U.PORTO

MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS

Epidemiologia, patogénese e diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori*

Ana Margarida Ferreira Maia

M

2020

U.PORTO

Ana Margarida F. Maia. Epidemiologia, patogénese e diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori*

M.FFUP 2020

Epidemiologia, patogénese e diagnóstico microbiológico de *Helicobacter pylori*

Ana Margarida Ferreira Maia

Faculdade de Farmácia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA MONOGRAFIA APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

É com muito orgulho que, com a entrega do presente trabalho, termino mais uma etapa do meu curso académico. Este percurso, que comecei há dois anos atrás, foi mais divertido de percorrer com a ajuda de algumas pessoas quejá faziam parte da minha vida e de outras que, durante estes dois anos, cruzaram o seu caminho com o meu. Sem estabelecer qualquer ordem, agradeço:

À professora Carla Silva por me ter orientado durante a revisão bibliográfica e por toda a disposição, em tempo real, que fez com que a escrita se tornasse muito mais fácil;

Ao professor Franklim Marques por me ter auxiliado na decisão de fazer parte do programa ERASMUS +, assim como às professoras Alice Santos Silva e Eugénia Pinto pela preocupação e orientação durante esta fase.

À minha mãe, Luísa, por ser o meu apoio a vários níveis e me fazer acreditar que "para a frente é que é o caminho". Toda a educação, valores e ideais que me passaste ao longo da vida, ajudaram a construir o meu caminho até aqui e serão a base para tudo o que eu conquistar no futuro. Por isto, fico eternamente grata.

À minha irmã, Leonor, por ser um exemplo de sucesso, partilha e generosidade. Aprendo diariamente contigo.

Ao meu pai, José; à minha avó, Albina; aos meus padrinhos Conceição e Orlando e a todos os restantes familiares. Por estarem sempre presentes nos momentos memoráveis e fazerem parte da minha vida, não podia deixar de agradecer.

Às novas amizades que a Universidade do Porto me trouxe. Ana Ferreira, Patrícia Alves e Clara Lima que tornaram a adaptação a uma nova universidade e ciclo de estudos muito mais divertida. Os dias passaram demasiado rápido.

E, por fim, ao Marne. Amigo, companheiro de todas as viagens e parceiro de todas as montanhas-russas emocionais. Sem dúvida a pessoa mais focada e "cheia de garra" que conheço. Agradeço o carinho e cuidado demonstrado em todas as situações. Agradeço, também, por me relembrar diariamente que há sempre espaço para sermos mais e melhores. Desejo que possamos continuar a partilhar vivências e que sejamos a melhor experiência a longo prazo que nunca pensamos ter.

A todos, obrigada por fazerem parte da minha vida.

RESUMO

Ao longo das últimas décadas, a bactéria *Helicobacter pylori* foi sendo alvo da atenção de médicos e investigadores, adquirindo grande importância clínica ao ser reconhecida como um importante agente patogénico que infeta uma grande parte da população humana.

H. pylori localiza-se na mucosa gástrica e apresenta uma relação causal com algumas patologias como gastrite, úlcera péptica, carcinoma gástrico, entre outras. A sua erradicação representa um grande desafio para os clínicos, principalmente devido ao aumento da resistência aos antibióticos claritromicina, levofloxacina e metronidazol o que leva, naturalmente, ao insucesso terapêutico e ao aumento da incidência de doenças mais graves.

A presente monografia pretende ser uma revisão bibliográfica, com base em publicações científicas relacionadas com a temática.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori;* gastrite; carcinoma gástrico; úlcera péptica; linfoma de MALT; epidemiologia; resistência a antibióticos, diagnóstico microbiológico.

ABSTRACT

Over the past decades, *Helicobacter pylori* has received the attention of doctors and researchers and has acquired great clinical importance by being recognized as an important pathogen that infects a large part of the human population.

H. pylori is located in the gastric mucosa and has a causal relationship with some pathologies such as gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma, among others. Its eradication represents a great challenge for clinicians, mainly due to the increased resistance to antibiotics as clarithromycin, levofloxacin and metronidazole, which naturally leads to therapeutic failure and increased incidence of more serious diseases.

This monography is intended as a bibliographic review, based on scientific publications related to the subject.

Keywords: *Helicobacter pylori*; gastritis; gastric carcinoma; peptic ulcer disease; MALT lymphoma; epidemiology; antibiotic resistance; microbiological diagnosis.

ÍNDICE

Agradecimentos ii

Resumo iii

Abstract iv

Índice de Figuras viii

Índice de Tabelas x

Lista de Abreviaturas xi

Introdução 1

1 A descoberta de *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) 2

2 Caracterização microbiológica de *Helicobacter* 2

3 Patologias associadas à infeção por *H. pylori* 3

3.1 Gastrite 4

3.2 Úlcera péptica 5

3.3 Linfoma de tecido linfoide associado à mucosa 6

3.4 Carcinoma gástrico 6

4 Fatores de virulência de *Helicobacter pylori* 7

4.1 Produção de urease e sobrevivência ao ph estomacal 7

4.2 Flagelos e deslocação em direção às células epiteliais 8

4.3 Proteínas na membrana externa (OMP) e fixação de *H. pylori* a recetores celulares de superfície 9

4.3.1 OMP BabA (HopS) 10

4.3.2 OMP SabA (HopP) 11

4.3.3 OMP OipA (HopH) 12

4.3.4 OMP NAP 12

4.3.5 OMP HomA e OMP HomB 13

4.4 Produção de toxinas e danos no tecido do hospedeiro 14

4.4.1 CagA 14

4.4.2 VacA 15

4.5 Interações entre os vários genes de virulência 17

5 Contribuição das formas cocóides para a persistência da infeção por *H. pylori* 18

6 Resposta imunológica à infeção por *H. pylori* 18

6.1 Resposta imunológica inata 18

6.2 Resposta imunológica adquirida 22

7 Epidemiologia da infeção por *H. pylori* 23

7.1 Prevalência mundial 23

7.2 Reservatórios e vias de transmissão 24

7.3 Fatores de risco associados ao hospedeiro 25

8 Antibioterapia e resistência aos antibióticos 28

8.1 Opções terapêuticas 28

8.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos 32

8.3 Uso de probióticos 33

9 Epidemiologia da resistência aos antibióticos 33

10 Métodos de diagnóstico 36

10.1 Métodos invasivos - colheita da amostra por biópsia 37

10.1.1 Histologia 38

10.1.2 Teste rápido da urease 40

10.1.3 Exame cultural 40

10.1.4 Serologia 42

10.2 Outros métodos de diagnóstico – não invasivos 42

10.2.1 Teste respiratório da ureia 43

10.2.2 Pesquisa fecal de antigénio 43

10.3 Identificação bacteriana 44

10.3.1 Métodos bioquímicos 44

10.3.2 Técnicas moleculares - PCR (reação em cadeia da polimerase) 45

10.3.3 MALDI-TOF 45

11 Avaliação da suscetibilidade aos antibióticos 46

12 Prevenção e controlo 46

12.1 Vacinação 47

13 Anexo 1 - tendências temporais na prevalência da infeção por *Helicobacter pylori* nas diferentes regiões da ONU 64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia de *Helicobacter pylori* em A) e B) forma espiral e C) em forma cocóide. Adaptado de (3) (10) 3

Figura 2: Histologia de biópsia gástrica, de paciente que apresenta gastrite associada a infeção por *H. pylori*. Infiltrado linfoplasmocitário na parte superior da mucosa e grande quantidade de neutrófilos infiltrados na superfície do epitélio estão destacados com setas 5

Figura 3: Esquema ilustrativo da resposta imunológica do hospedeiro com infeção por *H. pylori* 11

Figura 4: Representação estrutural do gene *vacA* de *Helicobacter pylori*, diversidade alélica e domínios funcionais da toxina. Este contém três principais regiões heterogénicas: região de sequência de sinal (região s), região intermédia (região i) e região central (m)..... 16

Figura 5: *Mecanismos de evasão imunológica inata de Helicobacter pylori.* A) *H. pylori* modula o LPS por expressão de fucosil transferases para gerar antigénios de *Lewis*. Os padrões de expressão de *Lewis* resultam do estado ligado/desligado de três fucosiltransferases (por exemplo, FutB). As estirpes Le^+ de *H. pylori* podem ligar-se à lectina tipo C (DC-SIGN) presente nas células dendríticas gástricas, induzindo uma resposta das células Th2, enquanto as variantes Le^- escapam à ligação e promovem uma forte resposta das células Th1. B) Após a tradução, a proteína *flagellin* de *H. pylori* sofre glicosilação envolvendo ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac) e não é reconhecida pelo TLR5, devido a uma sequência divergente na região de reconhecimento. C) A NAP atua como um quimiotractor e recruta fagócitos para a lâmina própria. Liga-se via TLR2 aos neutrófilos e monócitos e induz a secreção de citocinas e quimiocinas, que, por fim, produzem células Th0, que se diferenciam em células Th1. D) *H. pylori* evita a apoptose por atraso da fagocitose com formação de megassomas e a NADPH oxidase, que gera espécies reativas de oxigénio (ROS), é dirigida para a membrana plasmática para evitar a morte bacteriana no fagossoma. E) *H. pylori* induz a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) pelos fagócitos através da produção de urease, mas evita danos produzindo L-arginase, que esgota o substrato de iNOS, a L-arginina. O esgotamento da L-arginina também bloqueia a tradução do mRNA iNOS. F) *H. pylori* extrai o colesterol de células hospedeiras e glicolisa-o através da colesterol-a- glucosiltransferase (HP0421), um

processo que revoga a fagocitose de *H. pylori* e a subsequente activação das células T. 21

Figura 6: Estimativa da prevalência (5 anos) em 2018, de carcinomas gástricos em função da idade e género 27

Figura 7: Algoritmo de erradicação da *H. pylori* de acordo com a resistência primária à claritromicina e gestão em caso de falha do tratamento de primeira linha. PPI - inibidores da bomba de protões; CLA – claritromicina; AMO – amoxicilina; MZ – metronidazol; OMP 31

Figura 8: Prevalência da resistência à claritromicina (A), metronidazol (B) e levofloxacina (C), por país, entre 2006 e 2016..... 35

Figura 9: Biópsia gástrica corada com a coloração *Wartin Starry. H. pylori* está corada a preto..... 39

Figura 10: Deteção de *H. pylori* (setas) numa lâmina histológica de uma amostra de biópsia gástrica usando a sonda fluorescente vermelha Hpy769 (A) e coloração de *Giemsa* (B). 39

Figura 11: Deteção de estirpes de *H. pylori* em lâminas histológicas de biopsia gástrica pelo método PNA-FISH. Presença de uma infeção mista dentro da mesma amostra da biópsia. Células de diferentes estirpes de *H. pylori* podem subsistir muito próximas no estômago (a menos de 5 µm de distância). A) Células de *H. pylori* que contêm as mutações pontuais associadas à resistência à claritromicina e que podem ser vistas apenas no canal verde (setas sólidas); B) Células de *H. pylori* tipo selvagem, sem mutações para resistência à claritromicina, que só podem ser vistas no canal vermelho (setas tracejadas) 30

Figura 12: Colónias de *H. pylori* no meio de cultura seletivo *Pylori Agar* inoculado com a estirpe ATCC® 43504 41

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Terapias de erradicação de *H. pylori* aplicadas em zonas geográficas com < 15% de resistência à claritromicina. 29

Tabela 2: Terapias de erradicação de *H. pylori* aplicadas em zonas geográficas com > 15% de resistência à claritromicina 30

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES - Anti-inflamatórios não esteróides

APCs – Células apresentadoras de antigénios

BabA – Adesina de ligação ao antigénio de grupo sanguíneo (*Blood Group Antigen Binding Adhesin*)

BHI – Caldo de infusão de coração e cérebro (Brain Heart Infusion)

cagA – Gene A associado a citotoxina (*Cytotoxin-Associated Gene A*)

*cag*PAI – Zona de patogenicidade *cag* (*cag Pathogenicity Island*)

CG – carcinoma gástrico

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI – Concentração mínima inibitória

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (*Internacional Agency for Research in Cancer*)

IFN-γ – Interferão gama

IgA - Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeos

MALT – Tecido linfoide associado à mucosa (*Mucosa-associated Lymphoid Tissue*)

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

NAP – Proteína Ativadora dos Neutrófilos (*Neutrophil-Activating Protein*)

OipA – Proteína inflamatória externa (*Outer Inflamatory Protein*)

OMP – Proteína de membrana externa (*Outer Membrane Protein*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

pH – potencial de hidrogénio

PNA - Ácido peptídico nucleico (*Peptide nucleic acid*)

PPI - Inibidores da bomba de protões (*Proton Pump Inhibitor*)

ROS – Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxigen species*)

PUD – Úlcera péptica (*Peptic ulcer disease*)

RUT – Teste rápido da urease (*Rapid Urease Test*)

SabA – Adesina de ligação ao ácido siálico (*Sialic Acid-binding Adhesin*)

SAT – Pesquisa de antigénios nas fezes (*Stool antigen test*)

T4SS – Sistema de Secreção Tipo 4 (*Type 4 Secretion System*)

TLR – Recetor tipo *Tool* (*Tool like receptor*)

TSA – Antibiograma / Teste de sensibilidade aos antibióticos

UBT – Teste respiratório da ureia (*Ureia Breath Test*)

UFC – Unidades formadoras de colónias

VacA – Citotoxina Vacuolizante A (*Vacuolating Cytotoxin A*)

INTRODUÇÃO

A presente monografia foi desenvolvida na área das Análises Clínicas, especificamente na área da Bacteriologia Clínica, com foco numa das bactérias que mais me despertou interesse, *Helicobacter pylori*.

Este trabalho é uma revisão bibliográfica sobre as características principais de *H. pylori* e a sua associação ao desenvolvimento de diversas patologias, desde gastrite até carcinoma gástrico. Nesta revisão são abordadas as características gerais desta bactéria, a sua patogénese, epidemiologia, diagnóstico microbiológico, tratamento e prevenção.

É de ressaltar que, como tudo na área das ciências e saúde, nada é estático e que são feitos progressos nesta área todos os dias, pelo que a informação contida neste trabalho está correta até à data de entrega do mesmo.

A pesquisa de publicações para sustentar a informação escrita foi feita nas bases de dados PubMed, Web of Science e Scopus, assim como em alguns livros de gastroenterologia médica.

1 A DESCOBERTA DE *HELICOBACTER PYLORI* (*CAMPYLOBACTER PYLORI*)

Em 1994, a *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a bactéria *Helicobacter pylori* como possível agente carcinogénico (11), com base na capacidade desta bactéria produzir acetaldeído, um composto químico com poder carcinogénico (12). No entanto, só em 2012, é que a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou definitivamente *H. pylori* como carcinogénico de grupo I (carcinogénico para humanos) (13).

H. pylori foi primeiramente descrito em 1983 na revista científica "The Lancet", por Barry Marshall e Robin Warren que a integraram no género *Campylobacter*. Depois de repetidas observações, eram notórias as diferentes características morfológicas e fisiológicas desta bactéria em comparação com as restantes espécies do género *Campylobacter*. Estas diferenças eram, principalmente, em relação à estrutura do flagelo (14). Assim, em 1989, *C. pylori* passou a integrar um novo género e foi renomeada *H. pylori* (15). De forma a testarem o impacto da colonização gástrica por *H. pylori* no desenvolvimento de doença, Marshall e Warren ingeriram a bactéria e avaliaram os efeitos causados. Marshall desenvolveu uma gastrite transitória e Warren uma gastrite mais persistente, tratada mais tarde com antibióticos (16, 17). O mesmo método foi depois testado em voluntários, e ficou demonstrado que esta bactéria podia colonizar o estômago humano e induzir inflamação da mucosa gástrica (18). Estes estudos valeram a Marshall e Warren, em 2005, o prémio Nobel da Medicina (19).

2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE *HELICOBACTER*

O género *Helicobacter* pertence ao filo Proteobacteria, ordem Campylobacterales e à família *Helicobacter*aceae. Fazem parte deste género mais de 24 espécies conhecidas (20). As espécies de *Helicobacter* podem ser subdivididas em dois principais grupos, as espécies gástricas como, por exemplo, *H. pylori* e as espécies entero-hepáticas ou não-gástricas como, por exemplo, *H. hepaticus*. Ambos os grupos demonstram um alto nível de especificidade ao nível do órgão, de modo que as espécies gástricas colonizam o estômago e as espécies entero-hepáticas colonizam, normalmente, o fígado (21).

Os membros do género *Helicobacter* são todos organismos microaerófilos e, na maioria dos casos, positivos para catalase e oxidase. Muitas espécies também são positivas para urease, como é o caso de *H. pylori* (21).

Sob condições ideais, *in vitro*, *H. pylori* é uma bactéria *de Gram* negativo, em forma de S com 5 µm de comprimento, e com 4 a 8 flagelos polares (22). Esta morfologia em espiral e os flagelos são essenciais para a grande capacidade de colonização da mucosa gástrica e intestinal, contribuindo para o desenvolvimento de patologias potencialmente graves (23). Uma proporção muito pequena das infeções causadas por bactérias do género *Helicobacter* são devidas a outras espécies que não *H. pylori* e são, possivelmente, infeções zoonóticas. Estas helicobactérias gástricas estão associadas a inflamação de baixo nível e, ocasionalmente, com o desenvolvimento de doenças em indivíduos imunocomprometidos (24).

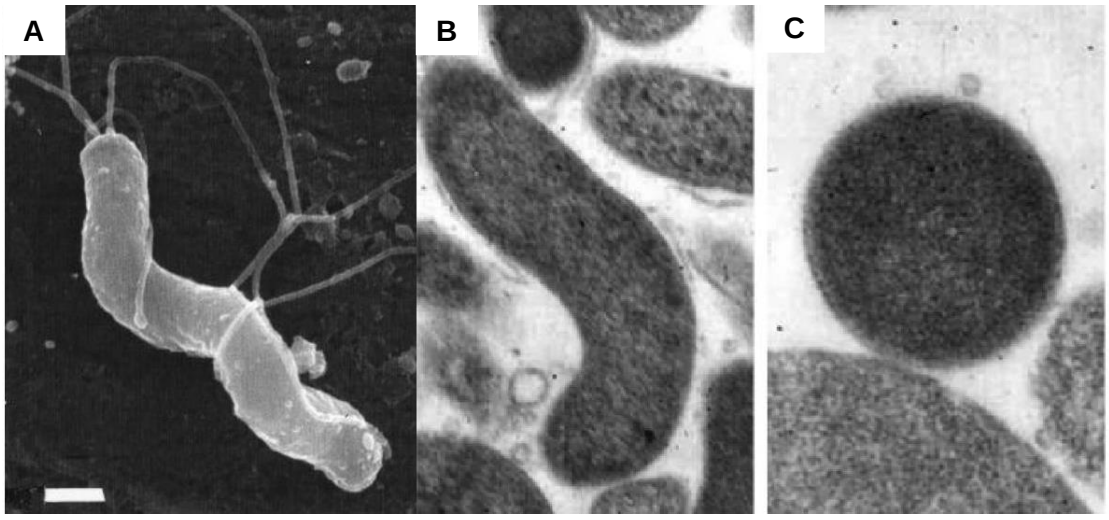


Figura 1: Morfologia de Helicobacter pylori em A) e B) forma espiral e C) em forma cocóide. Adaptado de (3) (10).

3 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

Os pacientes com colonização gástrica por *H. pylori* desenvolvem um padrão inflamatório da mucosa, caracterizado por células mononucleares e neutrófilos, denominado gastrite. Se a colonização bacteriana for localizada no corpo do estômago, pode provocar inflamação que poderá evoluir para gastrite atrófica, levando à ulceração gástrica ou neoplasia gástrica. Se a inflamação for localizada no antro, pode levar à formação de úlcera duodenal, que é um tipo de úlcera péptica (PUD). Em geral, todas os indivíduos colonizados por *H. pylori* apresentam gastrite histológica, mas apenas, aproximadamente, 10–15% desenvolvem doenças associadas, como PUD,

adenocarcinoma gástrico ou linfoma gástrico. O desenvolvimento destas patologias é determinado por uma interação complexa entre fatores bacterianos e do hospedeiro (24).

3.1 GASTRITE

A gastrite é uma inflamação do revestimento gástrico (figura 2). Esta inflamação assume um aspeto superficial que pode evoluir para uma gastrite atrófica. Se não for tratada, pode progredir até metaplasia intestinal gástrica, seguindo-se de displasia e, por fim, neoplasia. Contudo, apenas uma pequena percentagem de pacientes, 1%, irá desenvolver neoplasia gástrica e apenas 10% a 15% dos pacientes desenvolverá PUD. A metaplasia intestinal gástrica pode ser definida como a substituição do revestimento normal do estômago, por células que se assemelham às que revestem o intestino. Desta forma é possível a colonização do duodeno por *H. pylori*. A inflamação gerada por esta colonização permite a agressão da mucosa por parte do ácido gástrico levando, assim, à formação de úlceras duodenais. Como a maioria dos pacientes são assintomáticos, o principal significado clínico da gastrite crónica provocada por *H. pylori,* reside na sua direta correlação com o desenvolvimento de PUD, de neoplasia e de linfoma gástrico. Podemos concluir que, a presença de *H. pylori,* por si só, não é suficiente para o desenvolvimento de patologia gástrica. Desta forma, a manifestação da infeção é o culminar de interações entre o hospedeiro, a bactéria e vários fatores ambientais, sendo considerada uma patologia multifatorial (24).

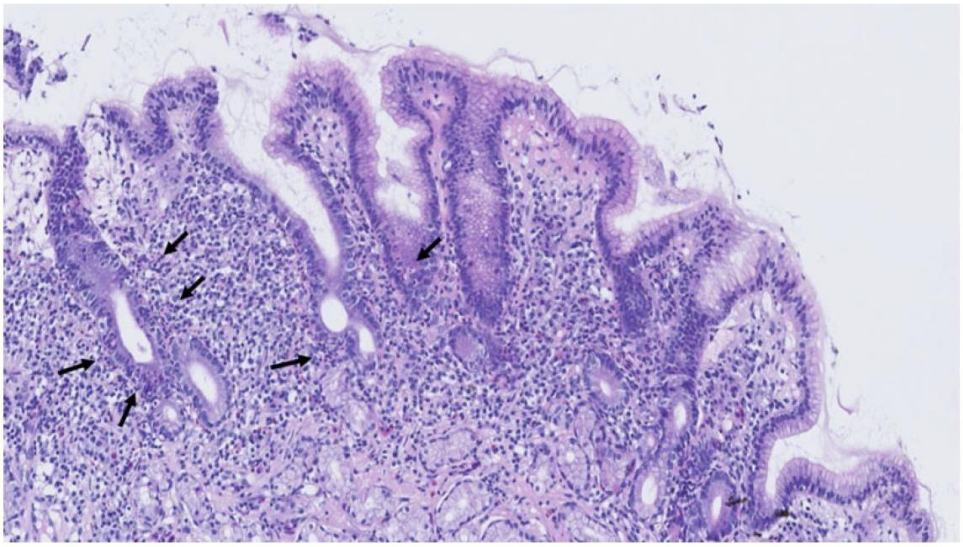


Figura 2: Histologia de biópsia gástrica, de paciente que apresenta gastrite associada a infeção por H. pylori. Infiltrado linfoplasmocitário na parte superior da mucosa e grande quantidade de neutrófilos infiltrados na superfície do epitélio estão destacados com setas. Retirado de (2, 3).

3.2 ÚLCERA PÉPTICA

Uma úlcera péptica (PUD) é definida como uma perturbação da integridade da mucosa do estômago e / ou duodeno, com inflamação ativa. Esta inflamação leva, geralmente, a uma dor epigástrica ardente, exacerbada em jejum, que melhora com as refeições.

Esta patologia pode ser classificada de duas maneiras: quanto à etiologia (primária e secundária) e quanto à localização (gástrica e/ou duodenal). A úlcera primária acontece na ausência de outras doenças sistémicas subjacentes e a secundária está relacionada com doenças agudas, tais como sepsis, queimaduras extensas, acidose, hipoglicemia, uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e uso de corticoides. Mais de 90% dos pacientes com dispepsia não possui úlceras e a maioria dos pacientes com PUD pode ser assintomática.

A úlcera duodenal ocorre mais frequentemente na primeira porção do duodeno, profunda, podendo atingir a camada muscular própria, mas raramente é maligna. Este tipo de úlcera está muitas vezes associado à infeção por *H. pylori* e ao uso de AINES. É consequência de um aumento das secreções gástricas, que diminuem o pH do estômago, e da diminuição da secreção de bicarbonato de sódio na zona do bulbo duodenal. Ambos processos são exacerbados pela infeção por *H. pylori (24)*.

