. Ivison, Fiona M., et al. "Development of a mass spectrometry method for 1, 25-dihydroxy vitamin D3 using immunoextraction sample preparation." *Annals of clinical biochemistry* (2019).
17. Ferrari, Davide, et al. "Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement." *Biochimica medica: Biochimica medica* 27.3 (2017): 1-14.
18. Holick, Michael F., et al. "Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96.7 (2011): 1911-1930.
19. Mariani, Laura H., et al. "Increasing use of vitamin D supplementation in the chronic renal insufficiency cohort study." *Journal of Renal Nutrition* 24.3 (2014): 186-193.
20. Pérez-Ricart, A., et al. "Long-term effectiveness of cinacalcet in non-dialysis patients with chronic kidney disease and secondary hyperparathyroidism." *Kidney research and*

clinical practice 38.1 (2019).

21. McCarthy, Aisling, et al. "Management of primary hyperparathyroidism in pregnancy: a case series." *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports* 2019.1 (2019).
22. Shieh, Albert, et al. "Assessing vitamin D status in African Americans and the influence of vitamin D on skeletal health parameters." *Endocrinology and Metabolism Clinics* 46.1 (2017): 135-152.
23. D'Aurizio, Federica, et al. "Is vitamin D a player or not in the pathophysiology of autoimmune thyroid diseases?." *Autoimmunity reviews* 14.5 (2015): 363-369.
24. Santi, Maristella, et al. "Prescription of vitamin D among Swiss pediatricians." *European journal of pediatrics* (2019): 1-5.
25. Xie, L., et al. "Young adult vegetarians in Shanghai have comparable bone health to omnivores despite lower serum 25 (OH) vitamin D in vegans: a cross-sectional study." *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 28.2 (2019): 383-388.
26. Marcinowska-suchowierska Ewa, et al "Vitamin D Toxicity - A Clinical Perspective". 2018;9(September):1-7.
27. Dawson-Hughes, B., et al. "IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults." *Osteoporosis International* 21.7 (2010): 1151-1154.
28. Emmen, Judith MA, et al. "The new Roche Vitamin D Total assay: fit for its purpose?." *Clinical chemistry and laboratory medicine* 50.11 (2012): 1969-1972.
29. Abdel-Wareth, Laila, et al. "Total vitamin d assay comparison of the roche diagnostics "Vitamin D Total" electrochemiluminescence protein binding assay with the chromsystems HPLC method in a population with both D2 and D3 forms of vitamin D." *Nutrients* 5.3 (2013): 971-980.
30. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/electsys-vitamin-d-total-ii.html#productInfo>. Consultado a 19/06/2019.
31. http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20180323/cHA_XzjMhUzLfdgCRJIKG/cli_20171201_20171231_pcl_aa_co_pt.pdf. Consultado a 01/06/2019.
32. Al-Daghri, Nasser M., et al. "Sex-specific vitamin D effects on blood coagulation among overweight adults." *European journal of clinical investigation* 46.12 (2016): 1031-1040.
33. Wehr, Elisabeth, et al. "Association of vitamin D status with serum androgen levels in men." *Clinical endocrinology* 73.2 (2010): 243-248.
34. Everett, Thomas R., et al. "Pre-eclampsia: the potential of GSNO reductase inhibitors." *Current hypertension reports* 19.3 (2017).
35. Hangelbroek, Roland WJ, et al. "No effect of 25-hydroxyvitamin D supplementation on the skeletal muscle transcriptome in vitamin D deficient frail older adults." *BMC geriatrics* 19.1 (2019).
36. Chang, Szu-Wen, et al. "Vitamin D and health-The missing vitamin in humans." *Pediatrics & Neonatology* 60.3 (2019): 237-244.
37. Mutt, Shivaprakash Jagalur, et al. "Vitamin D Status and Components of Metabolic Syndrome in Older Subjects from Northern Finland (Latitude 65° North)." *Nutrients* 11.6 (2019).
38. Hochberg, Zeev, et al. "Evolutionary perspective in rickets and vitamin D." *Frontiers in endocrinology* 10 (2019).
39. Pludowski Pawel, et al. "Editorial: Classic and Pleiotropic Actions of Vitamin D." 2019;10(May).
40. Mansy, Wael, et al. "Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphism in Saudi children with acute lower respiratory tract infection." *Molecular biology reports* (2019): 1-8.