3.3 LINFOMA DE TECIDO LINFOIDE ASSOCIADO À MUCOSA

O linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) constitui 8% de todos os linfomas não-*Hodgkin*. Embora possa surgir em vários locais extra-nodais como pulmão, tiróide e intestino delgado, aproximadamente 70% dos linfomas de MALT têm origem no estômago de pacientes com infeção crónica por *H. pylori*. Quando a infeção gástrica é prolongada, para além de linfomas de MALT, alguns indivíduos desenvolvem adenocarcinomas gástricos (25). O linfoma de MALT é um linfoma da zona marginal, localizado, normalmente, no estômago, caracterizado pela presença de células B morfologicamente heterogéneas, plasmócitos e lesões linfo-epiteliais, que resultam da invasão da mucosa pelos linfócitos neoplásicos. Em condições normais, o estômago é desprovido de tecido linfoide. No entanto, este tipo de tecido pode surgir aquando de uma infeção por *H. pylori*, através da estimulação antigénica, que resulta em expansão clonal de linfócitos B.

3.4 CARCINOMA GÁSTRICO

Carcinomas são doenças potencialmente mortais, caracterizadas pela proliferação desregulada e invasão de células de origem clonal, derivadas de múltiplas mutações- alterações genéticas e epigenéticas nas células (25).

Existem muitos fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de carcinomas gástricos (CG), mas ainda não é totalmente conhecido o mecanismo que promove o desenvolvimento das células do revestimento do estômago em células cancerígenas. Várias patologias podem aumentar o risco de desenvolver CG. No caso da gastrite atrófica crónica, as glândulas normais do estômago estão diminuídas ou ausentes e como as células do estômago são danificadas pelas células do sistema imunológico, o grau de inflamação gástrico aumenta. A gastrite atrófica e a metaplasia intestinal são frequentemente causadas por uma infeção por *H. pylori* e ambas podem levar ao desenvolvimento de problemas estomacais, incluindo carcinoma. Em 2014, a IARC informou que a infeção por *H. pylori* é considerada a causa de 80% de todos os cancros de estômago a nível mundial, apesar desta percentagem variar consoante a região geográfica (25).

4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI*

O número crescente de estudos focados na associação entre patogenicidade desta bactéria e a manifestação de doença gástrica têm vindo a aumentar. Sabemos hoje que as diferenças na manifestação da doença entre hospedeiros, são mediadas pela interação complexa entre fatores bacterianos, do próprio hospedeiro e ambientais (26). Assim, para que a bactéria consiga sobreviver ao ambiente drástico que ocorre no estômago do hospedeiro e conseguir colonizar este meio, são necessárias características bacterianas específicas, como a capacidade de neutralizar a acidez estomacal no início da infeção, possuir motilidade mediada por flagelos para se deslocar até às células do epitélio gástrico; usar as suas adesinas para se ligar a recetores do hospedeiro e evitar a sua expulsão através do intestino (27) e ter a capacidade de causar danos nos tecidos através da libertação de toxinas (26). Após adesão de *H. pylori* às células gástricas, 80% dos indivíduos infetados permanecem assintomáticos (28), sendo que os 20% restantes irão, eventualmente, desenvolver gastrite, PUD, linfoma de MALT e / ou CG (27). Todos os fatores de virulência associados à colonização de *H. pylori*, seguida de infeção, serão discutidos mais detalhadamente.

4.1 PRODUÇÃO DE UREASE E SOBREVIVÊNCIA AO PH ESTOMACAL

A urease é uma enzima produzida por *H. pylori* que atua sobre a ureia presente no meio gástrico e tem como produto final da reação amoníaco e ácido carbónico na proporção de 2:1 moléculas (29). Esta enzima quebra a ureia em CO_2 e amoníaco, produzindo iões OH^- em solução aquosa. O amoníaco combinado com H_2O produz hidróxido de amónia (como demonstrado nas reações seguintes), neutralizando o pH do estômago (29).

$$NH_2CONH_2\ (ureia) + H_2O \xrightarrow{urease} NH_3\ (amoníaco) + NH_2COOH$$

$$NH_3\ (g) + H_2O\ (l) \longrightarrow NH_4^+\ (aq) + OH^-\ (aq)$$

$$NH_2COOH + 2H_2O \longrightarrow NH_3 + H_2CO_3\ (ácido\ carbónico)$$

A urease é um hetero oligómero de seis subunidades UreA e seis unidades UreB, que precisa de ser ativado pela incorporação de iões Ni^{2+}, reação catalisada pelas proteínas acessórias UreE, UreF, UreG e UreH (30). Esta atividade é regulada pelo canal de ureia, codificado pelo gene *ureI*, que permite uma maior entrada de ureia para o citoplasma bacteriano e uma consequente estimulação da produção de urease por *H. pylori* quando o pH externo está abaixo dos 5 (26). A ativação desta enzima e da enzima hidrogenase é regulada pela concentração de iões níquel no hospedeiro. Apesar deste elemento apresentar toxicidade para o ser humano, como é um elemento ubíquo e abundante na terra, é comum ser encontrado no organismo do hospedeiro, principalmente no pâncreas e nos ossos, mesmo que em quantidades baixas e não tóxicas (31). Uma vez que não existe "competição" entre o hospedeiro e as bactérias por este elemento, o nível de níquel existente está inteiramente disponível para ser utilizado por *H. pylori,* para a ativação da urease e da hidrogenase. Apesar de ser um ponto que requer mais investigação, alguns estudos como o de Campanale *et al.,* 2014, relacionam o fator dieta pobre em níquel e o sucesso da erradicação da bactéria, com base na ideia que a absorção de níquel e o seu armazenamento intrabacteriano são importantes para a sobrevivência de *H. pylori* no ambiente gástrico (32).

A urease pode também ser encontrada na superfície celular de microrganismos viáveis de culturas envelhecidas, por lise dos microrganismos já senescentes dessas mesmas culturas (29).

4.2 FLAGELOS E DESLOCAÇÃO EM DIREÇÃO ÀS CÉLULAS EPITELIAIS

Apesar da importância da urease para a sobrevivência de *H. pylori*, a colonização bem sucedida depende de uma rápida orientação e mobilidade da bactéria em direção à camada de muco que cobre o epitélio gástrico, onde os valores de pH são próximos de 7 (33). Desta forma, a estrutura flagelar de *H. pylori* influencia a colonização, inflamação e evasão imunológica da bactéria (26).

H. pylori tem cerca de 4 a 8 flagelos, sendo ainda controverso se são uni ou bipolares (23). Estima-se que 50 proteínas estejam envolvidas na expressão, secreção e biossíntese deste complexo flagelar (34) e prevê-se que 20 destas proteínas constituam a sua componente estrutural (33), tornando a motilidade um dos mais complexos processos na célula bacteriana (26).

Cada flagelo consiste em três componentes: o corpo basal, o filamento externo e o gancho. O corpo basal é incorporado na parede celular e é constituído pelas proteínas necessárias para rotação e para todo o processo de quimiotaxia. O filamento externo de

formato helicoidal funciona como uma hélice. Este é composto pelas proteínas FlaA e FlaB, ambas essenciais para a motilidade da bactéria, como demonstrado em estudos como o de Tomb *et al.* em 1997, realizados em porquinhos da índia (34). No entanto, trabalhos realizados por Dunne *et al.* 2014 mostraram que mutantes para os genes *flaA* e *flaB* e para o regulador flagelar *flbA* também conseguiam aderir à mucosa gástricas, apesar de existir uma diminuição na capacidade de adesão no caso dos mutantes para *flaA* (35). O gancho serve como uma articulação entre o corpo basal e o filamento flagelar e é composto pela proteína FlgE (33).

Estudos como de Kao *et al*., 2012 (37) mostraram que pacientes infetados com *H. pylori* com elevada motilidade apresentavam patologias mais graves, com maior densidade bacteriana e, consequentemente, com maior resposta inflamatória (36).

4.3 PROTEÍNAS NA MEMBRANA EXTERNA (OMP) E FIXAÇÃO DE *H. PYLORI* A RECETORES CELULARES DE SUPERFÍCIE

As *Outer Membrane Proteins* (OMPs), também conhecidas como adesinas, permitem a ligação duradoura de *H. pylori* à célula do hospedeiro, através de recetores associados às células epiteliais. A adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica é alcançada através de mais de 60 tipos de proteínas pertencentes a várias famílias de OMPs, que impedem a bactéria de se dissociar da mucosa do estômago, permitindo que esta tenha acesso a nutrientes e substratos necessários para se desenvolver (26).

Condições locais ambientais, como o tipo de célula hospedeira, proteínas disponíveis na superfície desta e / ou proteínas ligantes, bem como a resposta imunitária do hospedeiro, obriga *H. pylori* a alterar a expressão das OMPs, de forma a adaptar-se rapidamente ao ambiente local (27). Diferentes estipes de *H. pylori* podem diferir nas OMPs que possuem (34), assim como na sua expressão, usando, para isso, diferentes estratégias como: a) variação de fase alélica; b) conversão e duplicação de genes e c) regulação da resposta ao pH e ao sal (27). As interações entre proteínas bacterianas e as moléculas de adesão do hospedeiro parecem ser essenciais em certos processos patogénicos, como iremos verificar nos capítulos seguintes. Desta forma, é importante conhecer os mecanismos responsáveis pelo estágio inicial da infeção e pela sua manutenção (27).

Análises de sequências genómicas de *H. pylori* permitiram dividir as OMPs em cinco famílias diferentes: Hop/Hor, Hof, Hom, proteínas associadas a bombas de efluxo da

membrana externa e proteínas da membrana externa reguladas por ferro. As proteinas de maior interesse e também as mais estudadas são as proteínas BabA (HopS), a SabA (HopP) e a OipA (HopH), mas também a NAP, a HomA e HomB (27, 38).

4.3.1 OMP BabA (HopS)

Esta proteína pertencente à família HopS liga-se aos antigénios de *Lewis*, têm 80 kDa de tamanho e a mais estudada é a BabA (27). Esta é a principal proteína de adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica (39). Atualmente são conhecidos três alelos destas proteínas, BabA1, BabA2 e BabB. O gene *babA2* codifica para a proteína completa, que vai permitir a ligação e fixação de *H. pylori* aos antigénios do grupo de *Lewis*, facilitando assim a colonização e o aumento da densidade bacteriana. O gene *babA1* codifica para uma proteína de menor tamanho, por deleção de alguns pares de base (27).

Estirpes com o gene *babA2* podem ser classificadas como BabA-H (elevados produtores de BabA) que possuem elevada capacidade de ligação, ou BabA-L (baixos produtores de BabA) que não têm capacidade para se ligar aos antigénios do grupo de *Lewis* (40). No entanto, é importante ressaltar que esta capacidade de se ligar aos antigénios do grupo de *Lewis,* nem sempre reflete maiores danos na mucosa gástrica nem um pior *outcome* da doença. Estudos realizados por Fujimoto *et al.,* 2007 associaram infeções por estirpes BabA-L a um maior risco de cancro gástrico, com maior densidade bacteriana, infiltração de neutrófilos e atrofia da mucosa. Nos países ocidentais, infeções por *H. pylori* portadores de BabA-L e BabA-H estão associadas a um aumento de, aproximadamente, 55 vezes e 20 vezes, respetivamente, de desenvolvimento de cancro gástrico, em comparação com pacientes infetados por estirpes BabA-negativas (41).

As estirpes denominadas “generalistas” de *H. pylori* têm grande facilidade em reconhecer e ligar-se às células sanguíneas tipo A (A-Le^b), B (B-Le^b) e determinantes tipo 1 do grupo sanguíneo O. Estes antigénios são encontrados à superfície das células epiteliais gástricas e é nestes locais que as proteínas Bab se ligam ao hospedeiro (42).

Apesar de BabA ser considerada a adesina preferencial de *H. pylori* na adesão ao epitélio, alguns estudos mostram mutantes com deleção de BabA, que não se ligam aos antigénios ABO, mas que conseguem, de outra forma, ligar-se ao epitélio gástrico em humanos, preferencialmente a tecido gástrico inflamado (43). Estes resultados inferem a presença de outra adesina, com a capacidade de se ligar a um recetor distinto do de BabA, presente na maioria das estirpes conhecidas de *H. pylori* (43, 44).

4.3.2 OMP SabA (HopP)

Os antigénios *sialyl Lewis*^{X} foram identificados como recetores principais para as proteínas de ligação SabA de *H. pylori* com capacidade de ligação ao ácido siálico. Estes antigénios encontram-se presentes em quantidades muito reduzidas em tecidos gástricos saudáveis (27) e a sua expressão é condicionada pelo pH do meio (44). Em situações ácidas, pH <5,0, a expressão de SabA é reprimida, enquanto em pH mais alto é estimulada. Para além do pH, outros fatores regulam positivamente a expressão desta proteína, como por exemplo, maiores concentrações de sal (45). Desta forma, a "estratégia" de SabA para iniciar um processo inflamatório passa por se ligar aos esfingolípidos das células gástricas e promover a infeção inicial, desencadeando a produção de IL-8 (figura 3) nas células hospedeiras, em resposta à infeção (46). Desta forma, mutantes com deleção do gene *babA* mas SabA-positivos podem, da mesma forma, ligar-se ao epitélio gástrico do hospedeiro e iniciar um processo inflamatório.

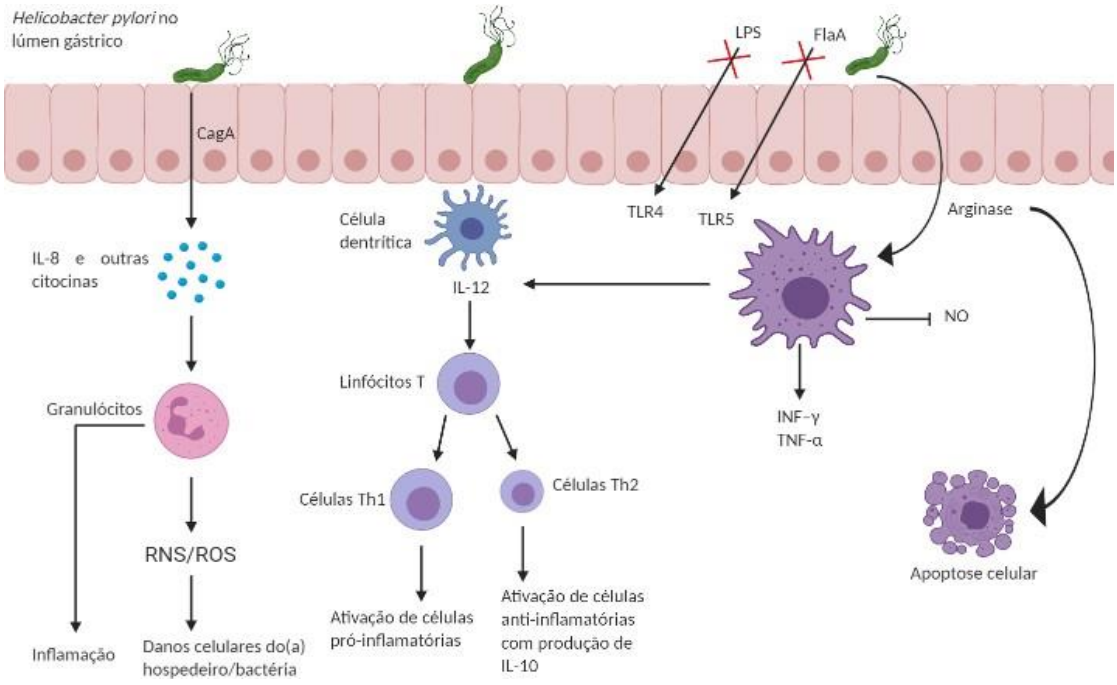


Figura 3: Esquema ilustrativo da resposta imunológica do hospedeiro com infeção por H. pylori. Elaborado pela autora no programa BioRender.

4.3.3 OMP OipA (HopH)

A proteína OipA que se encontra no exterior da membrana bacteriana é relativamente menor do que as citadas anteriormente (47) e é codificada pelo gene *oipA*. Quando a proteína se encontra funcional, a bactéria adquire a capacidade de aderir ao epitélio gástrico, com consequente apoptose da célula hospedeira e indução de inflamação através da fosforilação de diversas vias de sinalização que, normalmente, interagem com a *cag*PAI (ilha de patogenicidade portadora de gene que codifica para a toxina *cag*) e consequente indução da produção de IL-8, associada à indução de inflamação nos tecidos do hospedeiro (48, 49). No entanto, existem estudos que contrariam esta ideia e demonstram que a produção de IL-8 não resulta na indução de inflamação (50). Esta disparidade de resultados poderá ser justificada com base na ativação/desativação de genes e/ou na associação e interação com vários genes de virulência. Estirpes OipA ativas (OipA+) parecem estar muito associadas a estirpes CagA ativas (CagA+) e BabA2 ativas (BabA+) (51, 52) e a vários genótipos como *vacA m2*, *vacA s1* e *vacA* m1 (51, 53).

Estudos revelam a ligação entre o risco de desenvolver PUD e CG através da desregulação da apoptose e proliferação celular, respetivamente, durante a infeção por *H. pylori*, aquando da ativação do gene *oipA* (54).

4.3.4 OMP NAP

A infiltração gástrica por neutrófilos resulta em danos nas mucosas que levam ao desenvolvimento de úlceras duodenais, em infeções por *H. pylori*. Um dos fatores desta bactéria para mediar a ativação de neutrófilos é a expressão da proteína ativadora de neutrófilos (NAP), codificada pelo gene *napA*. Um dos aspetos interessantes desta proteína é a sua capacidade de estimular uma grande produção de radicais de oxigénio por parte de neutrófilos e monócitos humanos, o que leva à destruição de tecidos e à adesão dos neutrófilos às células endoteliais, durante a infeção por *H. pylori* (55). Para além disto, a NAP induz a expressão e libertação de IL-8, assim como das proteínas inflamatórias (MIP)-1α e (MIP)-1β, por parte dos macrófagos do hospedeiro (figura 3). Isto acontece porque os glicoesfingolípidos que as células hospedeiras expressam à superfície da membrana, são recetores com grande especificidade para a NAP, expressa na superfície bacteriana (56).

4.3.5 OMP HomA e OMP HomB

O grupo das proteínas Hom inclui as quatro menores OMP's, HomA, HomB, HomC e HomD, com aproximadamente 75 kDa de tamanho. Desta família, as proteínas mais estudadas são as HomA e HomB, que partilham 90% de similaridade de sequência genética entre si (47), apesar da sua expressão génica ser traduzida em diferentes funções (39). Assim como acontece com a OipA, também as proteínas HomB capacitam a adesão da bactéria à mucosa gástrica e provocam o aumento da produção de IL-8, *in vitro* (27).

As estirpes de *H. pylori* diferenciam-se por terem uma cópia de cada gene *homA* e *homB*, por terem duas cópias de cada um dos genes, por terem uma cópia de um dos genes e o outro *loci* vazio ou por ambos os *loci* estarem vazios (47). O estudo realizado em Portugal por Oleastro *et al.* 2008 demonstrou a presença de uma cópia dos genes *homA* ou *homB* ou de duas cópias, *homA/homA*, *homB/homB* ou *homA/homB* em amostras de pacientes com PUD e patologias não ulcerogénicas e comparou a presença dos diferentes genótipos com a apresentação e desenvolvimento das patologias. As estirpes mais vezes associadas a casos não ulcerogénicos foram as que apresentavam apenas uma cópia do gene *homA*. Por outro lado, estirpes com genótipos com duas cópias de *homA* ou *homB* foram as mais associadas ao desenvolvimento de úlceras. Assim, inferiu-se que genótipos com duas cópias do mesmo gene conferem vantagem à bactéria no processo de adaptação ao hospedeiro e de indução de inflamação (39). No entanto, também se observou uma relação entre a presença dos genes *homA/homB* e o desenvolvimento de úlceras pépticas e carcinoma gástrico em estirpes isoladas de pacientes em Portugal, Colômbia e dos EUA (57), assim como em estirpes isoladas de crianças (39). Desta forma, são necessários mais estudos genéticos para melhor compreensão desta relação.

4.4 PRODUÇÃO DE TOXINAS E DANOS NO TECIDO DO HOSPEDEIRO

Entre as proteínas bacterianas que interagem com as células do hospedeiro, encontram-se as exotoxinas clássicas e as proteínas efetoras, que são introduzidas no citoplasma das células afetadas pelos sistemas de secreção bacteriano tipo III e tipo IV (58). As exotoxinas clássicas podem ser agrupadas em três categorias, de acordo com a função que exercem e o local de ação nas células do hospedeiro. Podem ser toxinas que: a) danificam membranas, tais como toxinas formadoras de poros; b) atuam na membrana para imitar processos normais de sinalização; e c) possuem atividade intracelular, modificando enzimaticamente os seus alvos. A maioria das toxinas bacterianas evoluiu para interagir especificamente com a sinalização de proteínas do hospedeiro e, desta forma, alterar processos como proliferação, apoptose e diferenciação celular, todos intimamente associados à carcinogénese (59).

As principais toxinas associadas a *H. pylori* e danos em tecidos gástricos são a CagA (*citotoxin-associated gene* A) e a exotoxina clássica, VacA (*vacuolating cytotoxin* A) (1).

4.4.1 CagA

CagA é um oncoproteína, de aproximadamente 120–140 kDa que, de acordo com os conhecimentos atuais, não compartilha nenhuma sequência homóloga com outras proteínas (60) e que é codificada pelo gene *cagA*. Este gene está localizado num dos terminais da ilha de patogenicidade *cag*PAI, com 40kb (61), constituída por 31 genes que codificam para componentes do sistema de secreção tipo 4 (T4SS), envolvido na translocação da toxina CagA para as células gástricas do hospedeiro. Esta toxina altera a estrutura das células estomacais e permite que a bactéria se fixe mais facilmente a estas, induzindo uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro. A exposição a longo prazo à toxina causa inflamação crónica (28).

As estirpes de *H. pylori* podem ser divididas em CagA positivas (as mais virulentas) e CagA negativas, diferença que pode justificar o facto de nem todas as infeções por *H. pylori* serem sintomáticas. A presença do gene *cagA* é, geralmente, um marcador para *cag*PAI (25). Desta forma, as estirpes CagA positivas são muito associadas ao desenvolvimento de gastrite, PUD, linfoma de MALT e / ou CG (27, 62, 63).

Quando fosforilada por oncogenes celulares, esta proteína fica funcionalmente ativa, desencadeando uma alteração morfológica na célula hospedeira conhecida como efeito de dispersão. Este fenótipo imita o efeito produzido pelo fator de crescimento dos hepatócitos, frequentemente associado a carcinomas, principalmente na fase de metástase (59). Isto acontece porque CagA é uma proteína altamente antigénica associada a uma resposta inflamatória proeminente, provocada pela produção em grande escala de IL-8. Adicionalmente, por ativação dos genes da *cag*PAI, *H. pylori* consegue induzir a apoptose mitocondrial em macrófagos, protegendo-se do *stress* oxidativo associado ao óxido nítrico, produzido pelos mesmos (64), aquando da sua translocação para as células epiteliais gástricas, através da ligação a integrinas β1 e α5 ou outros recetores celulares, por meio do T4SS (65). CagA tem a capacidade de interagir com várias moléculas das células hospedeiras, passando a ser responsável pela: a) desregulação da transdução de sinal homeostático das células epiteliais gástricas; b) indução de respostas pró-inflamatórias que levam à inflamação crónica da mucosa gástrica e c) indução de carcinogénese através da modulação da apoptose (60). Assim, devido às suas características indutoras de cancro, CagA foi designada como a primeira oncoproteína bacteriana (61).

4.4.2 VacA

VacA é uma toxina formadora de poros porque tem a capacidade de induzir a formação de vacúolos em células eucariotas e formar canais seletivos de aniões em bicamadas lipídicas (66, 67). Os canais formados por VacA podem conduzir cloreto, bicarbonato e pequenas moléculas orgânicas (68). Estudos demonstraram que mutantes VacA sem capacidade de formar estes canais seletivos, perdem atividade citotóxica (69). Para além desta função, outros fatores que levam à morte celular associados à ação desta citotoxina incluem a interrupção do tráfico endocítico; a libertação de aniões orgânicos e HCO_3; imunotolerância e infeção crónica através da inibição de várias células do sistema imunitário; assim como ativação de proteínas cinases por substâncias que estimulam a proliferação celular, desencadeando a mitose e modulação da autofagia (67, 70).

Todas as estirpes de *H. pylori* são portadoras do gene *vacA*, embora apresentem diferentes capacidades de vacuolização, conferidas pela variação em cinco regiões de *vacA*: região s (s1 e s2), região i (i1, i2, i3), região m (m1 e m2) (figura 4), região d (d1 e d2) e a região mais recentemente identificada (c1 e c2). A variante VacA s1 é a mais

patogénica. Isto porque as variantes VacA s2 produzem e secretam toxinas a taxas mais baixas, sendo incapazes de formar canais membranares capazes de induzirem a vacuolização das células do hospedeiro, ao contrário das toxinas VacA s1. VacA i1 também tem maior atividade em comparação com VacA i2 e, ao contrário de VacA m2, VacA m1 induz uma diminuição nos níveis intracelulares de antioxidante glutationa e, por consequência, um aumento do *stress* oxidativo, levando à autofagia e apoptose das células hospedeiras.

Um dos passos cruciais para a toxicidade da bactéria, é a ligação de VacA com a célula alvo, sendo que o domínio C-terminal de VacA desempenha um papel importante no reconhecimento de recetores nas células alvo. Proteínas transmembranares (proteínas recetoras tirosina fosfatases RPTPα, RPTPβ intervenientes na migração celular, diferenciação e sinaptogénese) e proteínas relacionadas ao recetor de lipoproteína de baixa densidade 1 são identificados como recetores para células epiteliais e vão facilitar a ligação e internalização de VacA pelas células epiteliais gástricas.

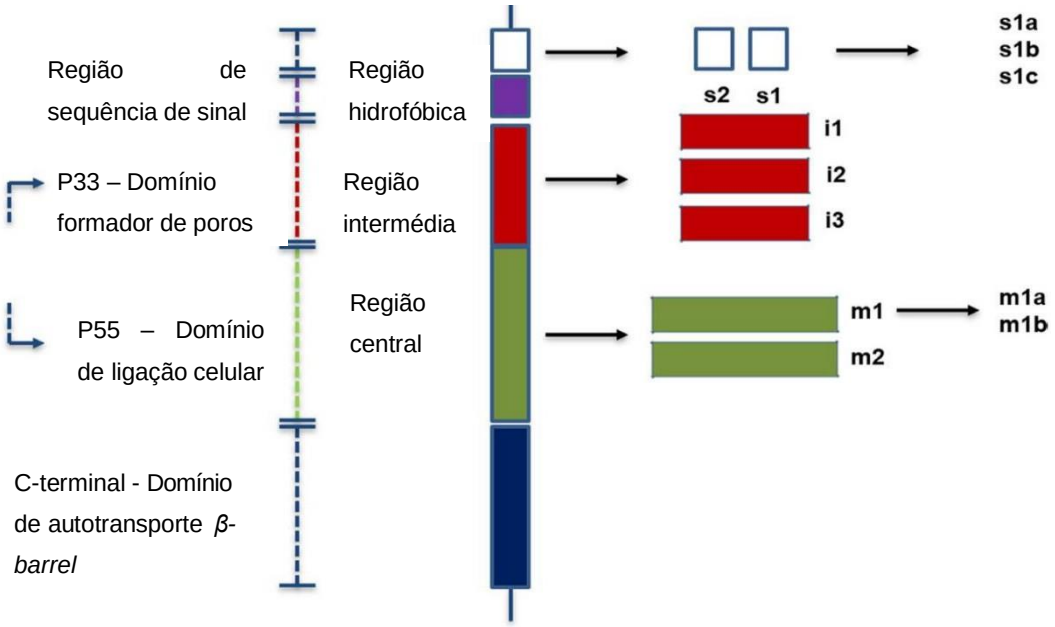


Figura 4: Representação estrutural do gene vacA de Helicobacter pylori, diversidade alélica e domínios funcionais da toxina. Este contém três principais regiões heterogénicas: região de sequência de sinal (região s), região intermédia (região i) e região central (m). Adaptado de (1).

4.5 INTERAÇÕES ENTRE OS VÁRIOS GENES DE VIRULÊNCIA

Os genes de virulência descritos não são marcadores independentes de doença gástrica e, como seria de esperar, o risco de uma infeção resultar em doença gástrica severa, aumenta quando são detetados em simultâneo vários genes de virulência ativos. Combinações com genótipos *cagA*+ estão ligadas a maior risco de progressão para lesões cancerígenas, quando comparadas com os genótipos *cagA-.* Estudos realizados por Bakhti *et al*., 2020 (71) demonstraram que os genótipos *vacA* e *cagA*+ (considerados mais patogénicos) são mais frequentemente encontrados no continente Asiático. Estes valores estão em concordância com a elevada incidência e morte por carcinoma gástrico nesse continente (6, 71). Exames histopatológicos e PCR-(RT-PCR) em tempo real, demonstraram que estirpes presentes em amostras de biopsia gástrica com os genótipos *vacA* s1a/s1b/m2, *vacA* s1a/s1b e *vacA* s2/m2, eram positivos para gastrite crónica em 90,0%, 80,1%, e 84,2% dos casos, respetivamente (72). O impacto negativo do gene *babA*2 no prognóstico da doença, em casos de infeção por *H. pylori,* geralmente está associado à presença dos genótipos *cagA, vacA* s1, *vacA* m1 e *oipA* ativos, em simultâneo com *babA2* (73). Outros genótipos associados a estirpes de maior virulência e mais vezes associados a alto risco de desenvolvimento de CG são VacA: *s1/m1/i1/d1/c1*; *s1/m2/i1/d2/c1*; *s1/m2/i2/d2/c1* e *s1/m2/i2/d2/c-1cagA* (71).

Como já referido anteriormente, um estudo realizado em Portugal identificou um risco aumentado de desenvolvimento de PUD em estirpes que, simultaneamente, continham os genes *homB, cagA e vacA* (39, 74). Apesar do gene *homB* não ser dos primeiros genes a ser associado a lesões graves na histologia gástrica, a sua correlação com *vacA* genótipo s2/m2 / cagA− / babA2− / homB + já foi associada a alterações celulares, visto que o gene *hom* atua de forma sinérgica com outros genes de virulência (73).

Apesar de interações entre genes de virulência terem sido relatadas em vários trabalhos, nem todos os estudos são consensuais, sendo necessário mais investigação neste âmbito.

5 CONTRIBUIÇÃO DAS FORMAS COCÓIDES PARA A PERSISTÊNCIA DA INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

Apesar de *H. pylori* ser considerado um bacilo, quando exposto a condições ambientais de *stress*, como aumento da tensão de oxigénio, incubação prolongada e exposição a antibióticos, é capaz de passar ao estado cocóide. Esta morfologia ocorre quando *H. pylori* entra na forma viável mas não cultivável como forma de adaptação celular a essas condições adversas (75). Nesta forma, *H. pylori* reduz a taxa de respiração, assim como o transporte de nutrientes necessários para a sua sobrevivência e altera a sua expressão genética e síntese celular.

A presença das formas cocóides não descarta a presença da forma bacilar de *H. pylori* em simultâneo. Quando isto acontece, as bactérias em estado bacilar promovem a produção de biofilmes, que se traduzem numa grande quantidade de bactérias firmemente aderidas, neste caso, a superfícies bióticas, como as células da mucosa gástrica. A localização de *H. pylori* em biofilmes permite que as formas cocóides, inseridas no meio destes, sejam mais tolerantes à ação dos antimicrobianos e fortemente resistentes à fagocitose, dificultando a erradicação da bactéria, mesmo quando esta se encontra no estado de menor atividade. Nos tecidos gástricos, formas cocóides viáveis podem permanecer latentes por muito tempo e reter os fatores de virulência característicos desta bactéria, levando a uma maior probabilidade de estabelecimento de infeção crónica (76). Com a alteração das condições ambientais, a bactéria pode reverter ao estado de bacilo ou degenerar. Na forma viável mas não cultivável, *H. pylori* não é detetada pelas técnicas de cultura tradicionais (75).

6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

Na presença de um microrganismo estranho, o nosso organismo inicia o combate através de uma resposta imunológica inata e, posteriormente, através de uma resposta imunológica adquirida. A resposta imune do hospedeiro (figura 3) depende da interação dos fatores de virulência de *H. pylori* com o organismo do hospedeiro. Como mencionado nos capítulos anteriores, estes fatores de virulência contribuem para o estabelecimento de uma infeção aguda no hospedeiro, que recruta células do seu sistema imunitário para a tentar combater. Para que o microrganismo consiga estabelecer uma infeção crónica, é necessário obter um equilíbrio entre a estimulação

do sistema imunitário e a sobrevivência das bactérias no ambiente inflamado. No entanto, quando este equilíbrio é perturbado, a doença gástrica pode ser uma consequência (9). A colonização é acompanhada por uma resposta imunológica local e sistémica, que inclui a produção de anticorpos e a ativação de uma imunidade mediada por células. No entanto, apesar da presença de um organismo infecioso, a ativação da resposta imunológica nem sempre resulta na eliminação da infeção, permitindo a persistência da bactéria no organismo do hospedeiro (24).

6.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA

As células epiteliais são a primeira linha de defesa do organismo e são o local onde se encontram células apresentadoras de antigénios (APCs), como monócitos e células dendríticas, com recetores intracelulares (TLRs), que identificam as bactérias através da ligação ao lipopolissacarídeo (LPS), ativando a resposta imune (77). No entanto, a reposta imunológica inata pode não ser eficaz quando:

- A endotoxina LPS de *H. pylori* não é tão forte como a das restantes bactérias Gram-negativas, pois contém antigénios do grupo sanguíneo de *Lewis,* epítopos que também são encontrados em células humanas. Isto dá origem a uma forma de mimetismo molecular que camufla a bactéria. Assim o LPS não se liga ao TLR4 e não é reconhecido por este recetor, o que ajuda na persistência da infeção, fazendo com que a resposta inflamatória não seja tão exacerbada. Estirpes com antigénios do grupo de Lewis (Le^+) são capazes de se ligar a células dendríticas através do recetor DC-SIGN, o que inibe a ativação das células Th1 (pró-inflamatórias) e estimula uma resposta imunológica das células Th2, com proliferação de IL-10, anti-inflamatórias (figura 5A)(9);
- Há modificação pós-traducional de proteínas do flagelo e este não é reconhecido pelo TLR5 (figura 5B)(9);
- A NAP se liga ao TLR, ativando neutrófilos e monócitos, induzindo a secreção de citocinas (figura 5C), que vão aumentar a resposta inflamatória (9, 21). Esta resposta primária promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos que vão tentar fagocitar os agentes patogénicos. No entanto, esta bactéria tem a capacidade de sobreviver no interior dos macrófagos interferindo com as proteínas dos lisossomas e formando agregados de bactérias que conseguem escapar da fagocitose (figura 5D) – mecanismo de

modulação da fagocitose (9). Está demonstrado que estirpes *cag*PAI negativas e *vac*A negativas não provocam a fusão dos fagossomas e são suscetíveis à morte pelos lisossomas. Por outro lado, estirpes *cag*PAI e *vac*A positivas permitem a formação do megassoma e os lisossomas não serão capazes de eliminar todas as bactérias, que vão continuar a multiplicar-se (78);

- A bactéria induz uma via alternativa ao metabolismo da L-arginina que é patogénica em vários aspetos. A exposição dos macrófagos aos produtos de *H. pylori* resulta na estimulação de produção de arginase II, que produz ureia e L-ornitina. Este processo é patogénico para o hospedeiro porque: a) amplifica o efeito da arginase bacteriana e esgota as reservas do substrato para se ligar ao óxido nítrico; b) tem um papel central na apoptose dos macrófagos derivada do metabolismo da L-ornitina em poliaminas; c) a produção de poliaminas pela ornitina descarboxilase induzida por *H. pylori* resulta na inibição da produção de óxido nítrico (figura 5E) (9);
- A bactéria extrai o colesterol das células hospedeiras e sofre glicosilação, processo que impede a fagocitose bacteriana e a subsequente ativação das células T (figura 5F). As bactérias que não processam o colesterol são mais suscetíveis à fagocitose pelos macrófagos e são incapazes de colonizar a mucosa gástrica (9);

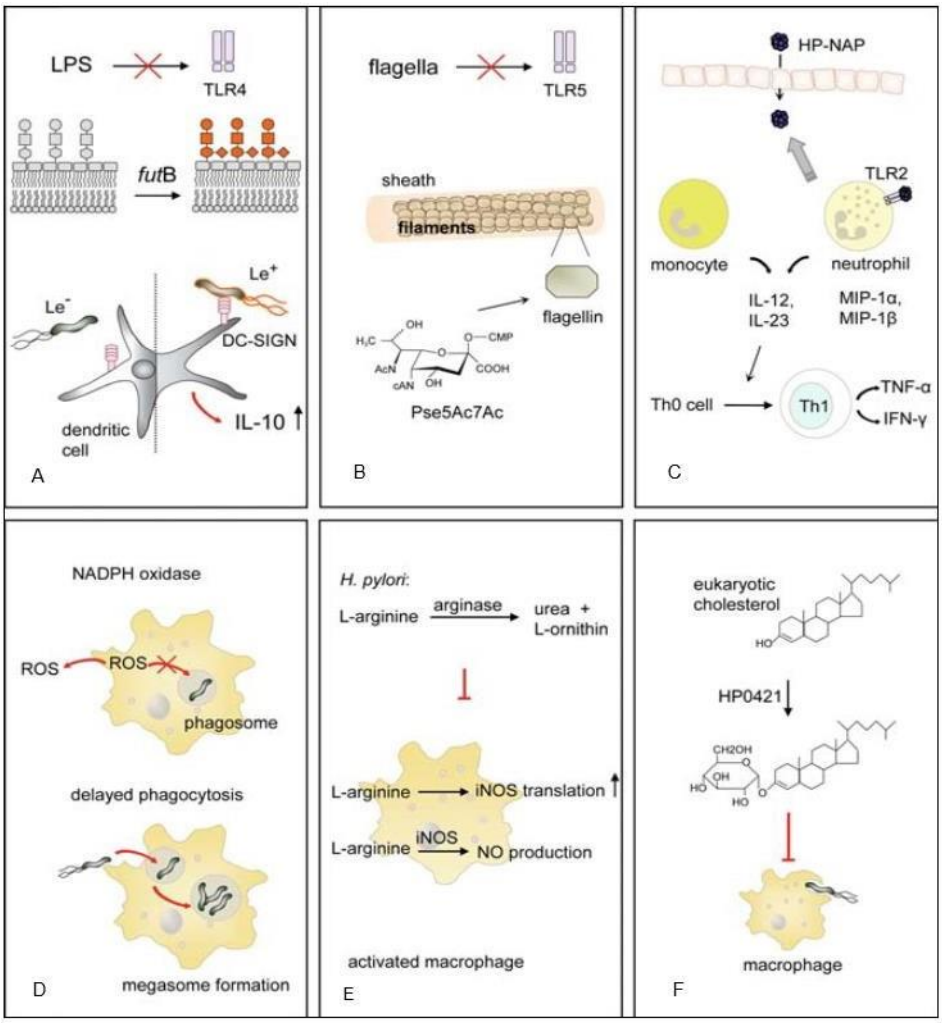


Figura 5: Mecanismos de evasão imunológica inata de Helicobacter pylori. A) *H. pylori* modula o LPS por expressão de fucosil transferases para gerar antigénios de *Lewis*. Os padrões de expressão de *Lewis* resultam do estado ligado/desligado de três fucosiltransferases (por exemplo, FutB). As estirpes *Le*$^{+}$ de *H. pylori* podem ligar-se à lectina tipo C (DC-SIGN) presente nas células dendríticas gástricas, induzindo uma resposta das células Th2, enquanto as variantes Le^{-} escapam à ligação e promovem uma forte resposta das células Th1. B) Após a tradução, a proteína *flagellin* de *H. pylori* sofre glicosilação envolvendo ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac) e não é reconhecida pelo TLR5, devido a uma sequência divergente na região de reconhecimento. C) A NAP atua como um quimiotractor e recruta fagócitos para a lâmina própria. Liga-se via TLR2 aos neutrófilos e monócitos e induz a secreção de citocinas e quimiocinas, que, por fim, produzem células Th0, que se diferenciam em células Th1. D) *H. pylori* evita a apoptose por atraso da fagocitose com formação de megassomas e a NADPH oxidase, que gera espécies reativas de oxigénio (ROS), é dirigida para a membrana plasmática para evitar a morte bacteriana no fagossoma. E) *H. pylori* induz a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) pelos fagócitos através da produção de urease, mas evita danos produzindo L-arginase, que esgota o substrato de iNOS, a L-arginina. O esgotamento da L-arginina também bloqueia a tradução do mRNA iNOS. F) *H. pylori* extrai o colesterol de células hospedeiras e glicolisa-o através da colesterol-a-glucosiltransferase (HP0421), um processo que revoga a fagocitose de *H. pylori* e a subsequente activação das células T. Retirado de (9).

6.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADQUIRIDA

Depois da resposta inata, o sistema imunitário humoral e celular também é ativado pela bactéria, desenvolvendo-se assim uma resposta imunitária específica com a produção de anticorpos anti-*H. pylori*, do tipo IgG e IgA, e com a ativação dos linfócitos T auxiliares provocando reação inflamatória pelas células polimorfo nucleares e mononucleares (9).

A resposta imunológica adquirida é gerada por estimulação da apresentação de antigénios pelas APCs, que os processam e apresentam a outras células do sistema imune, através da sua ligação à superfície de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I e II. Os antigénios bacterianos intracelulares são apresentados por moléculas do MHC I, que ativam linfócitos T citotóxicos $CD8^+$, enquanto os antigénios extracelulares são endocitados e apresentados às moléculas do MHC II, que ativam linfócitos T auxiliares $CD4^+$ e que reagem contra os antigénios bacterianos, estimulando a produção de anticorpos e a lise celular (79). Desta forma, os sistemas imunitários humoral e celular também são ativados pela bactéria, desenvolvendo-se assim uma resposta imune específica com a produção de anticorpos anti-*H. pylori*, do tipo IgG e IgA. As células T auxiliares recrutam células mononucleares para o local de infeção e produzem interferão gama (INF–γ) e fator de necrose tumoral (TNF-α), que provocam a apoptose das células epiteliais e que, juntamente com os anticorpos, agravam a lesão da mucosa epitelial (24).

Como referido em capítulos anteriores, *H. pylori* é uma bactéria com grande recombinação genética, o que implica que os seus antigénios de superfície sejam muito variáveis e, por isso, não estejam associados a imunidade cruzada entre estirpes. Desta forma, após a erradicação bem sucedida de *H. pylori*, há pouca memória ou proteção contra a reinfeção. Assim, como a primoinfeção não confere imunidade para as infeções seguintes, não há como prevenir futuras infeções por esta bactéria (9, 24).

Um estudo realizado por Sutton *et al.,* 2001 demonstrou que ratos imunizados apresentavam gastrite pós-imunização, evidente aos três meses. No entanto, a vacinação não induziu o aumento da gastrite a longo prazo mas também não produziu redução na inflamação gástrica, apesar de se ter verificado uma redução significativa na carga bacteriana. Desta forma, o estudo sugere que a imunização profilática contra a infeção por *H. pylori* pode induzir uma resposta imune eficaz sem desenvolvimento de patologia significativa e que, no caso de existir uma exacerbação patológica induzida pela imunização, os efeitos são transitórios (80).

7 EPIDEMIOLOGIA DA INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

A infeção por *H. pylori* é de distribuição geográfica alargada e estima-se que aproximadamente 50% da população mundial esteja infetada por esta bactéria (24).

Existem vários relatórios sobre a prevalência da infeção por *H. pylori* em vários países, nas últimas décadas (81-83). No entanto, os estudos sobre a prevalência global e regional da infeção, assim como sobre a sua tendência para aumentar ou diminuir com o tempo, nem sempre obtêm resultados coerentes entre si. De forma a tentar resumir e abranger o máximo de informação sobre a epidemiologia desta bactéria, este capítulo tem por base, uma meta-análise publicada por Hooi *et al.,* 2017, sobre a prevalência global da infeção por *H. pylori*, que aglomera 184 artigos, com resultados de 196 países e que é o primeiro estudo a resumir mundialmente a prevalência de *H. pylori*. Esta avaliação foi feita em dois períodos distintos: de 1970 a 1999 e de 2000 a 2016.

7.1 PREVALÊNCIA MUNDIAL

Verificou-se uma diminuição da prevalência da infeção a partir do ano de 2000 na Europa, de 48,8% para 39,8%; na América do Norte, de 42,7% para 26,6% e na Oceania, de 26,6% para 18,7%. Em contraste, a prevalência da infeção foi similar na Ásia (53,6% e 54,3%) e na América Latina e Caraíbas (62,8% e 60,2%), valores para antes e depois do ano 2000, respetivamente. Estes dados encontram-se mais detalhados no anexo 1.

Apesar da associação de infeção por *H. pylori* com falta de cuidados de saúde e higienização, em países em desenvolvimento, Portugal (considerado país desenvolvido) apresenta uma elevada prevalência de infeção por esta bactéria (84,2%) (84). Bastos *et al.,* 2013*,* descreveu que a prevalência em Portugal foi superior à relatada para a maioria dos países europeus e alguns países sul-americanos, africanos e asiáticos, onde a prevalência varia de menos de 10% até 64% (85). Portugal é ainda um dos países da Europa ocidental com maior taxa de doentes com CG, ocupando o quinto lugar em termos de incidência e mortalidade, quando ambos os sexos são considerados. No entanto, e apesar da prevalência de infeção por *H. pylori* ser também elevada, os dados disponíveis ainda não permitem uma correlação direta entre estes dois aspetos (86).

7.2 RESERVATÓRIOS E VIAS DE TRANSMISSÃO

As vias de transmissão de *H. pylori* ainda não são completamente conhecidas. Esta bactéria parece estar associada a poucos hospedeiros e provavelmente a transmissão direta ocorre mais frequentemente entre humanos por via oral-oral e fecal-oral (87), ou através do contexto ambiental (88). Os potenciais reservatórios de *H. pylori* são o humano, animal e ambiental.

Humano: este é o maior e mais aceite reservatório de *H. pylori*. Na sua maioria, novas infeções ocorrem como consequência da transmissão humano a humano, via oral-oral ou fecal-oral ou ambos, principalmente durante a infância (24), seja por maior contacto e dependência de adultos ou por razões de menor consciência higiénica. Um estudo conduzido por Mamishi *et al.,* 2016 abordou a situação da transmissão intrafamiliar e concluiu que mais de metade das crianças que participaram no estudo estavam infetadas por *H. pylori* com genótipos semelhantes aos dos seus pais, particularmente ao do progenitor feminino (87). Em adultos, *H. pylori* foi detetado na saliva, vómito, refluxo gástrico e fezes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (21).

Animal: animais como como ovelhas, vacas ou cães podem ser reservatórios de *H. pylori*, tendo sido já detetados antigénios desta bactéria em fezes de animais (89). Adicionalmente, produtos alimentares de origem animal (ex. produtos lácteos não processados) ou vegetais fertilizados com estrume animal podem ser veículos de transmissão de *H. pylori* (79, 80). Por exemplo, Zamani *et al.,* 2017 verificaram uma correlação entre o consumo de alguns alimentos frescos e não cozinhados e a infeção por *H. pylori*. No mesmo estudo, foi detetado, por cultura e PCR, DNA bacteriano correspondente a *H. pylori* (genes *cagA*, *ureC, vacA e ureA*; assim como 16S RNA ribossómico) em amostras de leite de vaca e ovelha, bem como de outros produtos lácteos (90, 91). Assim, apesar de ser um tema que requer mais investigação, a cadeia alimentar e os alimentos podem representar reservatórios e veículos importantes na transmissão de *H. pylori* aos humanos.

Ambiental: o ambiente aquático é considerado um reservatório de *H. pylori*. Uma revisão por Ramy *et al,.* 2015 apresenta vários estudos que abordam a presença desta bactéria em locais de água tratada e não tratada e aponta a possibilidade da água ser

um meio de transmissão (92). Para além de locais de banhos públicos e esgotos contaminados (93), estudos indicam que vegetais crus podem ficar contaminados por água de irrigação ou fonte de água não tratada usada na lavagem dos mesmos (91). Num estudo realizado por Yingzhi Lu *et al.,* 2002, verificou-se, por métodos de tipagem, que as estirpes de *H. pylori* encontradas em infeções humanas e em águas eram as mesmas, fazendo-se uma ligação direta de transmissão entre este reservatório e o ser humano (93). A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA) considera, desde 1998, *H. pylori* como um contaminante que deve ser integrado nos controlos de segurança e qualidade das águas (94).

Assim, a melhor forma de prevenir a infeção por *H. pylori* será evitar todos os comportamentos de risco, nomeadamente o consumo de água não tratada e alimentos de origem animal não processados e evitar transmissão oral-oral com animais de companhia e entre crianças e adultos.

7.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO HOSPEDEIRO

Não há um consenso sobre quais são os verdadeiros fatores de risco que contribuem para a instalação da infeção por *H. pylori*, tendo em conta a vasta gama de resultados ao longo dos vários estudos feitos sobre o tema. No entanto, os aspetos mais estudados e mais comummente reportados como fatores de risco são:

Fatores genéticos do hospedeiro: Os fatores genéticos do hospedeiro mais determinantes no desenvolvimento da doença são os polimorfismos genéticos que induzem a ativação exacerbada da resposta imune inata, incluindo polimorfismos nos genes das citocinas, no TLR4 e nos genes que codificam proteínas de reconhecimento bacteriano (24). No entanto, apenas 1% e 3% de todos os casos de cancro gástrico são devidos a síndromes hereditários, sendo que os restantes casos não estão relacionados com genes descobertos até à realização deste trabalho. Testes genéticos podem ser feitos para procurar as mutações genéticas que podem causar algumas síndromes de cancro herdadas. No entanto, a maioria das alterações genéticas que levam ao aumento da probabilidade de desenvolver estas patologias, ocorrem após o nascimento, sendo apenas eventos aleatórios que acontecem dentro das células, não associados a uma causa externa (95).