41. Wajda, Jarosław, et al. "Severity of Vitamin D Deficiency Predicts Mortality in Ischemic Stroke Patients." *Disease markers* 2019 (2019).
42. Chen Xin, et al. "Free 25-Vitamin D Is Correlated with Cardiovascular Events in Prevalent Hemodialysis Patients but Not with Markers of Renal Mineral Bone Disease." *Kidney Blood Press Res.* (2019):1-10.
43. Bonnet, Colin, et al. "The Relation Between Periodontal Disease and Vitamin D." *J Can Dent Assoc* 85.j4 (2019): 1488-2159.
44. Cantorna, Margherita T., et al. "Aligning the Paradoxical Role of Vitamin D in Gastrointestinal Immunity." *Trends in Endocrinology & Metabolism* (2019).
45. Ahmed, Ahmed El-Abd, et al. "Vitamin D receptor rs7975232, rs731236 and rs1544410 single nucleotide polymorphisms, and 25-hydroxyvitamin D levels in Egyptian children with type 1 diabetes mellitus: effect of vitamin D co-therapy." *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 12 (2019).
46. Bizzaro, Giorgia, et al. "Vitamin D and autoimmune diseases: is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit." *Isr Med Assoc J* 19.7 (2017): 438-443.
47. Yoo, Kyoung-Ok, et al. "Association between vitamin D intake and bone mineral density in Koreans aged ≥ 50 years: analysis of the 2009 Korea National Health and Nutrition Examination Survey using a newly established vitamin D database." *Nutrition research and practice* 13.2 (2019): 115-125.
48. Guła, Zofia, et al. "Vitamin D serum concentration is not related to the activity of spondyloarthritis-preliminary study." *Reumatologia* 56.6 (2018).
49. Peçanha, Mirna Brito, et al. "Prevalência de deficiência de vitamina D e sua relação com fatores associados à sibilância recorrente." *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 45.1 (2019).
50. Ławnicka, Hanna, et al. "Estimation of vitamin D status in patients with secondary and primary hypothyroidism of different etiology." *Neuroendocrinology Letters* 38.8 (2017).
51. Heidari, Behzad, et al. "Relationship between unexplained arthralgia and vitamin D deficiency: a case control study." *Acta Medica Iranica* (2014): 400-405.
52. Viraraghavan, V. R., et al. "Effect of high dose vitamin d supplementation on vitamin d nutrition status of pre-pubertal children on anti-epileptic drugs-A randomized controlled trial." *Clinical nutrition ESPEN* 29 (2019): 36-40.
53. *Procedimentos Internos, CHUCB, SPC.*
54. Hoffbrand A V., Moss PAH. Victor Hoffbrand - Fundamentos em Hematologia, 6ª Edição. (2013).
55. <https://www.beckmancoulter.com/en/products/hematology/dxh-800>. Consultado a 02/12/2018.
56. https://wsrprd.beckmancoulter.com/ucm/idc/groups/public/documents/webasset/glb_bci_150468.pdf Consultado a 20/11/2018.
57. Favaloro, Emmanuel J., et al. "External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update." *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Vol. 40. No. 02. Thieme Medical Publishers, (2014).
58. José J, et al. "Valoración del sistema PFA-100 para la determinación del tiempo de hemorragia en cirugía oral." (2006).
59. Degandt S, et al. "Evaluation of four hemoglobin separation analyzers for hemoglobinopathy diagnosis." 2018;(March 2017):1-8.
60. Tan MKH, et al. "Thrombophilia in non-thrombotic chronic venous disease of the lower limb - a systematic review." (2018):703-716.
61. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/oncology-genetics/xpert-fii-fv> Consultado a 13/11/2018.

62. Santos VM dos, et al. "Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações." *Rev Assoc Med Bras.* (2000);46(3).
63. Collares GB, et al. "Recomendações para o uso da velocidade de hemossedimentação." *Rev Med Minas Gerais.* (2004);14(1):52-57.
64. Monneret G, et al. "Translational Applications of Flow Cytometry in Clinical Practice." *J Immunol.* (2012);189(3):1099-1099.
65. Murray Patrick R., et al. "Medical Microbiology E-Book." (2016).
66. <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-convencionais> Consultado a 20/03/2019.
67. http://www.spinreact.com/files/Inserts/inserts_portugues/OSIS23IN-P_FOB_nou_2014.pdf Consultado a 20/03/2019.
68. <https://www.vidia.cz/> Consultado a 03/02/2019.
69. <https://www.corisbio.com/pdf/Products/Coris-Pylori-Strip-Helicobacter-Pylori-Diagnostic.pdf> Consultado a 10/01/2019.
70. <https://www.alere.com/pt/home/product-details/c-diff-quick-check-complete.html> Consultado a 20/03/2019.
71. <https://www.certest.es/products/rotavirus-adenovirus-astrovirus-norovirus/> Consultado em 20/03/2019.
72. https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2013/04/N1402_RIDQUICK-Norovirus-12-10-26_GB.pdf Consultado a 04/03/2019.
73. <https://www.apacor.com/products/parasep-sf-eu-protocol/> Consultado a 03/04/2019.
74. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r> Consultado a 02/04/2019.
75. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/sexual-health/xpert-ct-ng> Consultado a 20/03/2019.
76. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-mrsa-nxg> Consultado a 04/03/2019.
77. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/critical-infectious-diseases/xpert-mtb-rif> Consultado a 02/04/2019.
78. Here S. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 23e* (2017) [UnitedVRG].; (2017).
79. https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas_-6000-analyzer-series.html Consultado a 20/03/2019.
80. <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/instruments/cobas-e-411.html> Consultado a 20/04/2019.
81. <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/architect/architect-i2000SR> Consultado 20/04/2019.
82. <http://www.phadia.com/pt-BR/Produtos/Sistemas-Laboratoriais-Phadia/Phadia-250/> Consultado a 6/04/2019.
83. <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas-4800-system.html> Consultado a 04/04/2019.
84. <https://lifescience.roche.com/documents/MagNA-Pure-Compact-System-Versatile-Nucleic-Acid-Purification.pdf> Consultado a 04/04/2019.
85. <http://www.bio-rad.com/en-cn/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system?ID=LJB1YU15>. Consultado a 04/04/2019.