Idade, género e nível de educação da criança ou parental: É mais provável adquirir *H. pylori* no início da infância, devido a um maior contacto familiar e a menores cuidados de higiene básicos como lavagem das mãos de forma regular (84). As taxas de aquisição da bactéria durante a infância são maiores nos países em desenvolvimento, normalmente associados a regiões empobrecidas, com um pobre sistema de educação, superlotadas e com falta de saneamento e higiene (84, 96). Tem sido demonstrado que um menor nível de educação (avaliado desde iliteracia até educação de ensino superior) de mães e/ou crianças infetadas com a bactéria, está relacionado com maior prevalência da infeção (96). Resultados de estudos epidemiológicos realizados em Portugal demonstram uma diminuição da infeção por *H. pylori* em grupos de indivíduos com mais anos de escolaridade. Em grupos de indivíduos com menos anos de escolaridade a taxa de infeção é maior na infância, resultados que apoiam a transmissão da doença por falta de cuidados de higiene e falta de informação (84).

Apesar de não fazer uma correlação entre prevalência de CG em pacientes infetados por *H. pylori*, uma estimativa feita pelo *The Global Cancer Observatory* demonstrou uma relação direta entre a prevalência de CG e a idade dos pacientes. A prevalência desta patologia tende a aumentar com a idade, sendo que se verifica um aumento acentuado de novos casos em pessoas com mais de 45 anos. Atualmente, a maioria das pessoas diagnosticadas com CG está entre os 60 e os 80 anos e verificam-se mais casos em homens do que em mulheres (figura 6) (6). Esta diferença pode ser devida a diferenças fisiológicas, já que os estrogénios podem ser hormonas protetoras contra o desenvolvimento desta patologia. Para além disso, nas mulheres, um atraso na menopausa e uma maior fertilidade podem diminuir o risco de CG (24).

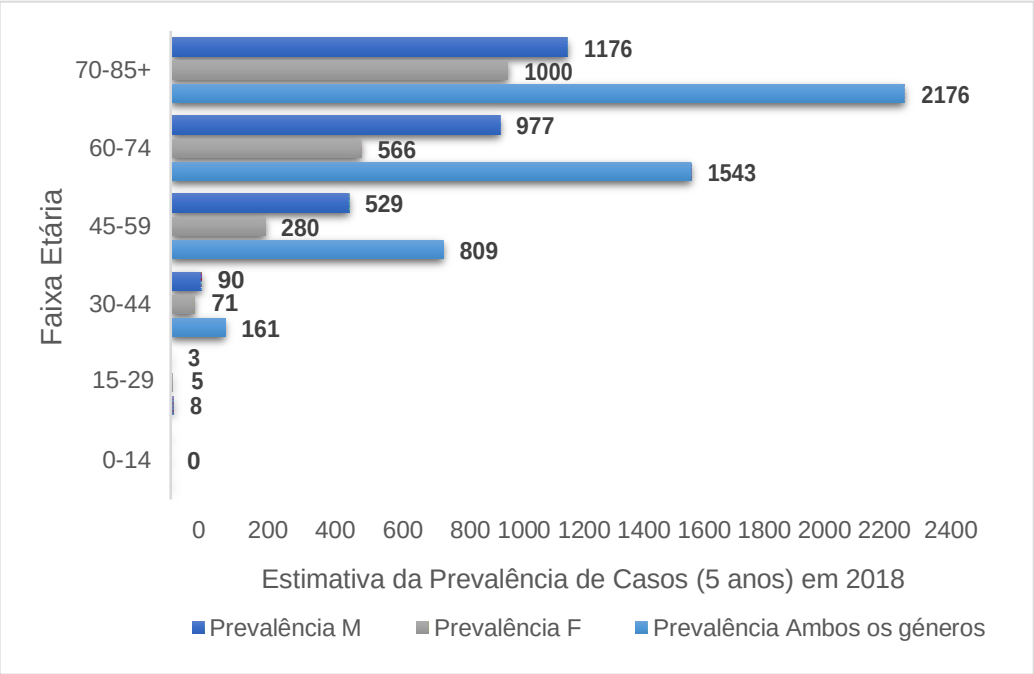


Figura 6: Estimativa da prevalência (5 anos) em 2018, de carcinomas gástricos em função da idade e género. Adaptado de (6).

Dieta: Algumas bactérias têm a capacidade de converter substâncias encontradas em alimentos processados, em produtos químicos que causam mutações no DNA das células no revestimento do estômago. É o caso da conversão de nitratos em nitritos, o que significa que o consumo de alimentos salgados, fumados, conservados e um elevado consumo de carnes está associado a um aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico (24). Por outro lado, alguns dos alimentos que podem reduzir este risco são frutas e legumes frescos porque contêm substâncias antioxidantes, que podem bloquear substâncias que danificam o DNA celular. Assim, qualquer alteração no DNA celular que ative oncogenes ou desative os genes supressores de tumores, aumentam a probabilidade de desenvolvimento CG. Alguns estudos indicam que dietas vegetarianas ajudam a diminuir a incidência de infeção, em relação a dietas ricas em proteínas de origem animal (97).

Situação socioeconómica: Em geral, países em situação socioeconómica mais alta, refletem melhores condições de saneamento e higiene pública, o que dificulta a transmissão de agentes patogénicos. No entanto, no caso da infeção por *H. pylori* outros fatores também podem ter um forte impacto na incidência da infeção, uma vez que existem cada vez mais estudos que mostram que a infeção pode ser tão ou mais elevada em países Europeus como, por exemplo, Portugal, em comparação com países Africanos, por exemplo, a Nigéria (81), como já referido anteriormente.

Características da estirpe infetante: O genótipo de *H. pylori* que coloniza o estômago do hospedeiro é um parâmetro decisivo para o desenvolvimento de patologias gástricas. Fatores de patogenicidade mencionados em capítulos anteriores, como VacA e CagA e as interações dessas proteínas com células hospedeiras, contribuem para os distúrbios gástricos. Isto acontece porque a adesão da bactéria às células epiteliais induz a resposta inflamatória que resulta na deslocação de neutrófilos, seguidos de linfócitos B e T, e macrófagos, a maioria dos quais secreta elevadas quantidades de RNS/ROS implicadas na lesão celular e na carcinogénese. Estirpes CagA+ estão sempre relacionadas com desenvolvimento de CG por interação com a fosfatase pró-oncogénica SHP2 e estirpes VacA+, variante s1 são mais patogénicas (98, 99).

8 ANTIBIOTERAPIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

8.1 OPÇÕES TERAPÊUTICAS

O tratamento da *H. pylori* é recomendado em todos os indivíduos sintomáticos.

A eficácia da terapia depende da formulação, dose terapêutica, duração do tratamento e adesão do paciente à antibioterapia, mas a resistência a antibióticos continua a ser o fator mais crítico (100).

As atuais terapias ainda são baseadas numa gama restrita de antibióticos como a claritromicina, metronidazol, amoxicilina, levofloxacina e tetraciclina, administrados juntamente com um potente supressor de ácido gástrico, como inibidores da bomba de protões (PPI) e, por vezes, sais de bismuto, aplicados em vários tipos de regimes de administração (101).

Ainda hoje, o tratamento de primeira linha é a terapia tripla padrão (tabela 1), proposta em 1997, na primeira conferência de Maastricht, que consiste na administração de PPI, em conjunto com os antibióticos claritromicina e amoxicilina tomados duas vezes ao dia durante 7-14 dias, ou a terapia quádrupla com bismuto (102). O metronidazol é usado em vez da amoxicilina em pacientes com alergia à penicilina (103). No entanto, a taxa de sucesso do tratamento de primeira linha baixou para menos dos 80% recomendados, devido ao aparecimento de estirpes resistentes a estes antibióticos. Desta forma, a terapia tripla padrão é agora recomendada apenas em regiões onde a resistência à claritromicina é inferior a 15%-20%. Nos outros casos, é substituída pela terapia quádrupla com bismuto ou pelas terapia concomitante/simultânea ou terapia sequencial, no caso dos sais de bismuto não estarem disponíveis (tabela 2) (104).

Tabela 1: Terapias de erradicação de H. pylori aplicadas em zonas geográficas com < 15% de resistência à claritromicina. Adaptado de (104).

Tratamento		**Duração (dias)**
1ª linha		
Terapia tripla padrão	Amoxicilina (1 g) b.i.d. + Claritromicina (500 mg) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	7-14
	Metronidazole (500 mg) b.i.d. + Claritromicina (500mg) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	
Terapia quádrupla com bismuto	Sais de bismuto (120 mg) q.i.d. + Tetraciclina (500 mg) q.i.d. + Metronidazol (500 mg) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	10-14
2ª linha		
Terapia quádrupla com bismuto	Sais de bismuto (120 mg) q.i.d. + Tetraciclina (500 mg) q.i.d. + Metronidazol (500 mg) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	10-14
Terapia tripla de Levofloxacina	Levofloxacina (500 mg) q.i.d. + Amoxicilina (1 g) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	10-14
3ª linha		
A escolha do(s) antibiótico(s) deve ser feita com base no resultado do teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA).		

Legenda: d.p. – dose padrão; PPI – inibidores da bomba de protões; b.i.d. (do Latim, *bis in die*) – toma duas vezes por dia; q.i.d. (do Latim, *quater in die*) – toma quatro vezes por dia.

Tabela 2: Terapias de erradicação de H. pylori aplicadas em zonas geográficas com > 15% de resistência à claritromicina. Adaptado de (104).

Tratamento		**Duração (dias)**
1ª linha		
Terapia quádrupla com bismuto	Sais de bismuto (120 mg) q.i.d. + Tetraciclina (500 mg) q.i.d. + Metronidazol (500 mg) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	10-14
Terapia concomitante/ simultânea	PPI (d.p.) b.i.d. + 3 antibióticos, por exemplo, Claritromicina (500 mg) b.i.d. + Metronidazole (500 mg) b.i.d. + Amoxicilina (1 g) b.i.d.	7-10
Terapia sequencial (em duas fases)	PPI (d.p.) b.i.d. + Amoxicilina (1 g) b.i.d.	5-7
	PPI (d.p.) b.i.d. + Claritromicina (500 mg) b.i.d. + Metronidazol (500 mg) b.i.d.	5-7
2ª linha		
Terapia tripla de Levofloxacina	Levofloxacina (500 mg) q.i.d. + Amoxicilina (1 g) b.i.d. + PPI (d.p.) b.i.d.	10-14
3ª linha		
A escolha do(s) antibiótico(s) deve ser feita com base no resultado do teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA).		

Legenda: d.p. – dose padrão; PPI – inibidores da bomba de protões; b.i.d. (do Latim, *bis in die*) – toma duas vezes por dia; q.i.d. (do Latim, *quater in die*) – toma quatro vezes por dia.

Em 2017, a OMS designou o problema da resistência de *H. pylori* à claritromicina como de alta prioridade e para o qual é necessária a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos eficazes na erradicação da bactéria (105). Para tentar contornar este problema, foi criado um algoritmo para adaptar a terapia de segunda linha a cada caso

mais específico (figura 7) (101). Assim, quando a terapia padrão não é eficaz, deve ser aplicado um regime de tratamento alternativo, evitando antibióticos usados anteriormente. Se for necessário um tratamento de terceira linha, vários estudos suportam regimes baseados em quinolonas ou rifabutina, mas o tratamento só deve ser prescrito após ser feito o teste de suscetibilidade antimicrobiana (106). Entre as quinolonas de quarta geração (moxifloxacina, sitafloxacina e gemifloxacina) apenas a sitafloxacina provou ser eficaz por ter uma concentração mínima inibitória (CMI) mais baixa do que outras fluoroquinolonas (107).

Após o tratamento, a erradicação da *H. pylori* deve ser confirmada pelo teste da ureia respirada (UBT), pela pesquisa do antigénio de *H. pylori* nas fezes (SAT) ou por endoscopia, se necessário. Como os anticorpos persistem durante meses após a infeção, o teste serológico não é recomendado para confirmação da erradicação (108) (para mais detalhes sobre testes de diagnóstico ver capítulo 10).

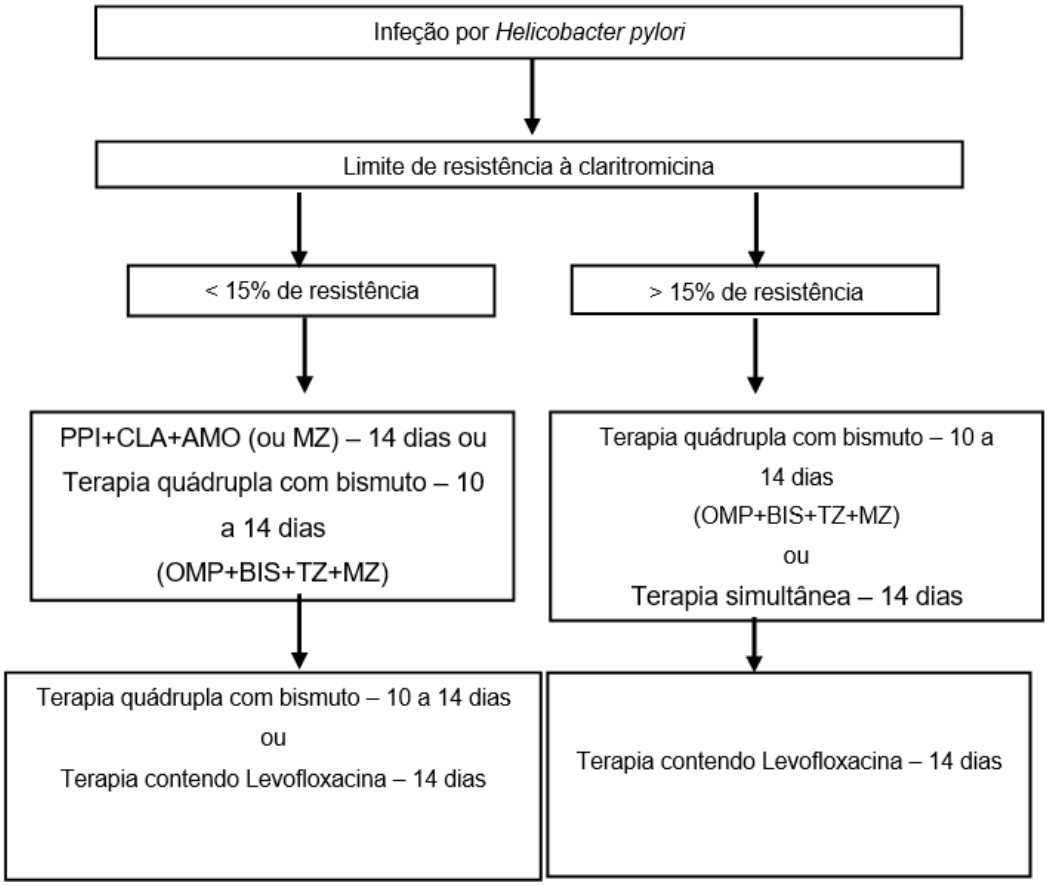


Figura 7: Algoritmo de erradicação de H. pylori de acordo com a resistência primária à claritromicina e gestão em caso de falha do tratamento de primeira linha. PPI - inibidores da bomba de protões; CLA – claritromicina; AMO – amoxicilina; MZ – metronidazol; OMP - omeprazol; BIS – sais de bismuto; TZ – tetraciclina; Adaptado de (101).

8.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

A razão principal para a crescente ineficácia dos esquemas terapêuticos empíricos é a resistência de *H. pylori* aos antibióticos, por aquisição de genes ou por mutações em genes cromossomais da bactéria. Atualmente, já foram descritas estirpes de *H. pylori* com resistência à claritromicina, levofloxacina, amoxicilina, metronidazol e/ou tetraciclinas (101). Os mecanismos de resistência bacteriana associados à perda de eficácia destes antibióticos descrevem-se de seguida.

O principal mecanismo de resistência à **claritromicina** está associado a três mutações pontuais em duas posições nucleotídicas adjacentes (A2143G, A2142G e A2142C) que se localizam na região da peptidiltransferase, domínio V do rRNA 23S e que impedem a ligação da claritromicina ao ribossoma bacteriano. Desta forma a bactéria pode continuar a síntese proteica. Para além disto, estudos mais recentes demonstraram que mutações nos genes: *inf*B que codifica a proteína F2, interveniente no processo de tradução e *rpl22* que codifica uma proteína ribossómica citoplasmática, contribuem para valores maiores de CMI à claritromicina quando ocorrem juntamente com as mutações pontuais anteriormente descritas, por sinergismos com a subunidade 23S do ribossoma bacteriano (109, 110).

A **levofloxacina** funciona como bactericida por inibição das topoisomerases II (DNA-girases e/ou topoisomerase IV) das bactérias, impedindo a replicação do DNA. A DNA-girase de *H. pylori* é codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e a topoisomerase IV pelos genes *parC* e *parE*. Mutações no gene *gyrA* são os principais mecanismos de resistência desta bactéria à levofloxacina (110).

No caso da resistência à **amoxicilina***, H. pylori* sofre alteração das *penicillin-binding proteins* (PBPs). Estas proteínas estão envolvidas na síntese de peptidoglicano logo, uma mutação nas PBPs vai levar à inibição da síntese do peptidoglicano e, por consequência, à inibição da biossíntese da parede bacteriana. Nas situações em que a bactéria é resistente à amoxicilina, a resistência tem sido fundamentalmente associada a mutações nas PBPs (109). Outro mecanismo associado à resistência à amoxicilina é a produção de ß-lactamases, enzimas capazes de catalisar a quebra do anel ß-lactâmico, inativando o antibiótico. No entanto, no caso de *H. pylori,* a produção de ß-lactamases não tem sido muito descrita (109, 110).

Um estudo realizado por Solcà *et al*., 2000 (111) com base no artigo de Goodwin *et al*., 1998 (112), demonstrou que o mecanismo de resistência ao **metronidazol** tem por base mutações no gene *rdxA*, que codifica uma nitroreductase NADPH insensível ao

oxigénio. Estas alterações genéticas geram uma paragem prematura na tradução de proteínas, inativando a nitroredutase que reduz o metronidazol para que a sua ação antimicrobiana seja desencadeada (111, 112).

A **tetraciclina** inibe a síntese proteica ao ligar-se à subunidade ribossómica 30S. A inibição do crescimento bacteriano é feita por perturbação das interações códão-anticodão no ribossoma ligando-se à subunidade 30S, impedindo a fixação do RNA transportador do aminoácido (aminoacetil-RNAt) ao local de aceitação. O mecanismo de resistência às tetraciclinas tem por base mutações no gene *16S* rRNA, que ocorrem na posição 926-928, com alteração da base tripla AGA para TTC (109), que afeta o local de ligação da tetraciclina ao ribossoma bacteriano (113).

8.3 USO DE PROBIÓTICOS

Apesar do papel dos probióticos ainda não estar estabelecido, a suplementação probiótica é projetada para alterar o microbioma gástrico (101). Alguns estudos reportados por Malfertheiner *et al.,* 2017 demonstraram um aumento da taxa de erradicação de *H. pylori,* aquando da adição de probióticos ao tratamento com antibióticos. Atualmente, a administração de probióticos é direcionada para a redução dos efeitos secundários relacionados com terapia de erradicação como, por exemplo, diarreia e desconforto gástrico e não para atuar diretamente sobre a bactéria. Os probióticos devem ser usados de forma ponderada individualmente para cada paciente, com especial consideração em pacientes que já têm histórico de efeitos secundários durante o tratamento com antibióticos (114).

9 EPIDEMIOLOGIA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

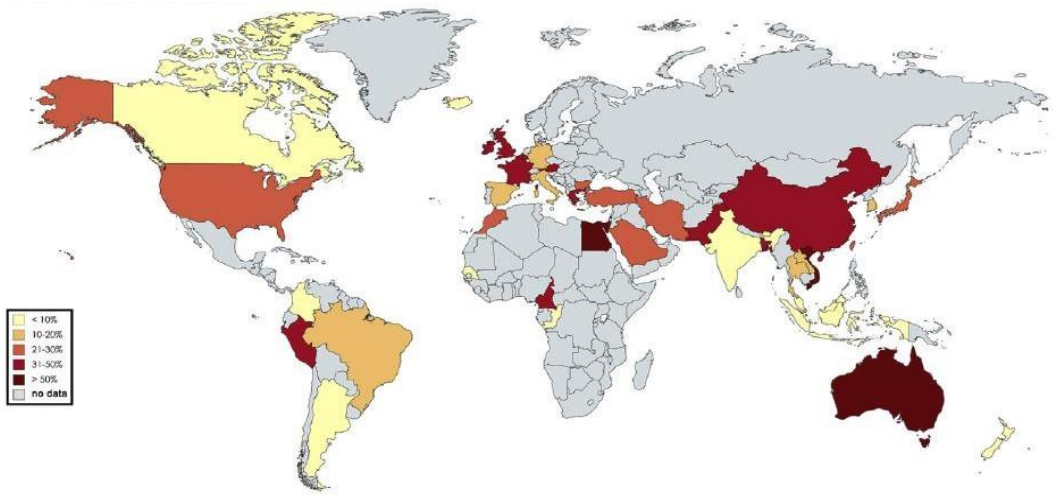
Uma meta-análise publicada em 2018 por Savoldi *et al*., (8) reconheceu que a resistência primária à claritromicina, ao metronidazol e à levofloxacina já ultrapassa os 15% na maioria dos países das regiões da OMS (figura 8).

A resistência aos antibióticos pode ser classificada em: a) resistência primária, se estiver relacionada com a exposição anterior ao antibiótico para o tratamento de outras infeções que não infeções por *H. pylori*, ou b) resistência secundária, resultante de tratamentos anteriores a uma infeção por *H. pylori (115)*.

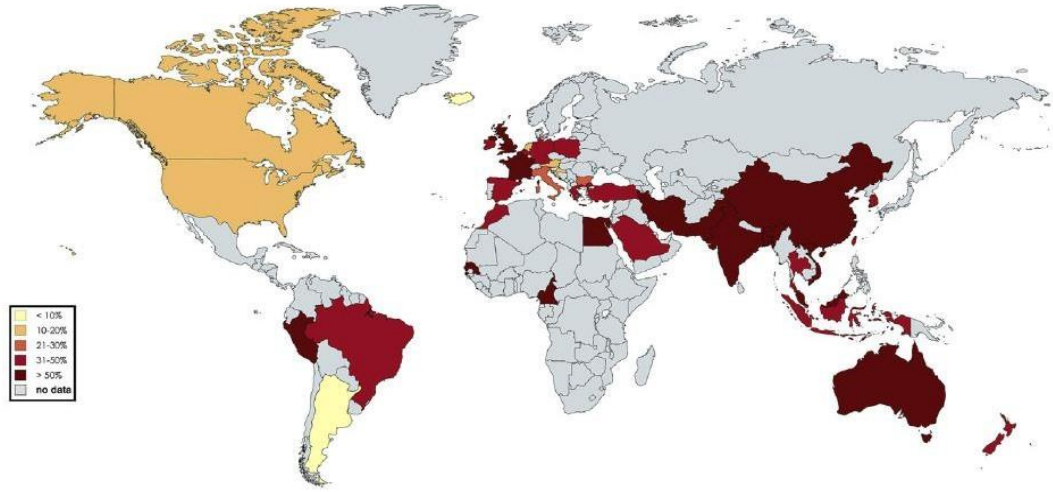
A prevalência de resistência primária à claritromicina é de 18% nos países Europeus; 33% a leste da Região Mediterrânea e 34% na Região do Pacífico Ocidental. Uma taxa de resistência de 10% foi registada no continente Americano e na região do Sudeste Asiático. A resistência primária ao metronidazol é, também, superior a 15% em todas as regiões da OMS e varia de 23% no continente Americano a 56% no leste da Região Mediterrânea. A resistência primária à amoxicilina e à tetraciclina é de 10% em todas as regiões estudadas, exceto na Região Mediterrânea, onde a resistência à amoxicilina atinge 14%. A resistência à levofloxacina é ≥ 15% em todos os países da OMS, com exceção dos países Europeus onde é de 11% e, por fim, a resistência primária combinada à claritromicina e ao metronidazol é de 19% na Região do Mediterrâneo e < 10% nas outras regiões (108).

À semelhança dos resultados para a resistência primária, a resistência secundária à claritromicina é ≥ 15% em todas as regiões da OMS: 18% na zona das Américas; 17% a leste da Região Mediterrânea; 48% nos países Europeus; 15% no Sudeste da Ásia e 67% na Região do Pacífico Ocidental. A resistência secundária ao metronidazol e à levofloxacina foi > 15% em todas as regiões da OMS, sendo que os níveis mais altos se registaram a leste da Região Mediterrânea (65% para o metronidazol e 30% para a levofloxacina) e na Região do Pacífico Ocidental (62% para o metronidazol e 30% para a levofloxacina). Por fim, a resistência à amoxicilina e à tetraciclina permanece em 10% em todas as regiões da OMS. A resistência combinada à claritromicina e ao metronidazol atinge 18% (8).

A. Resistência à claritromicina



B. Resistência ao metronidazol



C. Resistência à levofloxacina

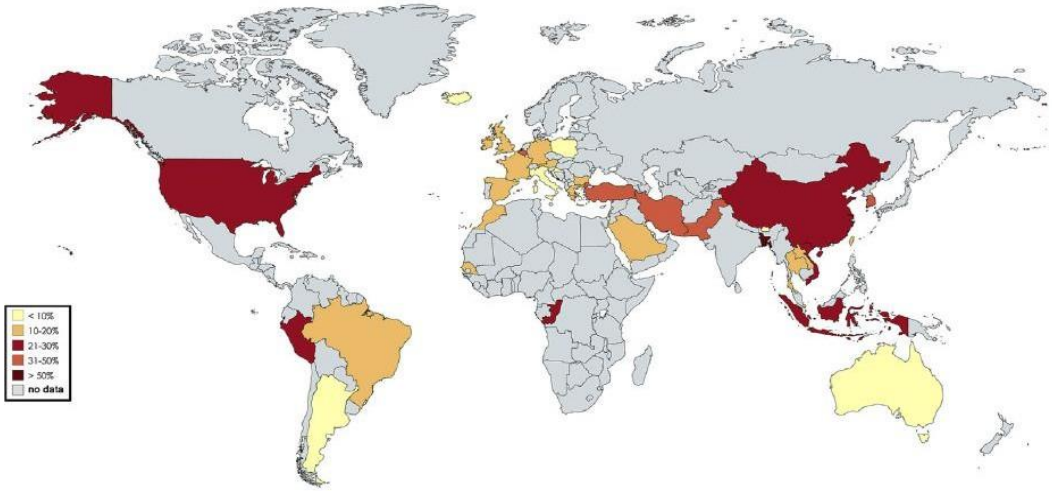


Figura 8: Prevalência da resistência à claritromicina (A), metronidazol (B) e levofloxacina (C), por país, entre 2006 e 2016. Retirado de (8).

Em Portugal, as resistência mais comuns são: claritromicina (42%); metronidazol (25%); levofloxacina (18%); ciprofloxacina (9%); tetraciclina (0,2%) e amoxicilina (0,1%) (116).

Como a resistência a estes antibióticos aumentou em todo o mundo, existem apenas algumas áreas onde os regimes que dependem destes antibióticos ainda são eficazes, quando utilizados como terapia empírica. Desta forma, estratégias de tratamento terão de ser adaptadas aos padrões de resistência em cada país ou região (117).

Para além disto, a mucosa gástrica humana pode ser infetada por estirpes resistentes e por estirpes sensíveis de *H. pylori* em simultâneo, dificultando a antibioterapia. Aproximadamente 5% das infeções por esta bactéria são coinfecções causadas por estirpes independentes de *H. pylori*, por isso, cada população patogénica de um só indivíduo pode ser constituída por estirpes geneticamente idênticas ou por estirpes diferentes (118). Desta forma, torna-se imperativo investigar o impacto destas estirpes com diferentes perfis de resistência no desenvolvimento de doenças recorrentes da infeção, através de métodos fenotípicos e genotípicos. A seleção de terapia para o tratamento da infeção por *H. pylori* deve ser guiada com base no conhecimento da suscetibilidade da bactéria aos diferentes antibióticos.

10 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A infeção por *H. pylori* pode ser confirmada por análise de biópsias gástricas obtidas por endoscopia e, neste caso, a amostra é avaliada por histologia, cultura bacteriana, PCR e teste rápido da urease (RUT). A infeção também pode ser confirmada através da pesquisa do antigénio fecal (SAT) (método enzimático - ELISA) em amostras de fezes, pelo teste respiratório da ureia (UBT) ou por serologia (deteção de IgM, IgG e IgA). No entanto, a serologia é usada, principalmente, para obter informações sobre a epidemiologia da bactéria e o UBT para fazer o seguimento da eficácia do tratamento (119). Para confirmar uma infeção é necessário que, pelo menos, dois testes de diagnóstico sejam concordantes e positivos ou que a cultura seja positiva de forma a diminuir a possibilidade de resultados falsos negativos ou falsos positivos (108).

Os resultados falsos negativos podem ocorrer já que a sensibilidade de qualquer teste nunca atinge 100%. Esta fica diminuída, por exemplo, se: a) o paciente usou antibióticos nas 4 semanas anteriores ; b) o paciente usou PPI nas 2 semanas anteriores à execução do exame ou c) quando ocorre sangramento gastrointestinal. O uso de PPI

podem contribuir para resultados falso negativos, uma vez que estes diminuem a acidez do estômago e, desta forma, a bactéria não precisa de produzir urease para aumentar o pH do meio.

Falsos positivos são raros, mas podem ocorrer, principalmente em resultados de UBT, devido à presença de outras bactérias produtoras de urease na cavidade oral, como *Proteus mirabilis, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus* spp.. Estas bactérias são menos tolerantes a obter informações sobre a epidemiologia da bactéria ácido do que *H. pylori*, pelo que ficam inativas no estômago mas não na cavidade oral (119, 120).

10.1 MÉTODOS INVASIVOS - COLHEITA DA AMOSTRA POR BIÓPSIA

Os métodos invasivos para a colheita de amostras para o diagnóstico de *H. pylori* incluem a biópsia gástrica e a colheita de sangue. As amostras colhidas por biópsia são úteis para realização de testes como, teste rápido da urease e a colheita de sangue para testes serológicos (121).

A endoscopia é realizada para a obtenção de amostras da mucosa gástrica por biópsia a partir do antro ou do corpo do estômago que são depois usadas para exames de deteção da bactéria, como exame histológico, RUT, cultura e PCR (108).

Como a distribuição da bactéria não é uniforme por toda a mucosa gástrica, por vezes o resultado negativo de uma endoscopia pode corresponder a um resultado falso-negativo e não garante a ausência da bactéria. Uma solução seria aumentar o número de amostras de biópsia gástrica mas, por limitações éticas, os gastroenterologistas não podem retirar mais de 5 biópsias por paciente. Para além disto, a endoscopia é um procedimento não recomendado para grávidas, crianças e pacientes idosos (122).

Para além da endoscopia tradicional, é também possível executar uma endomicroscopia confocal a laser que proporciona uma análise e exame histológico da mucosa *in vivo* de forma a tentar diminuir os falsos negativos que podem ocorrer na biópsia tradicional (108).

As amostras de biópsia devem ser mantidas num meio de transporte adequado, por exemplo, meio *Stuart*, sem nutrientes, de forma a manter o microrganismo intacto durante 24 horas, a 4ºC. Outra opção poderá ser o novo meio de transporte semissólido

para *Helicobacter pylori*, GESA, com capacidade para conservar amostras de biópsia gástrica a 4ºC durante 10 dias, sem que se perca a viabilidade das bactérias (123).

10.1.1 Histologia

A histologia é geralmente considerada o método padrão na deteção direta da infeção por *H. pylori*. Uma observação histopatológica exata e detalhada da possível colonização por *H. pylori* pode dar informações sobre densidade bacteriana, grau de inflamação e histopatologia de possíveis doenças associadas à infeção (122). As colorações mais utilizadas são: a coloração de *Warthine-Starry* (figura 10); a coloração de *Giemsa* (figura 11), fácil de executar, muito sensível e pouco dispendiosa e a coloração imuno-histoquímica, que é a mais sensível e específica das três (108).

Uma das vantagens de ter uma preparação histológica é a possibilidade de efetuar uma hibridização fluorescente *in situ* usando sondas de ácidos nucleicos (PNA-FISH). O FISH é um método histoquímico que permite a visualização, identificação e localização de microrganismos *in situ,* sem a necessidade de fazer culturas microbiológicas prévias. A visualização da bactéria é feita diretamente na amostra através da utilização de um conjunto de sondas fluorescentes que se ligam à bactéria, permitindo sua deteção (3, 108).

Para efetuar uma hibridização fluorescente *in situ*, a preparação histológica é processada com xilol (função clareante para retirar o excesso de parafina), PBS (função fixante) e etanol (função desidratante). Esta técnica demonstrou ser muito sensível (97% de sensibilidade) e específica (100% de especificidade) para diagnosticar a infeção por *H*. *pylori*. Além disso, o PNA-FISH é um método rápido, preciso e económico para a deteção de resistência à claritromicina na biópsia gástrica, através de sondas PNA adaptadas para as sondas de DNA existentes. Estas sondas detetam as mutações no gene que codifica para o 23S de RNA ribossómico, mais comummente descrita para este antibiótico em *H. pylori* (figura 9) (4). No entanto, este método requer um laboratório equipado com um microscópio de fluorescência e patologistas treinados na observação de fluorescência (3, 108).

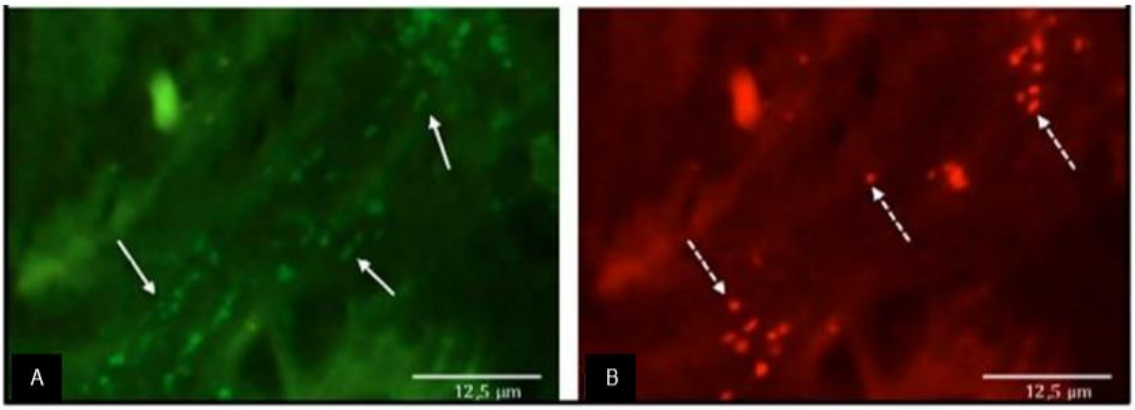


Figura 9: Deteção de estirpes de H. pylori em lâminas histológicas de biopsia gástrica pelo método PNA-FISH. Presença de uma infeção mista dentro da mesma amostra da biópsia. Células de diferentes estirpes de H. pylori podem subsistir muito próximas no estômago (a menos de 5 µm de distância). A) Células de H. pylori que contêm as mutações pontuais associadas à resistência à claritromicina e que podem ser vistas apenas no canal verde (setas sólidas); B) Células de H. pylori tipo selvagem, sem mutações para resistência à claritromicina, que só podem ser vistas no canal vermelho (setas tracejadas). Retirado de (4).

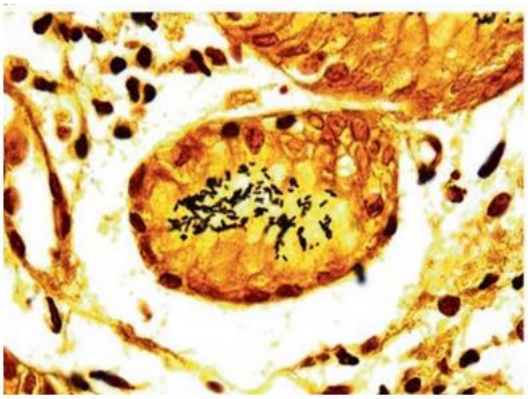


Figura 10: Biópsia gástrica corada com a coloração Wartin Starry. H. pylori está corada a preto. Retirado de (7).

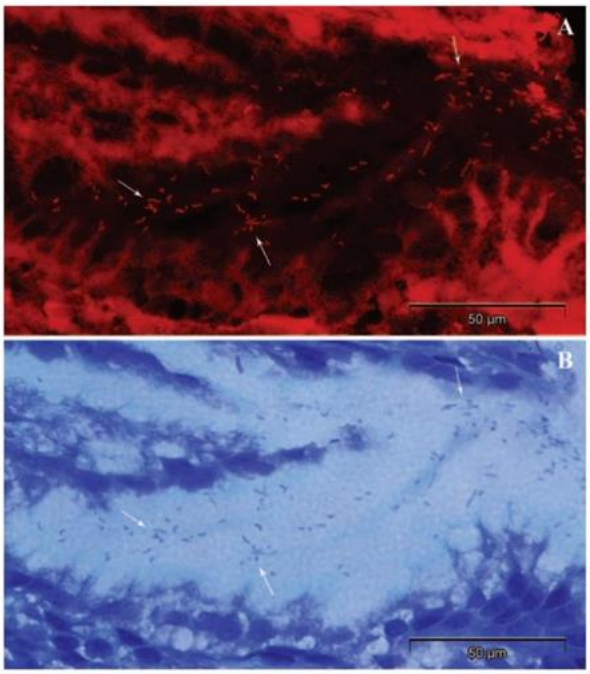


Figura 11: Deteção de H. pylori (setas) numa lâmina histológica de uma amostra de biópsia gástrica usando a sonda fluorescente vermelha Hpy769 (A) e coloração de Giemsa (B). Retirado de (8).

10.1.2 Teste rápido da urease

O RUT é baseado na deteção de amónia e dióxido de carbono, que são produtos da degradação/hidrólise da ureia, pela enzima urease. Este teste barato, rápido e altamente específico (95%-100%) (121), pode ser feito de duas formas: 1) diretamente durante o exame da endoscopia e requer uma amostra de mucosa ou muco gástrico que é colocada num meio em contacto com ureia ou 2) em laboratório, através da análise do material coletado, sendo realizado o isolamento do microrganismo em cultura e provas bioquímicas de identificação, como a prova da urease. Um resultado é positivo se houver mudança de cor do meio (de amarelo para rosa), devido à hidrólise da ureia e libertação de amónia pela bactéria, que torna o pH do meio alcalino. Com base na deteção de amónia e dióxido de carbono, este resultado pode ser positivo em minutos ou horas, dependendo da densidade bacteriana da amostra, sendo mais recomendada a leitura final em 24h (108). No entanto, já existem *kits* como o da *Ultra-Rapid Urease Test* da Biohit® que consegue fornecer o resultado em menos de 1h (124). Para diminuir a probabilidade de resultados falsos-negativos e aumentar a especificidade: 1) devem ser colhidas duas amostras de biópsia, uma do antro evitando áreas de ulceração e metaplasia intestinal e uma do corpo do estômago de aparência normal; 2) deve existir uma densidade bacteriana de, aproximadamente, 10^5 UFC (96) e 3) deve ser evitada a utilização de antibióticos, compostos contendo bismuto, ou PPI nas 4 semanas anteriores ao exame, para evitar uma diminuição da densidade bacteriana (108, 122).

Quando o resultado não é concordante, recomenda-se confirmação por outros testes não-invasivo como UBT ou SAT, após a descontinuação de PPI ou antibioterapia (108).

10.1.3 Exame cultural

O isolamento de *H. pylori* nem sempre é bem-sucedido, pois esta é uma bactéria exigente, que necessita de meios de cultura complexos, enriquecidos com sangue ou plasma, preferencialmente com antibióticos (como, por exemplo, vancomicina, anfotericina B, trimetroprim e cefsulodina) para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. Os meios mais comummente usados para a cultura de *H. pylori* são: o caldo de infusão de coração e cérebro (BHI), *Mueller Hinton* ou o meio seletivo *Pylori Agar* (figura 12) (5). É um método lento, uma vez que as bactérias demoram entre 5 a 7

dias a crescer numa cultura primária (125). Sendo o *H. pylori* uma bactéria microaerofílica, exige baixas concentrações de oxigénio e de dióxido de carbono (5% de O_2 e 10% de CO_2), com uma temperatura ótima de 37ºC e pH neutro. O exame cultural apresenta uma sensibilidade entre 80% e 93% e especificidade entre 95% e 100% (106). Uma das vantagens do exame cultural é que para além do diagnóstico, também permite ter a bactéria isolada para determinar a sensibilidade aos antibióticos (108, 122).

O diagnóstico da presença desta bactéria em cultura é baseado na morfologia característica das colónias, bem como nos testes da urease, catalase e reações de oxidase positivos. Para considerarmos um crescimento positivo para *H. pylori*, as colónias devem ser pequenas, brilhantes, translúcidas ou cinzentas (figura 12) (126).

Assim como em exames mencionados anteriormente, a especificidade da cultura de *H. pylori* também é afetada por alguns fatores como baixa densidade bacteriana, sangramento, consumo de álcool, uso de anti-histamínicos H_2 e PPI. Todos estes medicamentos devem ser evitados durante 2 semanas antes da cultura, exceto os antibióticos que devem ser evitados, pelo menos, durante 4 semanas antes (108).



Figura 12: Colónias de H. pylori no meio de cultura seletivo Pylori Agar inoculado com a estirpe ATCC® 43504. Retirado de (5).

10.1.4 Serologia

Vários testes serológicos baseados na deteção de anticorpos IgG e IgA *anti-H. pylori* em soro ou sangue total, estão amplamente disponíveis para o diagnóstico da infeção. O mais comumente utilizado, não só para o diagnóstico, mas também para rastreio em estudos epidemiológicos, devido ao seu baixo custo e rapidez, é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (108). O método serológico pode ser feito por ELISA *in-house* ou através de *kits* comerciais como, por exemplo, o VIDAS® *H. pylori* IgG da BioMérieux.

A pesquisa de IgG é muitas vezes o primeiro teste de diagnóstico efetuado tanto num cenário clínico para excluir infeção, como em estudos epidemiológicos porque os anticorpos persistem após a erradicação da bactéria. No entanto, a pesquisa de IgG não permite fazer a distinção entre uma infeção ativa ou uma infeção passada, por isso não é o método ideal para a verificação do sucesso da terapia de erradicação. O IgA pode ser positivo em alguns casos, mas é menos sensível e menos específico do que a pesquisa de IgG.

Uma vantagem do teste serológico é que a sua precisão não é afetada por úlceras hemorrágicas, atrofia gástrica, nem pelo uso de PPI ou antibióticos (122).

Como a especificidade deste método é baixa, podem ser produzidos resultados falso-positivos em zonas de baixa prevalência de infeção. Desta forma, deve ser feita a confirmação dos resultados por um método alternativo como a UBT ou SAT.

Para além da pesquisa de IgG específicos, a serologia também pode ser aplicada na deteção de anticorpos contra as proteínas CagA, VacA e UreA, entre outras (108, 127, 128).

Por fim, a pesquisa de anticorpos por ELISA também pode ser efetuada em amostras de urina ou saliva, apesar da concentração de anticorpos presente nestas amostras ser mais baixa (127).

10.2 OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO – NÃO INVASIVOS

De forma a evitar a endoscopia e a biópsia, foram desenvolvidos outros métodos de diagnóstico não invasivos e, por isso, mais confortáveis para o paciente. Os testes de diagnóstico de infeção por *H. pylori* que utilizam amostras obtidas por processos não invasivos incluem análises ao ar expelido pelos pulmões e às fezes, em *kits* de diagnóstico rápido (108).

10.2.1 Teste respiratório da ureia

O UBT é, atualmente, o teste mais usado nos laboratórios de análises clínicas e é considerado o teste padrão, mais eficaz na deteção da infeção, com uma sensibilidade e especificidade de cerca de 95% em adultos e cerca de 90% em crianças, com idade inferior a seis anos. É um método simples e rápido, amplamente utilizado para controlar a erradicação do *H. pylori,* depois de administrada a terapêutica (108).

Neste caso, o paciente bebe uma solução de ureia marcada com carbono 13 (13C) não radioativo ou carbono 14 de baixa radiação e são recolhidas amostras do ar expirado antes da ingestão e 15 a 30 minutos após a ingestão da solução. Se a bactéria estiver presente na mucosa gástrica, a ureia presente na solução ingerida é hidrolisada em amónia e ácido carbónico, que são depois absorvidos para a corrente sanguínea, sendo expirado dióxido de carbono 13C, detetado pelo teste. Para além de detetar a presença da bactéria, este exame permite inferir a densidade bacteriana, já que a concentração de dióxido de carbono 13C é proporcional à densidade bacteriana na mucosa gástrica. É aconselhado um período de jejum antes da realização do teste para aumentar o contacto da solução com o substrato e as bactérias, e deve ser evitada a toma de PPI e de antibióticos 2 a 4 semanas antes do exame, respetivamente, de modo a evitar resultados falso-negativos (108, 119, 127). A amostra de ar expirado é analisada por espectrometria de massa ou espectroscopia de infravermelhos isótopo-seletiva (127).

10.2.2 Pesquisa fecal de antigénio

O SAT é um exame relativamente barato por não requerer equipamentos de laboratório muito avançados e a amostra de fezes poder ser coletada pelo paciente, em casa, e armazenada entre 2°C e 8°C até três dias ou a -20°C indefinidamente. Baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais, mais utilizados e mais sensíveis, ou policlonais, para deteção de antigénios de *H. pylori* nas fezes. O exame pode ser realizado através de imunoensaios enzimáticos (ELISA) ou por técnica imunocromatográfica, permitindo o diagnóstico da infeção no momento. A técnica imunocromatográfica apresenta especificidade e sensibilidade superiores a 90% (108).

Um exemplo de *kit* comercial que é utilizado em laboratórios em Portugal é o da bioNexia® *H. pylori* Ag., que demonstrou um bom desempenho, em comparação com o teste ELISA (129).

Neste exame é preciso ter em conta que em pacientes com diarreia ou com fezes sem forma ou aguadas, a sensibilidade é reduzida porque a concentração de antigénio está diluída (108).

10.3 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

10.3.1 Métodos bioquímicos

A identificação de *H. pylori* pode ser feita através da realização de testes bioquímicos para alguns analitos, de acordo com as características bioquímicas desta bactéria. *H. pylori* é uma bactéria oxidase positiva, não fermentadora, produtora de catalase e citocromo oxidase, que cresce em meios com 1% a 3,5% de NaCl. A característica mais notável é o seu elevado nível de urease e de atividade da fosfatase alcalina. As estirpes típicas não reduzem nitratos e não formam indol (108, 122).

De acordo com estas características, os testes bioquímicos mais comuns para a identificação de *H. pylori* são:

- Teste da catalase: adicionar peróxido de hidrogénio a 3% a uma amostra de cultura bacteriana e observar se há produção de efervescência, que indica a conversão de H_2O_2 em água e oxigénio;
- Teste da oxidase (tira de oxidase): teste baseado em reações de oxidação redução, utilizado para identificar bactérias produtoras de citocromo c. Neste teste, uma ou duas colónias da bactéria em análise são espalhadas sobre a superfície da área reagente da tira. Quando a enzima está presente, há oxidação do reagente (tetrametil-p-fenilenodiamina) em indofenol e forma-se uma cor púrpura ou azul, dependendo do fabricante do *kit* (130).

10.3.2 Técnicas moleculares - PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Para identificação de *H. pylori* por PCR é necessária a extração do DNA genómico das amostras de biópsia gástrica e, de seguida, são selecionados genes-alvo específicos como, por exemplo: regiões conservadas do 16SrDNA; o gene *ureA;* entre outros (3), para os quais existem *primers* já desenvolvidos. Esta técnica apresenta elevada sensibilidade. De seguida, no método de PCR clássico, através de uma eletroforese em gel é possível avaliar a amplificação da região alvo. Devido ao seu custo elevado e à necessidade de equipamentos especializados, o PCR é mais utilizado para investigação científica (108).

Para além do método clássico de PCR, a identificação bacteriana também pode ser feita pela técnica quantitativa de PCR em tempo real com fluorescência. Este método permite detetar a amplificação de uma sequência de DNA durante o processo e não apenas no final, como acontece no PCR convencional. Neste método é possível observar cada base azotada a ser adicionada à sequência em tempo real, com o auxílio de corantes fluorescentes, que se ligam a estas bases e, ao serem estimulados, emitem um sinal para o recetor específico no termociclador. Esta técnica elimina a etapa de eletroforese em gel para avaliação da amplificação do material genético estudado (137).

10.3.3 MALDI-TOF

O método de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) é uma técnica de ionização utilizada em espectrometria de massa (MS) que permite a análise de biomoléculas, como DNA e proteínas, assim como de grandes moléculas orgânicas (131).

A identificação por MALDI-TOF MS é feita comparando a massa de vários biomarcadores do microrganismo desconhecido, com a base de dados já existente e comparando o espectro MS do isolado microbiano desconhecido, com os espectros MS de isolados microbianos conhecidos, contidos na base de dados (132). Desta forma é possível utilizar as proteínas específicas de *H. pylori* para deteção desta bactéria na amostra de cultura bacteriana. No entanto como o espectro de *H. pylori* ainda não é muito enriquecido, a base de dados não tem tanta capacidade para identificar as estirpes desta bactéria (131).

11 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A avaliação da sensibilidade de *H. pylori* aos diversos agentes antimicrobianos é geralmente efetuada através de cultura e antibiograma. O antibiograma, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), é um exame que tem como objetivo determinar o perfil de sensibilidade e resistência de bactérias e fungos, *in vitro,* aos antimicrobianos. No caso de *H. pylori* é principalmente importante determinar a suscetibilidade à claritromicina (133)

As *guidelines* do CLSI e EUCAST recomendam a determinação da CMI para *H. pylori*, podendo usar-se vários testes: diluição em agar, microdiluição, ou E-test. O meio de cultura para estes testes recomendado é o *Mueller Hinton,* com 5% de sangue de carneiro ou meio BHI, incubado a 35°C ± 2°C durante 72 horas, em atmosfera microaerofílica equivalente a 10% de CO_2, 5% O_2, e 85% N_2 (134). Apesar da interpretação do TSA para *H. pylori* poder ser feita usando os *breakpoints* do CLSI ou EUCAST, as tabelas do CLSI apenas têm a interpretação da CMI para a claritromicina, enquanto as tabelas do EUCAST têm os *breakpoints* para a amoxicilina, levofloxacina, claritromicina, tetraciclinas, metronidazol e rifampicina. Por exemplo, a resistência *in vitro* ao metronidazol nas condições de ensaio descritas pelo CLSI não preveem, de forma fiável, o sucesso do tratamento *in vivo* e, por conseguinte, não existem valores para este antibiótico. Para além disto, dado que as diretrizes do EUCAST estão livremente disponíveis, é mais fácil para os laboratórios em locais com poucos recursos disporem de uma referência atualizada e facilmente disponível para interpretar as suscetibilidades aos antibióticos (133, 134).