86. <https://www.sebia.com/en-US/produits/hydragel-hr> Consultado a 05/04/2019.
87. <https://www.sebia.com/en-US/produits/hydragel-if> Consultado a 05/04/2019.
88. <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/>. Consultado a 05/03/2019.
89. <https://www.alere.com/en/home/product-details/surestep-cup-test-au.html>. Consultado a 07/04/2019.
90. <http://www.omegadiagnostics.com/portals/0/english11.pdf>. Consultado a 20/03/2019.
91. <https://en.vircell.com/products/coxiella-burnetii-ifa/>. Consultado a 05/04/2019.
92. <https://en.vircell.com/products/rickettsia-conorii-elisa/>. Consultado a 06/04/2019.

V. Anexos

1. Abstracts publicados:

Reis, Cristiana; Teixeira, Rui; Krasteva, Emília; Feijó, Mariana; Correia, Sara; Faria, Maria Conceição. 2019. “Análise dos níveis de vitamina D em 2018: um estudo retrospectivo”. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* (Anexo 1)

Feijo, Mariana; Monteiro, Andreia; Amantegui, Patrícia; Reis, Cristiana; Correia, Sara; Valente, Maria Jesus; Faria, Maria Conceição. 2019. “Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar lavage in pulmonar diseases: smokers versus non-smokers”. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* (Anexo 2)

2. Comunicações Orais em Conferências Científicas

Reis, Cristiana; Teixeira, Rui; Krasteva, Emília; Feijó, Mariana; Correia, Sara; Faria, Maria Conceição. 2019. “Análise dos níveis de vitamina D em 2018: um estudo retrospectivo”. Trabalho apresentado na 11^a Reunião Científica da SPML (Anexo 3)

Feijo, Mariana; Monteiro, Andreia; Amantegui, Patrícia; Reis, Cristiana; Correia, Sara; Valente, Maria Jesus; Faria, Maria Conceição. 2019. “Flow Cytometric Cell Pattern of Bronchoalveolar lavage in pulmonar diseases: smokers versus non-smokers”. Trabalho apresentado na 11^a Reunião Científica da SPML (Anexo 4)

3. Formações Realizadas

08/11/2018: Pseudotrombocitopenia por EDTA: Utilidade dos tubos Thromboexact® (02:00 H)

17/04/2019: Síndromes Mieloproliferativos (01:00 H)

4. Formações Assistidas

24/10/2018: Líquidos serosos. Análise laboratorial do líquido pleural (00:30 H)

14/11/2018: Novos biomarcadores de LRA (00:30 H)

04/12/2018: Análise Laboratorial dos líquidos ascítico e pericárdio (01:00 H)

17/12/2018: Gasimetrias: Casos Clínicos (01:00 H)

14/02/2019: Colorações em hematologia (01:00 H)

20/03/2019: The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. The Impact and Evolution (01:00)

27/03/2019: Biomarkers in Routine Heart Failure Clinical Care (01:00 H)

03/04/2019: Vitamin B12 Deficiency and Clinical Laboratory: Lessons revisited and clarified in seven questions (01:00 H)

17/04/2019: Síndromes Mieloproliferativos (01:00 H)

24/04/2019: Diagnostico e Tratamento da Amigdalite Aguda na Idade Pediátrica (01:00 H)

26/04/2019: Citometria de Fluxo-Fundamentos e Aplicações (01:00H):

Anexo 1.

ANALYSIS OF VITAMIN D LEVELS IN 2018: A RETROSPECTIVE STUDY

Cristiana Reis, Rui Teixeira, Emília Krasteva, Mariana Feijó, Sara Correia, Maria Conceição Faria

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 (≤ 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.