12 PREVENÇÃO E CONTROLO

A infeção por *H. pylori* é um risco para a saúde pública nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento, onde estas patologias representam uma maior causa de morte precoce (116).

O papel de *H. pylori* na doença gastroduodenal tornou-se bem estabelecido e apesar da taxa de infeção parecer estar a diminuir ao longo dos anos a nível mundial (82), ainda se mantém importante acumular dados sobre a epidemiologia da infeção por esta bactéria, assim como aumentar o conhecimento acerca das vias de transmissão e fatores de risco para o hospedeiro humano, de forma a criar mais e

melhores medidas de saúde pública para a prevenção e controlo da infeção.

A erradicação do cancro gástrico exigirá mais esforços e investigação centrados na prevenção da aquisição da infeção por esta bactéria. Estratégias inovadoras são necessárias para reduzir a prevalência de *H. pylori* em áreas com elevada taxa de infeção como África, Índia, e América do Sul, onde o acesso aos cuidados de saúde e os recursos podem ser limitados. Desta forma, é prioritário reduzir os fatores de risco de transmissão da bactéria, começando por uma melhoria das condições de higiene e saúde pública. O controlo da disseminação desta bactéria em crianças, vai causar um grande impacto na prevalência da infeção em adultos, bem como das doenças a ela relacionadas (81).

Uma das possíveis estratégias para o controlo da infeção por *H. pylori* e, consequentemente, das doenças associadas a esta infeção, é o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra este agente patogénico (135, 136).

12.1 VACINAÇÃO

Os esforços para desenvolver uma vacina eficaz contra *H. pylori* começaram no início dos anos 90, mas até à escrita deste trabalho, não havia nenhuma vacina disponível no mercado. Como esta bactéria é essencialmente extracelular, as tentativas de desenvolver uma vacina têm por base a imunização da mucosa gástrica e têm sido estudadas diversas vias de administração da vacina, assim como de componentes bacterianas antigénicas. Algumas técnicas já foram testadas em ensaios clínicos: vacinação da mucosa, vacinação oral e imunização parenteral, mas todas falharam por não demonstrarem diminuir a densidade bacteriana (136). A urease, as proteínas CagA, VacA, NAP e a catalase são reconhecidas por anticorpos, pelo que constituem potencias alvos de ação. No entanto, a diversidade antigénica de cada estirpe dificulta a seleção do antigénio mais adequado.

Malfertheiner *et al.* 2018 relataram imunização intramuscular com uma vacina composta por três antigénios recombinantes de *H. pylori* – a citotoxina vacuolizante A (VacA), um antigénio associado à citotoxina CagA e a NAP – que preveniu a infeção em modelos animais, sendo bem tolerada e altamente imunogénica. No entanto, outro estudo clínico com o mesmo tipo de imunização intramuscular aplicada em humanos saudáveis, com estirpes de *H. pylori* CagA+*,* não corroborou os primeiros resultados porque, em comparação com o grupo placebo, a vacina não conferiu proteção adicional contra a infeção por uma estirpe CagA+ de *H. pylori* , apesar do aumento da resposta humoral (135).

CONCLUSÕES

Apesar da prevalência da infeção por *H. pylori* ter diminuído nas últimas décadas, estima-se que cerca de 50% da população mundial esteja atualmente infetada por esta bactéria. No entanto, 80% da população infetada são indivíduos assintomáticos e apenas os 20% restantes irão eventualmente desenvolver gastrite, PUD, linfoma de MALT e / ou CG, sendo necessária uma conjugação de fatores de virulência bacterianos e fatores inerentes ao hospedeiro para que estas doenças corram.

O diagnóstico da infeção por *H. pylori* pode ser feito por diversos métodos, associados a colheita invasiva ou não invasiva e apesar da erradicação da infeção ser o objetivo do tratamento, este processo pode ser complicado e moroso devido à elevada capacidade de adaptação desta bactéria ao microbioma gástrico e à elevada taxa de resistência a determinados antibióticos. Assim, torna-se imperativo criar uma maior consciencialização da importância do uso do TSA para um tratamento mais dirigido e eficaz das infeções por *H. pylori*.

Por fim, devido à elevada prevalência da infeção e à gravidade das patologias associadas a esta bactéria, é importante dar continuidade ao seu estudo e caracterização das estirpes mais virulentas, privilegiando os estudos epidemiológicos tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, de forma a compreender melhor as diferentes vias de transmissão e reservatórios e, desta forma, tentar diminuir as taxas de infeção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chauhan N, Tay ACY, Marshall BJ, Jain U. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. *Helicobacter*. 2019;24(1):e12544.

2. Boltin D, Niv Y, Schutte K, Schulz C. Review: *Helicobacter pylori* and non-malignant upper gastrointestinal diseases. *Helicobacter*. 2019;24 Suppl 1:e12637.

3. Mazaheri Assadi M, Chamanrokh P, Whitehouse CA, Huq A. Methods for Detecting the Environmental Coccoid Form of *Helicobacter pylori*. Frontiers in Public Health. 2015;3(147).

4. Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Oleastro M, Carneiro F, Brandao C, et al. Validation of a fluorescence in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for detection of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1887-93.

5. bioMérieux S.A. Pylori agar 2020 [Available from: http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/61-pylori-agar.

6. Internacional Agency for Research in Cancer - World Health Organization. Global Cancer Observatory: Cancer Today [updated Setembro, 2018. Available from: https://gco.iarc.fr/today.

7. Loayza Villa MF, Herrera Sevilla VL, Vivar-Diaz N. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Gastric Biopsies Using Laser Microdissection and qPCR. In: Bishop-Lilly KA, editor. Diagnostic Bacteriology: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 71-88.

8. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. Gastroenterology. 2018;155(5):1372-82.e17.

9. Sasakawa C. Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut; Springer, Berlin, Heidelberg 2009.

10. O'Rourke J, Bode G. Morphology and Ultrastructure. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001.

11. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994;61:1-241.

12. Salaspuro M. *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. In: Jansson B, Jörnvall H, Rydberg U, Terenius L, Vallee BL, editors. Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse. Basel: Birkhäuser Basel; 1994. p. 185-95.

13. World Health Organization. IARC MONOGRAPHS ON THE IDENTIFICATION OF CARCINOGENIC HAZARDS TO HUMANS 2020 [updated 2020-02-18. Available from: https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications.

14. Robin Warren J, Marshall B. UNIDENTIFIED CURVED BACILLI ON GASTRIC EPITHELIUM IN ACTIVE CHRONIC GASTRITIS. The Lancet. 1983;321(8336):1273-5.

15. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press

ASM Press.; 2001.

16. Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. The Medical journal of Australia. 1985;142(8):436-9.

17. Morris A, Nicholson G. Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. The American journal of gastroenterology. 1987;82(3):192-9.

18. Morris AJ, Ali MR, Nicholson GI, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. Annals of internal medicine. 1991;114(8):662-3.

19. Hellstrom P-M. This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. World journal of gastroenterology. 2006;12(19):3126-7.

20. Fox JG. The non-H pylori *Helicobacter*s: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. 2002;50(2):273-83.

21. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-90.

22. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis) from the human gastric mucosa. Journal of medical microbiology. 1985;19(2):257-67.

23. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Curr Microbiol. 2017;74(7):863-9.

24. Dennis L. Kasper SLh, Joseph Loscalzo, J.Larry Jameson, Dan L. Longo e Anthony S. Fauci Harrison'S Principles Of Internal Medicine. 20th ed2018 08-2018. 4048 p.

25. Hatakeyama M. Malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases: Gastric Cancer and MALT Lymphoma. Adv Exp Med Biol. 2019;1149:135-49.

26. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J. 2016;39(1):14-23.

27. Bonsor DA, Sundberg EJ. Roles of Adhesion to Epithelial Cells in Gastric Colonization by *Helicobacter pylori*. Adv Exp Med Biol. 2019;1149:57-75.

28. Kalali B, Mejias-Luque R, Javaheri A, Gerhard M. H. pylori virulence factors: influence on immune system and pathology. Mediators Inflamm. 2014;2014:426309.

29. Mobley HLT. Urease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001.

30. Fischer W, Prassl S, Haas R. Virulence Mechanisms and Persistence Strategies of the Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. In: Sasakawa C, editor. Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 129-71.

31. Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2002;42(1):35-56.

32. Campanale M, Nucera E, Ojetti V, Cesario V, Di Rienzo TA, D'Angelo G, et al. Nickel free-diet enhances the *Helicobacter pylori* eradication rate: a pilot study. Dig Dis Sci. 2014;59(8):1851-5.

33. Spohn G, Scarlato V. Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press

ASM Press.; 2001.

34. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 1997;388(6642):539-47.

35. Dunne C, Dolan B, Clyne M. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. World journal of gastroenterology. 2014;20(19):5610-24.

36. Schwartz JT, Allen LA. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. Journal of leukocyte biology. 2006;79(6):1214-25.

37. Kao C-Y, Sheu B-S, Sheu S-M, Yang H-B, Chang W-L, Cheng H-C, et al. Higher Motility Enhances Bacterial Density and Inflammatory Response in Dyspeptic Patients Infected with *Helicobacter pylori*. 2012;17(6):411-6.

38. Oleastro M, Ménard A. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. Biology (Basel). 2013;2(3):1110-34.

39. Oleastro M, Cordeiro R, Ferrand J, Nunes B, Lehours P, Carvalho-Oliveira I, et al. Evaluation of the clinical significance of homB, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. J Infect Dis. 2008;198(9):1379-87.

40. Šterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. *Helicobacter pylori* virulence genes. World journal of gastroenterology. 2019;25(33):4870-84.

41. Fujimoto S, Olaniyi Ojo O, Arnqvist A, Wu JY, Odenbreit S, Haas R, et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007;5(1):49-58.

42. Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. Toxins (Basel). 2017;9(3).

43. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science (New York, NY). 2002;297(5581):573-8.

44. Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. J Infect Dev Ctries. 2008;2(3):174-81.

45. Loh JT, Beckett AC, Scholz MB, Cover TL. High-Salt Conditions Alter Transcription of *Helicobacter pylori* Genes Encoding Outer Membrane Proteins. 2018;86(3):e00626-17.

46. Benktander J, Barone A, Johansson MM, Teneberg S. *Helicobacter pylori* SabA binding gangliosides of human stomach. Virulence. 2018;9(1):738-51.

47. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. Comparative Genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the Outer Membrane Protein Families. 2000;68(7):4155-68.

48. Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Talebi Bezmin Abadi A. Binding of the *Helicobacter pylori* OipA causes apoptosis of host cells via modulation of Bax/Bcl-2 levels. Sci Rep. 2017;7(1):8036.

49. Farzi N, Yadegar A, Aghdaei HA, Yamaoka Y, Zali MR. Genetic diversity and functional analysis of oipA gene in association with other virulence factors among *Helicobacter pylori* isolates from Iranian patients with different gastric diseases. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2018;60:26-34.

50. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. Cancer research. 2008;68(2):379-87.

51. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AHM, et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and Bacterial Pathogenicity: Genetic and Functional Genomic Analysis of hopH Gene Polymorphisms. The Journal of Infectious Diseases. 2006;194(10):1346-55.

52. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. 2003;56(4):287-91.

53. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Mitov I. *Helicobacter pylori* oipA genetic diversity and its associations with both disease and cagA, vacA s, m, and i alleles among Bulgarian patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2011;71(4):335-40.

54. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori* oipA gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. BMC infectious diseases. 2013;13:555.

55. Evans DJ, Jr., Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect Immun. 1995;63(6):2213-20.

56. Polenghi A, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Cabrelle A, Tamassia N, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. J Immunol. 2007;178(3):1312-20.

57. Jung SW, Sugimoto M, Graham DY, Yamaoka Y. homB Status of *Helicobacter pylori* as a Novel Marker To Distinguish Gastric Cancer from Duodenal Ulcer. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(10):3241-5.

58. Green ER, Mecsas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. Microbiology spectrum. 2016;4(1).

59. Lax AJ. Opinion: Bacterial toxins and cancer--a case to answer? Nat Rev Microbiol. 2005;3(4):343-9.

60. Sgouras D, Tegtmeyer N, Wessler S. Activity and Functional Importance of *Helicobacter pylori* Virulence Factors. Adv Exp Med Biol. 2019;1149:35-56.

61. Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences. 2017;93(4):196-219.

62. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. Gut. 1997;40(3):297-301.

63. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(25):14648-53.

64. Allen L-AH. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. 2001;14(3):273-7.

65. Backert S, Tegtmeyer N. Type IV Secretion and Signal Transduction of *Helicobacter pylori* CagA through Interactions with Host Cell Receptors. 2017;9(4):115.

66. Tombola F, Carlesso C, Szabo I, de Bernard M, Reyrat JM, Telford JL, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. Biophysical journal. 1999;76(3):1401-9.

67. Foegeding NJ, Caston RR, McClain MS, Ohi MD, Cover TL. An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. Toxins (Basel). 2016;8(6).

68. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. The EMBO journal. 1999;18(20):5517-27.

69. Vinion-Dubiel AD, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, Cao P, et al. A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. The Journal of biological chemistry. 1999;274(53):37736-42.

70. McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. Toxins (Basel). 2017;9(10).

71. Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Safaralizadeh R. *Helicobacter pylori*-related risk predictors of gastric cancer: The latest models, challenges, and future prospects. Cancer Med. 2020.

72. Chmiela M, Kupcinskas J. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019;24 Suppl 1(Suppl Suppl 1):e12638.

73. Sterbenc A, Poljak M, Zidar N, Luzar B, Homan M. Prevalence of the *Helicobacter pylori* homA and homB genes and their correlation with histological parameters in children. Microb Pathog. 2018;125:26-32.

74. Oleastro M, Cordeiro R, Yamaoka Y, Queiroz D, Megraud F, Monteiro L, et al. Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, homB and homA. Gut Pathog. 2009;1(1):12.

75. Sarem M, Corti R. Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence. Gastroenterología y Hepatología (English Edition). 2016;39(1):28-35.

76. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2018;82(2):e00001-18.

77. Qingbin Niu JZ, Xingquan Yu, Tao Feng, Hong Ji, Yuming Li, Weiwei Zhang, and Baoguang Hu. Immune Response in H. pylori-Associated Gastritis and Gastric Cancer. Gastroenterology Research and Practice. 2020;2020:9.

78. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. Gastroenterology. 2007;133(1):288-308.

79. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen JA. Kuby Immunology: Macmillan Learning; 2018.

80. Sutton P, Boag JM. Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. Vaccine. 2019;37(50):7295-9.

81. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology. 2017;153(2):420-9.

82. Frugis S, Czeczko NG, Malafaia O, Parada AA, Poletti PB, Secchi TF, et al. PREVALENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* TEN YEARS AGO COMPARED TO THE

CURRENT PREVALENCE IN PATIENTS UNDERGOING UPPER ENDOSCOPY. Arq Bras Cir Dig. 2016;29(3):151-4.

83. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. Dig Dis Sci. 2014;59(8):1698-709.

84. Bastos J, Peleteiro B, Barros R, Alves L, Severo M, de Fatima Pina M, et al. Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. *Helicobacter*. 2013;18(6):413-22.

85. Bastos J, Peleteiro B, Pinto H, Marinho A, Guimaraes JT, Ramos E, et al. Prevalence, incidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Portuguese adolescents (EpiTeen). Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. 2013;45(4):290-5.

86. Morais S, Ferro A, Bastos A, Castro C, Lunet N, Peleteiro B. Trends in gastric cancer mortality and in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Portugal. European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP). 2016;25(4):275-81.

87. Mamishi S, Eshaghi H, Mahmoudi S, Bahador A, Hosseinpour Sadeghi R, Najafi M, et al. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori*: genotyping of faecal samples. Br J Biomed Sci. 2016;73(1):38-43.

88. Kayali S, Manfredi M, Gaiani F, Bianchi L, Bizzarri B, Leandro G, et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. Acta Biomed. 2018;89(8-S):72-6.

89. Ghasemian Safaei H, Rahimi E, Zandi A, Rashidipour A. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: The detection of H. pylori antigens in the milk and faeces of cows. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2011;16:184-7.

90. Monno R, De Laurentiis V, Trerotoli P, Roselli AM, Ierardi E, Portincasa P. *Helicobacter pylori* infection: association with dietary habits and socioeconomic conditions. Clinics and research in hepatology and gastroenterology. 2019;43(5):603-7.

91. Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shokri-Shirvani J. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. Caspian J Intern Med. 2017;8(3):146-52.

92. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. J Adv Res. 2015;6(4):539-47.

93. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. Appl Environ Microbiol. 2002;68(3):1436-9.

94. EPA United States Environmental Protection Agency. Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination [updated April 9, 2019. Available from: https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-1-ccl-1.

95. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(5):700-13.

96. Yucel O, Sayan A, Yildiz M. The factors associated with asymptomatic carriage of *Helicobacter pylori* in children and their mothers living in three socio-economic settings. Japanese journal of infectious diseases. 2009;62(2):120-4.

97. Zhang M, Zhou YZ, Li XY, Tang Z, Zhu HM, Yang Y, et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in elderly people in the Beijing region, China. World journal of gastroenterology. 2014;20(13):3635-9.

98. Whitmire JM, Merrell DS. *Helicobacter pylori* Genetic Polymorphisms in Gastric Disease Development. In: Kamiya S, Backert S, editors. *Helicobacter pylori* in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 173-94.

99. Backert S, Blaser MJ. The Role of CagA in the Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. 2016;76(14):4028-31.

100. Matsumoto H, Shiotani A, Graham DY. Current and Future Treatment of *Helicobacter pylori* Infections. In: Kamiya S, Backert S, editors. *Helicobacter pylori* in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 211-25.

101. Malfertheiner P, Venerito M, Schulz C. *Helicobacter pylori* Infection: New Facts in Clinical Management. Curr Treat Options Gastroenterol. 2018;16(4):605-15.

102. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M, et al. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Eur J Gastroenterol Hepatol. 1997;9(1):1-2.

103. Macias-Garcia F, Baston-Rey I, de la Iglesia-Garcia D, Calvino-Suarez C, Nieto-Garcia L, Dominguez-Munoz JE. Bismuth-containing quadruple therapy versus concomitant quadruple therapy as first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection in an area of high resistance to clarithromycin: A prospective, cross-sectional, comparative, open trial. *Helicobacter*. 2019;24(1):e12546.

104. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. American Journal of Gastroenterology. 2017;112(2):212-39.

105. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics 2017 [Available from: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.

106. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. World journal of gastroenterology. 2014;20(29):9912-21.

107. An Y, Wang Y, Wu S, Wang YH, Qian X, Li Z, et al. Fourth-generation quinolones in the treatment of *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. World journal of gastroenterology. 2018;24(29):3302-12.

108. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. World journal of gastroenterology. 2015;21(40):11221-35.

109. Zanotti G, Cendron L. Structural Aspects of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance. In: Kamiya S, Backert S, editors. *Helicobacter pylori* in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 227-41.

110. Francesco VD, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World journal of gastrointestinal pathophysiology. 2011;2(3):35-41.

111. Solcà NM, Bernasconi MV, Piffaretti JC. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: comparison of the rdxA gene sequences in 30 strains. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(8):2207-10.

112. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Molecular microbiology. 1998;28(2):383-93.

113. Wu JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):578-83.

114. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut. 2017;66(1):6-30.

115. VIANNA JS, RAMIS IB, RAMOS DF, VON GROLL A, SILVA PEAd. DRUG RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI*. Arquivos de Gastroenterologia. 2016;53:215-23.

116. Lopo I, Libânio D, Pita I, Dinis-Ribeiro M, Pimentel-Nunes P. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Portugal: Systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2018;23(4):e12493.

117. Huang C-C, Tsai K-W, Tsai T-J, Hsu P-I. Update on the first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection - a continuing challenge from an old enemy. Biomark Res. 2017;5:23-.

118. Rizvanov AA, Haertlé T, Bogomolnaya L, Talebi Bezmin Abadi A. *Helicobacter pylori* and Its Antibiotic Heteroresistance: A Neglected Issue in Published Guidelines. Front Microbiol. 2019;10:1796-.

119. Kotilea K, Bontems P, Touati E. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection. Adv Exp Med Biol. 2019;1149:17-33.

120. Osaki T, Mabe K, Hanawa T, Kamiya S. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Journal of medical microbiology. 2008;57(7):814-9.

121. Alessandro C. Pasqualotto JLMFS, Daniela D. Rosa e Veronica Ruttkay S. Leite Métodos de diagnóstico: consulta rápida. 2ª Edição ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA.; 2012.

122. Talebi Bezmin Abadi A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches. J Pathog. 2018;2018:9064952.

123. Cellini L, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Bessa LJ, Baffoni M, Di Giulio M. New transport medium for cultural recovery of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4325-9.

124. McNicholl AG, Ducons J, Barrio J, Bujanda L, Forné-Bardera M, Aparcero R, et al. Accuracy of the Ultra-Rapid Urease Test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterología y Hepatología. 2017;40(10):651-7.

125. Blanchard TG, Nedrud JG. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. Curr Protoc Microbiol. 2006;Chapter 8:Unit8B.1.

126. Hayder KH. DETECTION THE OCCURRENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* AMONG DYSPEPTIC PATIENT AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTIC AGENTS. Al-Nahrain Journal of Science. 2007;10(2).

127. Atkinson NS, Braden B. *Helicobacter pylori* Infection: Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. Dig Dis Sci. 2016;61(1):19-24.

128. Formichella L, Romberg L, Meyer H, Bolz C, Vieth M, Geppert M, et al. Validation of a Novel Immunoline Assay for Patient Stratification according to Virulence of the Infecting *Helicobacter pylori* Strain and Eradication Status. J Immunol Res. 2017;2017:8394593-.

129. Francis Megraud, Lucie Benejat, Astrid Ducournau, Dominique Roux, Cédric Lecaille, Frank Zerbib, et al. Evaluation of the new immunochromatographic test BioNexia H. pylori Ag for rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* antigen. 27th ECCMID, The congress of ESCMID,; Vienna, Aústria2017.

130. Biomeriéux. Oxidase Reagent - Détection de l'enzyme cytochrome oxydase, . France2005/06.

131. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015;6(791).

132. Fei Chen DJ, Jinghao Zhang, Feng Yang, Jun Zhou, Shiwen Wang, Yi Fang, Michal A Olszewski, Zhijun Bao, Ping Xiang, Yanmei Zhang, Hu Zhao. Application of MALDI-TOF MS for rapid identification and virulence analysis of *Helicobacter pylori*. Internacional Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2018.

133. Clinical and laboratory standards institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 2015.

134. *Helicobacter pylori* [Internet]. 2020 [cited Março de 2020]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf.

135. Malfertheiner P, Selgrad M, Wex T, Romi B, Borgogni E, Spensieri F, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a parenteral vaccine against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers challenged with a Cag-positive strain: a randomised, placebo-controlled phase 1/2 study. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2018;3(10):698-707.

136. Walduck AK, Raghavan S. Immunity and Vaccine Development Against *Helicobacter pylori*. Adv Exp Med Biol. 2019;1149:257-75.

137. Lehours, P. and F. Megraud (2011). "*Helicobacter pylori* molecular diagnosis." Expert Rev Mol Diagn 11(4): 351-355.

ANEXOS

13 ANEXO 1 - TENDÊNCIAS TEMPORAIS NA PREVALÊNCIA DA INFEÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI* NAS DIFERENTES REGIÕES DA ONU.