Anexo 2.

FLOW CYTOMETRIC CELL PATTERN OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN PULMONARY DISEASES: SMOKERS VERSUS NON-SMOKERS

Mariana Feijó, Andreia Monteiro, Patrícia Amantegui, Cristiana Reis, Sara Correia, Maria Jesus Valente, Maria Conceição Faria

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.

Anexo 4.




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

Mariana Faria^{1,2}, Andreia Monteiro^{1,3}, Patricia Amantegui³, Cristiana Reis³, Sara Correia³, Maria Jesus Valente³, Maria Conceição Faria³
¹CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, Chemistry Department, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal
²CICS-LEB – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal
³CIUCB – 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)¹. In healthy subjects, BAL's cell pattern is notoriously different between smokers and non-smokers².

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

Material and Methods

BAL processing

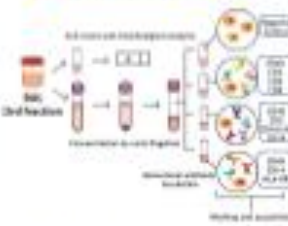


Figure 1. BAL processing protocol. Acquisition was performed using FACSCanto (Becton Dickinson) flow cytometer.

Flow cytometric analysis

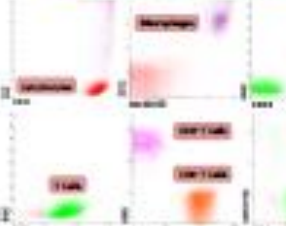


Figure 2. Flow cytometric strategy to identify macrophages and lymphocytes cell subsets. Analysis performed with software FlowJo software (Cytochrome).

Retrospective analysis




Figure 3. Study design. Inclusion and exclusion criteria and analysis approach. Statistical analysis performed with the SPSS Software software.

Results

Morphological analysis of BAL




Figure 4. Evolution of macrophage images performed over the years (2014-2016).

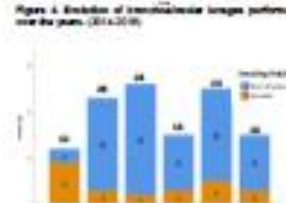


Figure 5. Pulmonary diseases and respective counts grouped by smoking habits. COPD stands chronic obstructive pulmonary disease, PF idiopathic pulmonary fibrosis, SA interstitial edema, PN pulmonary nodules.

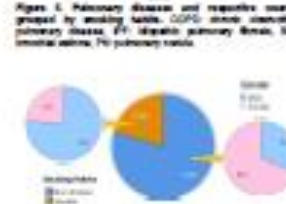


Figure 6. Percentage of smokers versus non-smokers and respective gender distribution.

Macrophages

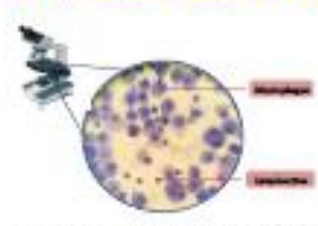


Figure 7. BAL's optical microscopy image, 1000x magnification.

Total Lymphocytes

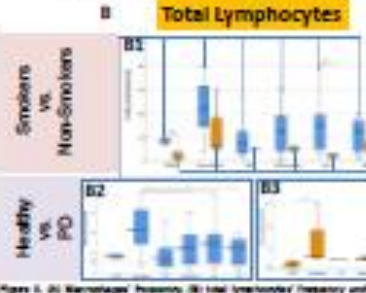
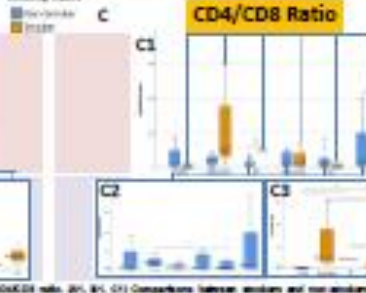


Figure 8. (B) Total lymphocytes frequency and (C) CD4/CD8 ratio. (B1, B2, B3) Comparisons between smokers and non-smokers in each pathological condition. (B4, B5, B6) Comparisons between each pathological condition in non-smokers. (B7, B8, B9) Comparisons between each pathological condition in smokers. Dashed lines represent healthy median values. Top above box median and box size range. Statistically significant differences (P<0.05) between total groups were denoted by crossed-hatched box, adding (B4, B5, B7, B8, B9) between (non-smokers, COPD, chronic obstructive pulmonary disease, carcinoma, PF idiopathic pulmonary fibrosis, SA interstitial edema, PN pulmonary nodules and pneumonia, PD pulmonary disease).

CD4/CD8 Ratio



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

- Shawell M, et al. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: a clinicopathological perspective. *Respiratory and Diagnostic Pathology*. 2008; 15: 280-287.
- Hariri M, et al. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011; 167: 523-531.

P20

94