Time trends in HP prevalence in UN African region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
Benin	–	74.1	–	70.0–78.1	–	2	–	446
Nigeria	85.1	–	80.8–89.3	–	1	–	268	–
South Africa	–	86.8	–	83.3–90.3	–	1	–	356
Tunisia	–	72.8	–	53.7–91.9	–	2	–	348
UN Africa	**–**	**76.2**	**–**	**67.3–85.0**	**–**	**5**	**–**	**1 150**

* Number of individuals included in analysis

Time trends in HP prevalence in UN Asian region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
Eastern Asia	**55.6**	**53.2**	**50.6–60.5**	**48.7–57.7**	**30**	**42**	**30978**	**242 245**
China	60.5	52.2	53.0–68.0	48.1–56.4	11	14	13 753	88 577
Taiwan	54.4	53.7	51.0–57.8	25.3-82.1	1	2	823	1 413
Japan	55.5	46.5	44.9–66.2	36.5–56.4	8	6	8 308	38 856
Korea	50.2	55.8	45.5–54.9	51.3–60.3	10	20	8 094	113 399
Southern Asia+	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**
Iran	–	59.0	–	51.5–66.5	–	8	–	5 256
South–Eastern Asia+	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**
Malaysia	4.7	14.2	3.6–5.8	13.2–15.1	1	1	1 417	5 370
Singapore	40.8	–	37.7–43.9	–	2	–	953	–
Western Asia+	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**
Turkey	70.1	80.1	64.7–75.4	75.0-85.2	1	2	284	5 752
UN Asia	**53.6**	**54.3**	**45.5–61.7**	**49.7–59.0**	**34**	**53**	**33 632**	**156 563**

\+ Insufficient data for pooled analysis

* Number of individuals included in analysis

Retirado de: https://www.gastrojournal.org/cms/10.1053/j.gastro.2017.04.022/attachment/e62e5992-4a20-45b2-805e-89cc634d8b0d/mmc1.pdf

Time trends in HP prevalence in UN European region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
Eastern Europe	**66.1**	**41.2**	**52.3–80.0**	**20.4–61.9**	**2**	**3**	**965**	**10 900**
Czech Republic	58.9	36.6	53.4–64.4	14.8–50.4	1	2	309	4 335
Poland	73.0	58.3	69.6–76.4	57.1–59.5	1	1	656	6 565
Northern Europe	**47.2**	**35.0**	**31.0–63.3**	**20.5–49.5**	**13**	**5**	**22 579**	**3 698**
Estonia	87.9	69.2	85.7–90.2	75.1–90.0	2	1	1 958	240
Finland	56.8	–	46.5–67.0	–	3	–	896	–
Iceland	35.7	36.2	30.9–40.4	31.8–40.7	1	1	387	447
Norway	–	29.5	–	13.1–46.0	–	2	–	2 652
Sweden	25.4	11.1	17.8-33.0	7.9–14.4	4	1	6 021	359
UK	43.3	–	11.1-75.4	–	2	–	4 293	–
Southern Europe	**53.3**	**49.4**	**47.2–59.3**	**36.2–62.6**	**11**	**3**	**11 127**	**849**
Greece	54.4	33.7	44.4–64.4	24.5–42.9	2	1	401	101
Italy	55.2	–	42.5–68.0	–	4	–	3 067	–
San Marino	47.5	–	40.5–54.5	–	2	–	3 765	
Spain	53.9	56.6	38.7-69.2	49.0–64.3	3	2	1 195	748
Western Europe	**27.9**	**38.8**	**15.4–40.5**	**36.4–41.3**	**5**	**4**	**15 626**	**12 461**
Germany	33.1	44.4	27.8–38.6	42.4–46.4	5	1	15 626	2 318
Netherlands	–	35.5	–	30.1–41.0	–	3	–	10 143
UN Europe	**48.2**	**39.7**	**40.3–56.2**	**32.5–46.9**	**31**	**15**	**50 297**	**27 908**

* Number of individuals included in analysis

Retirado de: https://www.gastrojournal.org/cms/10.1053/j.gastro.2017.04.022/attachment/e62e5992-4a20-45b2-805e-89cc634d8b0d/mmc1.pdf

Time trends in HP prevalence in UN Latin American and the Caribbean region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
Bahamas	–	57.8	–	51.1–64.6	–	1	–	204
Guadeloupe^	–	49.0	–	35.3–62.8	–	1	–	854
Mexico	66.5	38.1	65.7–67.4	31.7–44.6	1	1	11 605	215
Panama	–	54.1	–	59.2–67.6	–	1	–	74
Argentina	49.1	–	44.7–53.5	–	1	–	493	–
Brazil	68.2	71.3	63.5–72.9	68.1-74.6	2	2	374	1 080
Chile	–	74.6	–	72.9–76.2	–	1	–	2 615
Ecuador	–	72.2	–	63.0–81.5	–	1	–	90
UN Latin America and Caribbean	**62.8**	**60.2**	**53.6–71.9**	**52.0–68.4**	**4**	**9**	**12 472**	**5 132**

^ Insular region of France located in the Caribbean

* Number of individuals included in analysis

Time trends in HP prevalence in UN Northern America region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
Greenland	41.4	–	37.9–44.9	–	2	–	756	–
United States of America	42.2	26.6	22.9–61.5	19.0–34.1	2	3	7 950	7 781
UN Northern America	**42.7**	**26.6**	**32.7–52.6**	**19.0–34.1**	**4**	**3**	**8 706**	**7 781**

* Number of individuals included in analysis

Time trends in HP prevalence in UN Oceania region								
Country	**Prevalence Estimates**		**95% CI**		**# of reporting studies**		**# of subjects***	
	1970–1999	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**	**1970–1999**	**2000–2016**
New Zealand	24.0	–	18.5–30.4	–	1	–	1 060	–
Australia	30.4	18.7	24.3–36.5	11.6–25.7	1	2	217	3 768
UN Oceania	**26.6**	**18.7**	**20.4–32.8**	**11.6–25.7**	**2**	**2**	**1 277**	**3 768**

* Number of individuals included in analysis

Retirado de: https://www.gastrojournal.org/cms/10.1053/j.gastro.2017.04.022/attachment/e62e5992-4a20-45b2-805e-89cc634d8b0d/mmc1.pdf

U.PORTO

MESTRADO
ANÁLISES CLÍNICAS
Internship Report
Ana Margarida Ferreira Maia
M
2020

Internship Report

Ana Margarida Ferreira Maia

Faculdade de Farmácia

PARTIAL REPRODUCTION OF THIS REPORT IS AUTHORISED FOR RESEARCH PURPOSES ONLY, SUBJECT TO A WRITTEN DECLARATION BY THE PERSON CONCERNED, THAT HE UNDERTAKES TO DO SO.

Intern: Ana Margarida Ferreira Maia

Master Degree in Clinical Analysis

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Internship informations – PART I

- EXALAB – Laboratoire de Biologie Médicale , Bordeaux, France

Field of study – Microbiology

Period – February and March of 2020

- **Coordinator:** Dr. Jean-Philippe Brochet - Director of EXALAB (Group LABEXA)

Internship informations – PART II

- Laboratório de análises clínicas S. Lázaro (LACSL), Braga, Portugal

Field of study – Hematology / Clinical Biochemistry / Immunology

Period – June and July

- **Coordinator:**
  - Dr. Duarte Nuno Paiva - Diretor do LACSL
  - Dra. Cristina Silva

ACKNOWLEDGEMENTS

It is with great pride that I finish another stage of my academic course. This course was more fun to travel with the help of some people who were already part of my life and others who crossed their path with mine. Without establishing any order, I thank you:

To Dr. Jean-Philippe Brochet, director of the EXALAB laboratory, for welcoming me as an intern and to colleagues in the Microbiology section, who helped me to integrate in a different country.

To Dr. Nuno Paiva, director of LACSL for receiving me as a trainee; to Dr. Cristina Silva for the orientation during the internship period; to Dr. Alda, Dr. Carla and Dr. Pedro who made my integration in the laboratory easier; and to all the other LACSL employees.

To Professor Franklim Marques for helping me in the decision to be part of the ERASMUS+ program, as well as to Professors Alice Santos Silva and Eugénia Pinto for their concern and orientation during this phase.

To my mother, Luísa, for being my support at several levels and making me believe that "forward is the way". All the education, values and ideals that you have given me throughout my life have helped me to build my way here and will be the basis for everything I achieve in the future. For this, I am eternally grateful.

To my sister, Leonor, for being an example of success, sharing and generosity. I learn daily from you.

To my father, José; to my grandmother, Albina; to my godfathers Conceição and Orlando; and to all the other family members. For always being there for the memorable moments and being a part of my life, I could not help but thank you.

To the new friendships that the University of Porto brought me. Ana Ferreira, Patrícia Alves and Clara Lima who made the adaptation to a new university and study cycle much more fun. The days passed too quickly.

And finally, to Marne. Friend, companion of all trips and partner of all emotional rollercoasters. No doubt, the most focused person I know. Thank you for all the affection and care shown in all situations. I also thank you for reminding me, daily, that there is always room to be more and better. I wish we could continue to share experiences and make this relationship the best long-term experience we ever thought we would have.

Thank you for being a great part of my life.

ABSTRACT

This internship was designed to apply and improve previously acquired knowledge and technical skills in actual clinical settings.

The following report describes the activities performed during the course of the internship of the curricular program of the Master's Degree in Clinical Analysis of FFUP, which was divided in two parts: Microbiology on the core laboratory of EXALAB, in Bordeaux, France and Hematology, Biochemistry and Immunology/Endocrinology on "Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro" (LACSL) in Braga, Portugal.

The first part of this report presents an overall approach of the facilities, regarding its organization, analytical areas and available equipment, followed by the detailed description of what it is performed on the Microbiology sector, emphasizing its quality assurance procedures, operating principles of the analyzers and different equipment and the fundamentals of the evaluated analytical parameters.

Because of COVID-19 pandemic, the second part of my internship was carried out on LACSL in Braga, Portugal.

As the first part, this internship was designed to apply and improve previously acquired knowledge and technical skills in actual clinical settings and it presents an overall approach of the facilities, regarding its organization, analytical areas and available equipment, followed by the detailed description of what it is performed on the Hematology, Biochemistry and Immunology/Endrochronology sectors, emphasizing its quality assurance procedures, operating principles of the analyzers and different equipment and the fundamentals of the evaluated analytical parameters.

Índice

Acknowledgements iii

Abstract iv

Abbreviations List x

Figure List xii

Table List xiv

Introduction 1

General information about the internship 2

Schedule 2

Internship supervision and monitoring 2

PART I 3

Characterization of the laboratory - EXALAB 4

Pre-analytical phase 5

Analytical phase 5

1. Microbiology 6

1.1 Bacteriology 9

1.1.1 Urine bacteriology exam and antibiogram 10

1.1.2 Hemoculture, precious liquids and other samples (except urine) 12

1.1.3 Gram stain 13

1.2 Parasitology 14

1.2.1 Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi diagnostic 15

2 Molecular biology 16

Post-analytical phase 17

Quality control 17

PART II 18

Characterization of the clinical analysis laboratory São Lázaro (LACSL) 19

Pre-analytical Phase 21

3 Harvest 21

3.1 Blood 21

3.2 Glucose tolerance test 23

3.3 Pre-natal screening 24

3.4 Other organic products 24

Analytical phase 24

4 Hematology 25

4.1 Cbc with platelet count 26

RBC (RBC/PLT Channel – Hydrodynamic focus) 27

HGB (HBG Channel – SLS-Hb Method) 28

PLT (RBC/PLT Channel – Hydrodynamic focus) 29

WBC (Diff 6- Channel - Flow cytometry) 29

WBC/BASO Channel (Flow cytometry) 30

RET Channel (Flow cytometry) 30

IMI Channel (RF/DC) 30

NRBC Channel (Flow cytometry) 31

4.2 CBC and histogram interpretation 31

4.3 The morphological study of peripheral blood 33

4.4 Glycated hemoglobin determination 34

4.4.1 Auto analyzer ADAMS A1c HA-8160 34

4.5 Sedimentation rate 35

4.5.1 Auto analyzer Vesmatic Cube 200 36

4.6 Clotting tests 36

4.6.1 Sysmex® CA-600 Series Analyzer 37

5 Biochemistry 38

5.1 Biochemical parameters determination (ADVIA 1800 Chemestry System) 38

6 Immunology and Endocrinology 40

6.1 Determination of immunological markers 40

6.1.1 Advia Centaur XP Immunoassay System 40

6.1.2 Mini-ViIDAS® (BioMérieux) 42

6.2 Immunoallergology 42

6.2.1 ImmunoCap 250 (Phadia) 43

6.3 Serum proteins electrophoresis 44

6.3.1 Capillarys Sebia 2 44

6.4 Arterial and venous gasometry 45

6.4.1 EPOC® Blood Analysis System 46

6.5 Autoimmune disease 46

6.5.1 Anti-nuclear antibodies (ANA) 47

6.6 Manual serology 48

6.6.1 Syphilis diagnostic 48

6.6.1.1 VDRL (RPR - Rapid Plasma Reagin) 49

6.6.1.2 Total antibody test for *Treponema pallidum*……49

6.6.2 Febrile serodiagnosis 49

6.6.3 Waaler-Rose reaction 50

6.6.4 Paul-Bunnel reaction 51

6.6.5 ABO/Rh systems 51

6.6.5.1 Blood group determination – Indirect Coombs Test……..52

6.6.6 COVID-19 diagnostic 53

7 Other sections and samples 54

7.1 Seminal fluid (spermogram) 54

7.1.1 Macroscopic exam 55

7.1.2 Microscopic exam 56

7.2 Faeces (SAT – Helicobacter pylori) 58

Quality Control 59

Calibration 59

Internal quality control (IQC) 60

External quality control (EQC) 60

Clinical case 61

Clinical Case interpretation 63

Bibliography 65

APPENDIX 67

Appendix 1 - Community-acquired urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria 68

Appendix 2 - Health-care associated urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria 70

Appendix 3 – Urine obtained from an intermittent urethral catheter, by pyelostomy, by ureterostomy, by cystoscopy or by suprapubic aspiration..... 72

Appendix 4 - Immunochromatography Assay (Lateral flow tests)..... 73

Appendix 5 - PANTHER® culture and incubation criteria for different human samples in the EXALAB Microbiology Sector..... 74

Appendix 6 – Flow Cytometry..... 80

Appendix 7 – Scattergrams of each channel from sysmex xt-4000i..... 81

Appendix 8 - Hemacolor® staining..... 83

Appendix 9 - HPLC..... 84

Appendix 10 - ELFA..... 85

Appendix 11 - IFI Assay..... 86

Appendix 12 - The indirect immunofluorescence test performed using the TITERPLANE Technique..... 87

ABBREVIATIONS LIST

APTT - Activated partial thromboplastin time

AST – Antimicrobial resistance test

CBC – Cell blood counting

DAT – Direct Antiglobulin Testing

ESR – Erythrocyte Sedimentation Rate

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

fL - fentoliters

HGB – Haemoglobin

HPLC - High Efficiency Liquid Chromatography

IAT – Indrirect Antiglobulin Testing

IFF – Indirect Immunofluorescence

INR - International Normalized Ratio

LIS – Laboratory Information System

nm - nanometers

PLT – Platelets

PT – Prothrombin time

PVX - Chocolate agar PolyViteX culture medium

RBC – Red blood cells

RDW – Red cell distribution

pg - picograms

RET – Reticulocytes

MCV – Medium cell volume

WBC – White blood cells

FIGURE LIST

Figure 1: Distribution of the microorganisms found in all types of samples. Epidemiology report from 2019 6

Figure 2: BACT/ALERT® 9

Figure 3: PREVI® Isola 9

Figure 4: Vitek® 2 from EXALAB's Microbiology sector 10

Figure 5: Vitek® MS from EXALAB's Microbiology sector 10

Figure 6: IQ 200– Urine Microscopy System, from EXALAB's Microbiology sector 10

Figure 7: Immunochromatography test for the identification of OXA-48-like, KPC, NDM and VIM carbapenemases from cultures 13

Figure 8: Auto-analyzer PANTHER® from EXALAB's Microbiology sector 16

Figure 9: Example of a positive (with abnormal values) CBC performed by Sysmex XT-4000i, with flags and scattergram for each channel 26

Figure 10: Auto analizer Sysmex XT-4000i 27

Figure 11: ADAMS A1c HA-8160 for determination of glycosilated haemoglobin 35

Figure 12: Protein electrophoresis results. A) Normal values; B) Abnormal values, with the monoclonal gamma-globulin protein band 45

Figure 13: DiaClon AB0/Rh (Bio-Rad) identification card. Each card gives the result for up to two different samples. From left to right: erythrocyte agglutination in wells 1 and 6; erythrocyte deposition in wells 2, 3, 4 and 5. Result: sample 1 (left) - type A/Rh positive; sample 2 (right) - type O/Rh+. 52

Figure 14: MES SQA-V GOLD from BioLab and Qwick Check strips. 55

Figure 15: Micrographs of sperm. 1) Normal spermatozoa; 2) Abnormal head and irregular intermediate piece; 3) Abnormal piriform head and irregular intermediated piece; 4) Abnormal round head. 5) normal head, thick abnormal intermediated piece and looped

abnormal tail; 6) Abnormal head, normal intermediate piece and abnormal looped tail; 7) Normal spermatozoa; 8) Normal head and intermediate piece and abnormal double tail. 58

Figure 16: Laboratory results of clinical case protein electrophoresis..... 62

Figure 17: Scheme of an immunochromatographic test..... 73

Figure 18: Flow cytometry scheme..... 80

Figure 19: Example of scattergram on RET channel..... 81

Figure 20: Example of scattergram on DIFF 6 channel..... 81

Figure 21: Example of scattergram on RET channel..... 82

Figure 22: Example of scattergram on WBC/BASO channel..... 82

Figure 23: Schematic diagram of an HPLC unit. 1) Solvent reservoir; 2) transfer line; 3) pump (with manometer); 4) sample injection; 5) column (with thermostat); 6) detector; 7) waste; 8) data acquisition system..... 84

Figure 24: Sandwich immunoassay scheme performed at ImmunoCAP™ 250 for the quantification of specific IgE..... 85

Figure 25: IIF Assay scheme..... 86

Figure 26: Scheme of an IFI assay using TITERPLANE technique..... 87

TABLE LIST

Table 1: Auto-analysers and searched parameters in the different fields of EXALAB's microbiology laboratory 7

Table 2: Other equipment of EXALAB's microbiology laboratory 8

Table 3: Culture mediums used in the bacteriology sector 11

Table 4: BioMérieux Vitek ®2 identification and antibiogramme cards. 12

Table 5: Parasites (trophozoites, cysts, oocytes, spores, adult forms, larvae or eggs, amastigotes and trypomastigotes) found in stool samples in the EXALAB laboratory parasitology sector 14

Table 6: Type of tubes used in LACSL blood collection point 23

Table 7: Haematology auto-analyzers and parameters of each one, in LACSL 25

Table 8: Examples of flags given by the Sysmex 4000i self-analyser and its procedure. 32

Table 9: Parameters done by Advia 1800 Chemistry System in Biochemistry sector on LACSL 39

Table 10: Parameters done by Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens) in Immunology/Endocrinology sector on LACSL 41

Table 11: Parameters done by ImmunoCap 250 in Immunology/Endocrinology sector on LACSL 43

Table 12: Researched antibodies against febrile antigens by MICROPATH® direct agglutination tests. 50

Table 13: Macroscopic characteristics assessed in the macroscopic examination of seminal fluid and normal values according to (8) 55

Table 14: Microscopic characteristics assessed in the macroscopic examination of seminal fluid and normal values according to (8) 56

Table 15: Clinical case laboratory results, from hematology sector 61

Table 16: Clinical case laboratory results, from biochemistry sector 62

Table 17: Clinical case complementary tests..... 63

Table 18: Community-acquired urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria 68

Table 19: Health-care associated urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria..... 70

Table 20: Urine obtained from an intermittent urethral catheter, by pyelostomy, by ureterostomy, by cystoscopy or by suprapubic aspiration..... 72

Table 21: PANTHER ® culture and incubation criteria for different human samples in EXALAB Microbiology sector 74

Table 22: Reagents and immersion times of Hemacolor® staining kit 83

Table 23: Results of Hemacolor® staining kit..... 83

INTRODUCTION

Currently, a clinical analysis laboratories represent a key element in health services. Their contribution in medicine is essentially based on the evaluation of numerous clinical parameters to help on the diagnosis and monitoring of a disease. The evaluation of these parameters in a clinical analysis laboratory is made by using various analytical methods, distributed among several disciplinary areas such as Clinical Chemistry, Immunology, Hematology, Microbiology, among others. It is the responsibility of the health professional not only to provide the requested clinical information but also to guarantee the quality of the services provided and to hold the knowledge concerning the critical interpretation of the results.

This internship established the initial contact with the reality associated with the routine in the laboratory and allowed me the acquisition of theoretical and practical skills related to the analytical techniques and equipment used, as well as the application of the theoretical fundamentals taught in the different disciplines throughout the Master's Degree and its consolidation with the professional activity.

The internship described in this report took place in two different clinical analyses' laboratories. The Microbiology sector was done in the core laboratory of Medical Biology Laboratory of EXALAB in the region of Le Haillan, Bordeaux, France and the internship on Clinical Chemistry, Immunology and Hematology was done in Laboratory of Clinical Analyses S. Lázaro (LACSL) in Braga, Portugal.

GENERAL INFORMATION ABOUT THE INTERNSHIP

SCHEDULE

The schedule of the internship was different according to each sector, as shown below, to allow the intern to be present at the different stages of the analysis, from blood collecting point to the validation of the result.

Sector	Working hours
Blood collecting point	8 a.m. – 4 p.m.
Hematology	8 a.m. – 4 p.m.
Microbiology	8:30 a.m. – 3:30 p.m.
Biochemistry	8 a.m. – 4 p.m.
Immunology	8 a.m. – 4 p.m.

INTERNSHIP SUPERVISION AND MONITORING

The supervision of interns was done on a daily basis by the laboratory director that is also the trainee's coordinator and by one person appointed responsible for each section (referred as tutor). Urgent issues could be reported to the internship coordinator whenever is required. A progress report of the internship was submitted by the tutor to the master's degree administration at the end of the internship.

PART I

CHARACTERIZATION OF THE LABORATORY - EXALAB

EXALAB is one of the 4 subsidiaries of The LABEXA group, along with LBA, ACCOLAB and SEALAB and they are all located in the South West of France. EXALAB is an independent medical biology group, with a strong regional footprint that has around 900 employees, including more than 100 biologists (specialists in laboratory medicine). The main laboratory is located at "Rue de Morandière, 33185 Le Haillan, France" but there are 90 blood collecting points all over the city of Bordeaux. This internship was conducted at the main laboratory.

On a structural level, the clinical pathology service consists on a large building (LH2 building) reserved for the sections of Clinical Chemistry / Immunochemistry, Immunology and Hematology, together with the space for receiving and screening samples; and an area reserved for the Microbiology (LH1) section, that has its own entrance to receive and screen samples as well. In addition to the laboratory space, there is service director's office, engineering and human resources and, in each building, a room reserved for laboratory employees, a washing room, a warehouse, an accountability office, an IT office and a space for storage all the reagents.

The samples arrive on the core laboratory from the blood collecting points and from the laboratories of some hospitals. The reduced frequency of determination of analytical parameters does not justify the laboratories of these hospitals to have the necessary equipment or reagents to perform the tests. After being transported to the main laboratory, the samples enter the data base of the computer system by barcode reading, to be properly separated and distributed among the different sections, since each section works almost exclusively with its own samples.

The Laboratory Information System (LIS) used by EXALAB is AD Lab which links the information at hospital level. This system is responsible for processing the analytical data generated at laboratory level through its communication with the laboratory's self-analyzers and allows the employees to intervene in the various routine tasks, namely the entry of samples into the system, the preparation of work lists with the tests to be performed, the obtaining of lists with the pending tests and the visualization of the results obtained for subsequent validation, repetition or rejection. This system also enables quick and simplified access to the history of the parameters evaluated for each patient, thus acting as an extensive database available to the operator for consultation at any time. Then, each sector has its own middleware linked to AD Lab software, that will be appointed later.

PRE-ANALYTICAL PHASE

The reception of the patients on the blood collecting point or on the hospital's laboratory is the first point of contact with the patient. This is where the patient registration is made, as well as the explanation and verification of the conditions necessary to perform the analyses (fasting, time of harvest, duration of the procedure and other directions and restrictions). It is important to understand whether the user includes all these conditions to ensure that appropriate samples are obtained.

It is at this point of the reception that each patient is assigned a bar code with a specific internal reference that is going to be added on the database software and that is going to follow the patient's samples throughout the whole process until results are obtained. This code bar has information about name, gender, age, date of birth, process number, episode, place of collection, date of collection, type of sample and respective processing code of each patient. After registration, the patient is directed to a collection room where the technician skilled in collecting blood obtain the necessary samples for the required analyses.

The blood samples are collected for tubes that have a universal color system. Feces and urine samples are collected by the user, while exudates and other types of samples of more specific biological material are taken by technicians or by the specialists in clinical analysis. From this stage onwards, each item is uniquely identified, with a self-adhesive label containing all the necessary information according to database registration.

After this, the samples are transported to the core laboratory, to start the analytical phase.

ANALYTICAL PHASE

The analytical phase starts when the samples enter the laboratory. They go through a screening process to assess whether they have the necessary conditions for analysis or not. The samples are rejected if: a) the tube is not suitable for the required analysis; b) the sample has a clot; c) sample destroyed/changed during harvesting or transport; d) the package is in poorly state; among other situations. When a sample is rejected a new sample is requested and it keeps the identification of the first sample.

1. MICROBIOLOGY

The Microbiology section is mainly reserved for the isolation of pathogens from several biological products (figure 1), their identification and evaluation of their susceptibility to antibiotherapy within the clinical context using different methods and machines. This section is divided into bacteriology, parasitology and molecular biology.

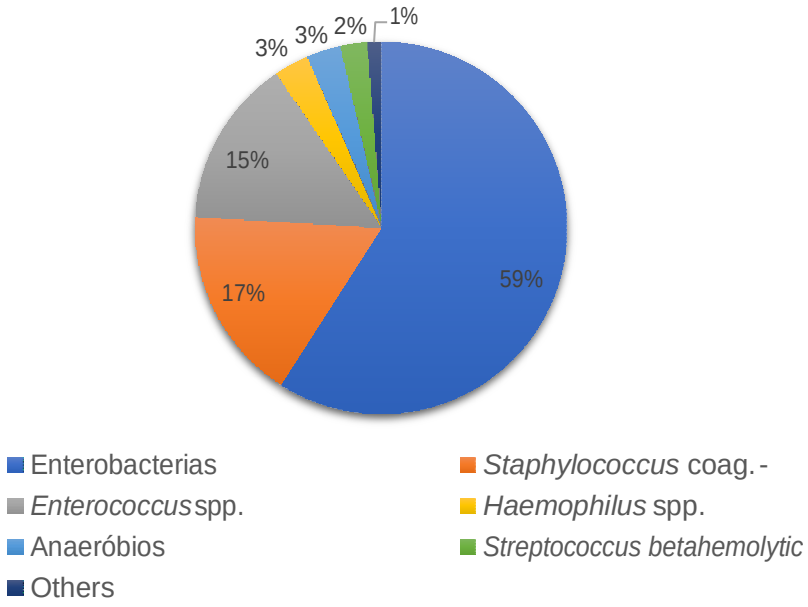


Figure 1: Distribution of the microorganisms found in all types of samples. Epidemiology report from 2019.

Unlike the other sections, this is an area with a very predominant practical component and the interpretation of every step is done with the aid of the guides of SPILF (French Society of Microbiology). Despite this, the laboratory has several equipment and self-analyzers for daily routine, summarized on tables 1 and 2.

At the end of the internship in the microbiology sector, I was able to select appropriate media for different clinical specimens; to process the samples for isolation of pathogenic microorganisms; to identify microorganisms encountered in the clinical laboratory; to differentiate between normal flora microorganisms and pathogens; to interpret antimicrobial sensitivity patterns and to apply methods of sterile techniques in the laboratory between every step.

Table 1: Auto-analysers and searched parameters in the different fields of EXALAB's microbiology laboratory.

Autoanalyzer	Quantity	Function/Parameters
Bacteriology		
BioMérieux Vitek®2	3	Identification of microorganisms and antibiograms. After isolation of the primary microorganism, handling is minimized with a simple standardized inoculum. The inoculum is placed in the VITEK®2 Smart Carrier cassette Station™, where the VITEK® 2 card and sample are virtually associated. Once the cassette is inserted, incubation and reading of each card is managed by the system.
BioMérieux PREVI® Isola	3	Agar plate inoculation system with the capacity for 180 plates (90mm) per hour.
BioMérieux BACT/ ALERT® 3D	5	It is a colorimetric method on culture media that provides the detection of presence or absence of microorganisms in blood and sterile body fluids. The specialized liquid emulsion sensors, found at the bottom of each culture flask, visibly change color when the pH changes due to the increase in CO_2, as it is produced by microorganisms. The system measure the color every ten minutes and analyze changes. Sophisticated algorithms, including a unique "threshold" algorithm, ensure early detection of microorganisms. Even if the transport of the bottles is delayed, the visual color change helps you to potentially identify positive bottles before introducing them into the system. In this way, it guarantees the accurate detection and rapid recovery of microorganisms from various types of samples.
IQ 200– Urine Microscopy System	3	Isolation, identification and characterization of urine particles on screen by digital flow morphology

		technology using Auto-particle Recognition (APR) software.
Molecular Biology		
PANTHER®	1	Molecular biology system for detection of RNA of some microorganisms associated with women's health and infectious diseases by PCR.
BD MAX™ System	1	It´s an automated molecular biology system that performs nucleic acid extraction and real-time PCR from plasmas, serum or neat urine, providing results for up to 24 samples across multiple syndromes.

Table 2: Other equipment of EXALAB's microbiology laboratory.

Equipment	**Quantity**	**Function/Parameters**
Incubator HettCube 600		Incubation of inoculated plates for microorganisms growth at 35.0ºC.
- Genital samples	1	
- Pus samples (24h)	1	
- Pus samples (48h)	1	
Incubator Heraeus Series 6000	2	Incubation of inoculated plates for anaerobic microorganisms growth at 35.5ºC.
Coldway Fridge	5	Preservation of samples at -2ºC.
	1	Preservation of samples at 5ºC.
Samples/Reagents conservation post	2	Preservation of samples and reagents at 4ºC.
Optical Microscope	4	Observation of slides as a tool to aid in clinical diagnosis.

1.1 BACTERIOLOGY

Bacteriology is reserved for manual inoculation procedures of biological products such as urine, on culture media (see table 3) and the stages involved in bacterial identification on blood and sterile fluids on BACT/ALERT® (figure 2); the interpretation of results obtained from bacterial growth on culture media on PREVI® Isola (figure 3); the performance of Gram and Ziehl-Neelsen stains; the interpretation of stained preparations through their observation under the optical microscope; and the execution of manual bacterial identification tests such as catalase, oxidase and coagulase. Identification of bacteria is done on Vitek® MS (figure 4) and antibiograms are performed on Vitek® 2 (figure 5) (see table 4 about Vitek® 2 cards).



Figure 2: BACT/ALERT®, withdrawal from (4).



Figure 3: PREVI® Isola, withdrawal from (3).



Figure 4: Vitek® 2 from EXALAB's Microbiology sector, taken by the author.



Figure 5: Vitek® MS from EXALAB's Microbiology sector, taken by the author.

1.1.1 URINE BACTERIOLOGY EXAM AND ANTIBIOGRAM

Urine samples are analyzed to see if the sample contains particles. If so, a dilution is made and the sample goes to IQ 200– Urine Microscopy System (figure 6) that looks for RBC (red blood cells), WBC (white blood cells), crystals, yeasts, and other particles.

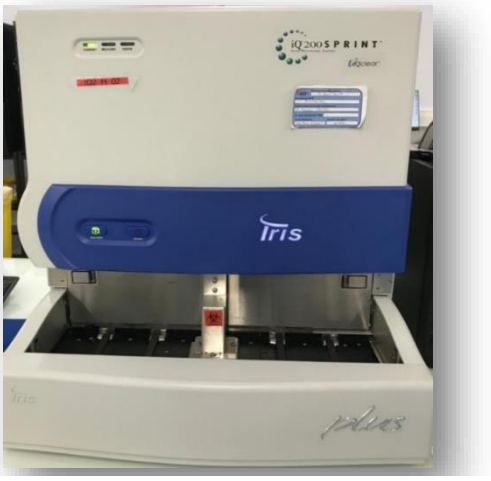


Figure 6: IQ 200– Urine Microscopy System, from EXALAB's Microbiology sector, taken by the author.

Every tube is forwarded to PREVI® Isola and every sample is cultured on CPS, or BCP medium, with the exception of samples which are for sediment analysis

only. The number of WBC will determinate which culture medium is chosen (CPS if > 10000 WBC and BCP if< 10000 WBC) and then, all plates go to incubation for 24 hours.

After this, the technicians "read" the plates according to an ECBU (cyto bacteriological urine exam) guideline (see appendix 1, 2 and 3) from SPILF (French Society of Microbiology) to do a presumptive identification of the present microorganism. If needed, the plates are analyzed on Vitek® 2 for identification of the microorganism and in some cases an ATB (antibiogram) is performed (see table 4 about Vitek® 2 cards). Whenever an ATB is required for a non-pure culture of bacterias, a new culture is made on a CPS medium, by streak and spreading methods to prove the veracity of the ATB. Sometimes, other tests such as catalase, oxidase and coagulase are performed to help on presumptive identification.

When there is no growth (zero colonies of bacteria) on a CPS medium, the sample will incubate for another 24 hours. When there is no bacterial growth (zero colonies) on a BCP medium, the sample is considered negative and it is discarded. This difference is based on the fact that BCP is a culture medium for samples with less than 10000 WBD recognized by IQ 200– Urine Microscopy System and in this case (<10000 WBC and no bacterial growth), it is assumed that there is no infection.

Table 3: Culture mediums used in the bacteriology sector.

Culture Medium	Sample	Observations
BCP Lactose Agar	Urine (<10000 WBC)	Non selective, unenriched and differential culture medium, comprising a pH indicator, bromocresol purple, that turns yellow if the lactose in the middle is used by bacteria lactase positive, by fermentation.
ChromID™ CPS ®	Urine (≥10000 WBC)	Chromogenic medium for the isolation, counting and direct or presumptive identification of microorganisms such as *E. coli*, *Enterococcus*, *Proteus* e KESC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.) group from urinary tract infections.

Table 4: BioMérieux Vitek ®2 identification and antibiogramme cards.

Identification cards	Antibiogram cards
GP – Identification card for Gram Positive bacterias, *in vitro*.	**AST – P631** for *Staphylococcus* spp.
	AST – ST03 for *Streptococcus* spp.
	AST – P606 for *Enterococcus* spp.
GN - Identification card for Gram Negative bacterias, *in vitro*.	**AST – N233** for bacillus Gram negative in any sample, except urine.
	AST – N372 for bacillus Gram negative in urine.
	AST – N240 for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.
NH **-** identification of *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., and other fastidious microorganisms at species-level.	**-**
ANC - identification of approximately 90 medically relevant anaerobic and coryneform bacteria, such as *Microbacterium spp.*	**-**
YST **-** identification up to 50 pathogenic yeasts at species-level, for example, *Candida albicans, Candida tropicalis, Cryptococcus neoformans* etc.	**-**

1.1.2 HEMOCULTURE, PRECIOUS LIQUIDS AND OTHER SAMPLES (EXCEPT URINE)

Hemocultures and precious liquids such as cerebrospinal fluid (CSF), pleural fluid, peritoneal fluid and synovial fluid, arrive in the microbiology laboratory, the samples are analyzed on BACT/ALERT® 3D (see table 1) and if they are positive for bacterial infection a culture is done on PREVI® Isola to start the identification process. This autoanalyzer chooses the culture medium according to each sample (see appendix 5). After incubation time (different for each specimen) at 35ºC ± 2ºC , the technician can do a presumptive identification of the present microorganism on Vitek® MS and an ATB on Vitek® 2 (see table 4 about Vitek® 2 cards). However, there are no Vitek® 2 cards for some

microorganisms and in this case other techniques are required. In this laboratory, there are three ways for detection of antibiotic resistance: 1) detection on Vitek® 2, that is a qualitative genotypic method; 2) E-Test (MIC), that is a quantitative phenotypic method and 3) confirmation of resistance by immunological tests, such as rapid diagnostic tests for in vitro identification of carbapenemase in bacteria culture (figure 7). After this, if there are still doubts about the antibiotics resistance, the samples are sent to The French National Centre for Scientific Research (CNRS) for further analyses.

When bacterias such as *Shigella* spp., *Salmonella* spp*., Yersinia* spp., *Escherichia coli* producing Stx 1 or Stx 2 and *Vibrio spp.* are found in these precious liquids, which should be sterile, a sample is inoculated in BIO-RAD Stock Culture Agar 63683, a designed medium for the maintenance of Enterobacteriaceae in small tubes, to be sent to "The Institut Pasteur" for further pathogenesis analyses.

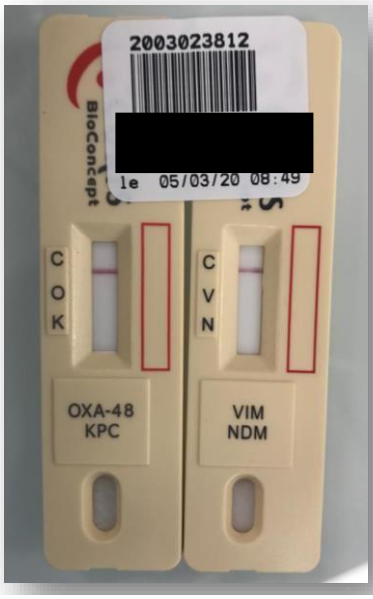


Figure 7: Immunochromatography test for the identification of OXA-48-like, KPC, NDM and VIM carbapenemases from cultures. Taken by the author.

1.1.3 GRAM STAIN

Gram staining is used to classify bacteria based on size, morphology and behavior towards dyes. In the clinical microbiology laboratory it is a complementary test to help (among other complementary tests) in presumptive identification when Vitek® MS fails.

A 0.5 McFarland dilution is made of the bacterial culture we want to get identification from and from this dilution, a slide which will be stained, is made. Interpretation of Gram stained swabs involve considerations related to with the characteristics of color, size, shape and grouping of cells. These characteristics can be influenced by several factors, including the age of the crop, the growing medium used, the incubation atmosphere and the presence of inhibiting substances.

1.2 PARASITOLOGY

Parasites can cause severe, life-threatening diseases for immunodeficient or immunosuppressed patients but many organisms reach a state of equilibrium with the host and produce no detectable pathogenic effects. Identification of parasites includes laboratory procedures to detect these organisms using primarily morphological criteria and visual identification, through culture and/or biochemical testing. Microscopic examination requires the analysis of clinical samples prepared using various magnifications and is usually performed by a biomedical specialist in parasitology.

During my internship in the parasitology sector, I found the parasites listed on table 5 in human stool samples.

Table 5: Parasites (trophotozoites, cysts, oocytes, spores, adult forms, larvae or eggs, amastigotes and trypomastigotes) found in stool samples in the EXALAB laboratory parasitology sector.

Infection site	Parasite
Intestinal tract (faeces)	*Ascaris lumbrioides* *
	Blastocystis hominis
	Cryptosporidum parvum
	Dientamoeba fragilis *
	Entamoeba histolytica *
	Entamoeba coli
	Endolimax nana *
	Fasciola hepatica *
	Iodamoeba bütschlii
	Giardia lamblia

	Strongyloides stercoralis *
	Taenia saginata *
	Taenia solium *
	Trichuris trichiura

Legend: * parasites found on positive Internal Quality Control (IQC) samples.

1.2.1 *CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA/ENTAMOEBA* COMBI DIAGNOSTIC

In addition to the observation of fresh slides, some parasites are also investigated by immunochromatographic tests (see appendix 4), such as RIDA® QUICK Cryptosporidium/Giardia/Entamoeba Combi. This is an immunological test to detect these three pathological parasites in feces samples. Every positive result is confirmed with a slide under an optical microscope. This test does not distingue the pathogenic *Entamoeba histolytica* from the non-pathogenic *Entamoeba dispar*, so when it is positive for *Entamoeba* spp., another immunological test is performed to tell these two parasites apart.

2 MOLECULAR BIOLOGY

Microbiology sector is also reserved for molecular biology used in the diagnosis and monitoring of infectious diseases by molecular biology technics. This sector was the one that I explored the least, because it was very automatized.

The auto-analyzer PANTHER® (figure 8) is programed to identify *Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis,* HSV 1, HSV 2**,** HPV 16 18/45, CT/NG and some infection disease microorganisms such as HIV-1 by PCR.

Also, the molecular biology sector is currently performing a study on the new variant of *Chlamydia trachomatis*, which was found in Finland last year.



Figure 8: Auto-analyzer PANTHER® from EXALAB's Microbiology sector, taken by the author.

POST-ANALYTICAL PHASE

The post-analytical procedures performed within the laboratory include the storage of clinical material; elimination of samples; verification of the clinical analysis' results; the input of information into the laboratory information system; and the communication to the clinicians.

This phase also includes the processes of interpretation of results and clinical decisions in relation to the reported result. A any dubious result is analyzed and then validated or not by the expert biologist of each field. Finally the biological waste treatment is also included in this phase.

QUALITY CONTROL

The quality control system must be complying with national and international standards, in order to constitute a normative reference.

Internal Quality Control (IQC) is indispensable for the detection of anomalies, evaluation of errors and their immediate correction. In the Clinical Pathology Service all the analytical parameters performed use the Internal Quality Control adapted to the specificity of each method. Calibration and control samples must be kept in accordance with the conditions indicated by the manufacturer and the period of validity must be respected. If the calibration is considered incorrect by the Westgard Rules, the laboratory must calibrate the equipment again and if it does not solve the problem, the technician must contact the manufacturer. Where not mentioned, freezing of aliquots obtained after reconstitution of freeze-dried samples is the responsibility of the specialist and must be validated internally. Samples or aliquots reconstituted from freeze-dried substances must have the date and time of reconstitution and expiry date.

All EXALAB laboratories and blood collecting points are accredited by COFRAC, which is a French company that assess and accredit laboratories on the basis of the European or international standards in force. In this case biomedical, anatomy and cytopathology laboratories by ISO 15189.

PART II

CHARACTERIZATION OF THE CLINICAL ANALYSIS LABORATORY SÃO LÁZARO (LACSL)

The technical management of the laboratory is in charge of Doctor Duarte Nuno Paiva (Pharmacist, Specialist in Clinical Analyses). The staff includes professionals with different backgrounds such as biochemists, technicians and some other pharmacists.

From Monday to Saturday, LACSL serves a network of 9 harvesting stations, provides home service and also receives and analyses samples from veterinary clinics. On average, the laboratory receives around 100 patients a day and around 150 samples from other blood collecting points. The laboratory has an agreement with the National Health Service and certain insurers health, and therefore provides service upon medical prescription or private request of the user.

On LACSL there is an harvesting unit (SL) and the remaining biological samples arrive from the follow harvesting stations: Amares (AA); Maximinos (MA); Montalegre (MT); Monsul (ON); Póvoa de Lenhoso (PL); Real (QS); Vieira do Minho (VS) and Vila Verde (VV).

In the central unit of the laboratory several analyses are performed in the areas of Hematology, Biochemistry, Immunology, Endocrinology, Serology and Microbiology. These are routine analyses, to monitor treatments and control the evolution of the clinical status of the users. For more specific analyses, LACSL counts on the support of SYNLAB – Medical Genetics and Cerba International Laboratory (Barcelona). The quality of service and results is ensured by the IQC programme and by national and international External Quality Assessment (EQC) programmes.

The central laboratory has the following infrastructures: two receptions and waiting rooms, the administrative area, several offices where the collections are made, a warehouse, a cold chamber, a sterilization room and the spaces of the different laboratory areas. The administrative area uses the Edeia-lab computer system, that allows the optimization of communication and transfer of information, since patients attendance, to the execution of harvests, validation of results, emission of bulletins and invoicing.

The organization and management of hazardous and non-hazardous waste are carried out according to the Ministry of Health's Order no. 242/96. t is extremely important to avoid contamination environmental and not pose a risk to the

population, so LACSL complies with the principles and standards of safety, security and hygiene established in legislation for Clinical Analysis laboratories, for the purpose of ensure the safety and welfare of laboratory professionals and users. The treatment of the waste III group (laboratory waste posing a biological risk - waste which is contaminated or suspected of biological contamination), such as disposable material used during the course of the analytical process and biological products analysed; and group IV (specific waste whose elimination is compulsory), such as cutting and perforating materials (needles, scalpels and catheters) chemical and drug products, among others, is made by the Ambimed ®. This is a licensed waste management company hospital which provides the operations/services/products legally suitable for packaging, collection, transport and treatment of hospital waste, by the decree-Law No. 73/2011, of 17 de June and other applicable legislation.

The laboratory is certified by ISO 9001/2015. ISO 9001 certification helps organizations develop and improve performance by demonstrating high levels of quality when offering their contract proposals. Certification occurs after successful completion of an ISO 9001 audit and enables the organization to operate more efficiently, complying with legal and regulatory requirements.

The clinical pathology service is properly equipped with a set of several auto-analyzers for the execution of the tests that are requested in the routine.

PRE-ANALYTICAL PHASE

The first contact that patients have with the LACSL is on the reception, when the receptionist opens their files and insert the requested analyses on the system. This will create a barcode with an identification number associated to each patient information, the result the date/time of entry of the requisition and the initials of the harvesting post, which will track all the user's samples. This information is important to assist the technicians on the harvest point, and to avoid errors throughout the analytical process.

As explained on part I of this report, if the samples that arrive on the laboratory are not suitable for examination, they are rejected. The samples are rejected if: a) the tube is not suitable for the required analysis; b) the sample has a clot; c) sample destroyed/changed during harvesting or transport; d) the package is in poorly state; among other situations. When a sample is rejected a new sample is requested and it keeps the identification of the first sample.

3 HARVEST

3.1 BLOOD

The preparation of the patient for the collection, the time of collection and reception of samples are very important steps for the success of the analytical and post-analytical phases. At the time of harvesting, the requisition and the user's preparation conditions must always be checked by the technician (for example, if the patient respected the fasting time required for the analysis), because several analytes suffer physiological changes throughout the day, depending on the conditions under which they were harvested. For this reason, harvest must be carried out under aseptic conditions and with sterilized material, in order to prevent contamination with the saprophytic microbiota of the user and/or bacteria present in the environment. On LACSL, the process of phlebectomy follows the World Health Organization (WHO) rules (9).

During my time in LACSL, I had the possibility of carrying out some harvests, always with the supervision of a technician or an analyst responsible for the sector during each

week. Venous blood collection was the only invasive procedure I was allowed to do during the internship.

Patients are called to the collection room and personal information (name and date of birth) is confirmed before collection. In general, the sample is taken by puncturing an antecubital vein by intermediate of a vacuum system for the required number of tubes, depending on the analytes to be tested. The withers should be applied in the shortest possible time and relieved as soon as the blood starts to flow into the tube. This practice avoids the venous stasis responsible for changes in the cellular counts and the pressure applied with the withers should not be excessive to avoid hemolysis of the samples (10).

The anticoagulants used are:

- EDTA (trypotassic salt) – use for hemogram (CBC) purposes because it is coagulant that preserves the best the morphology of cells; and also used for the determination of the speed of sedimentation;
- Sodium citrate - used for the hemostasis tests - acts by bonding with the ions of calcium (Ca^{2+}), preventing its availability of activation of the clotting cascade;
- Lithium heparin – to inactivate the blood-clotting factor thrombin and factor Xa. Also used to coat capillary blood collection tubes. Usually inappropriate anticoagulant for many hematology tests (1).

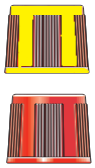
To avoid pre-analytical mistakes, it is important to follow the next recommendations:

- One person (the health professional) should perform the whole process inherent to the harvest, sequentially and without interruption;
- The amount of blood to be taken varies with the analyses requested, so in tubes with anticoagulant it is important to respect the filling mark to maintain the sample/anticoagulant ratio. This is particularly important in samples for coagulation studies;
- If it is necessary to use several different tubes, the recommended collecting order is: blood culture, dry tube (e.g. biochemistry), tube with citrate (e.g. coagulation study), tube with heparin (e.g. determination of Ca^{2+}) and finally, the tube with EDTA (e.g. CBC). This will avoid possible contamination with anticoagulants.

More information about the tubes used in harvesting are shown in table 6. After collection, the samples are checked in and distributed among the different clinical areas.

On LACSL, blood samples are also collected for other tests such as: a) oral glucose test to diagnose type II or gestational diabetes and b) prenatal screening.

Table 6: Type of tubes used in LACSL blood collection point.

Cap Color	Volume (mL)	Ratio (anticoagulant/sample)	Tube contents /Anti-coagulant	Sample	Applications
	2	1:9	Sodium citrate 3.2%	Plasma	Clotting tests
	5	-	Clot activator + Separation gel	Serum	Biochemistry and immunology requests
	**4**		EDTA K3	Whole blood	Hematology request
	4	1:5	Lithium heparin	Plasma	Biochemistry request
	6	-	Dry tube	Serum	Biochemistry request

3.2 GLUCOSE TOLERANCE TEST

The glucose tolerance test, also known as the oral glucose tolerance test, measures the body's response to sugar (glucose). It can be used to screen for type 2 diabetes. It can be also used, as modified version, to diagnose gestational diabetes — a type of diabetes that develops during pregnancy.

At the LACSL, patients who take this test do a first harvesting of venous blood (they can take blood for other tests if required) with 8h of fasting and, after drinking a 75g glucose solution (TopStar da TopLabs), a blood sample is taken again after 2 hours. In case of gestational diabetes control, the pregnant woman takes three blood samples: one at fasting, one after 1h and the last one 2h after drinking the glucose solution.

3.3 PRE-NATAL SCREENING

As during pregnancy, DNA fragments from the baby circulate in the mother's blood, fetal DNA can be detected from the 4th week of pregnancy, increasing concentration in the following weeks. The pre-natal screening can be done from the 10th week of pregnancy because the fetal DNA to perform the test accurately using a simple maternal blood sample.

LACSL also collects blood for prenatal screening. The TRUST kit from GENETYCA-ICM (Institute of Cellular and Molecular Studies - Portugal) is used and it is then sent to an external laboratory, where the result is liberated.

3.4 OTHER ORGANIC PRODUCTS

There are other biological products such as urine and faeces that are collected in the laboratory for analysis in the Microbiology sector. However, as part II of my internship did not go through the Microbiology section, those harvests will not be addressed in this report.

ANALYTICAL PHASE

The process of the samples starts after their information have been entered in the system. As most of the devices are connected to computers it is possible to transfer real-time results from the analyzers to the computer system.

In the Biochemistry and Immunology/Endocrinology sectors of LACSL, the increase in efficiency and productivity is ensured by WorkCell (Siemens), an automated chain of serum distribution, that brings together ADVIA 1800 (Siemens) and ADVIA Centaur XP devices (Siemens).

To ensure the effectiveness of laboratory work, LACSL is also equipped with several microscopes (optical and fluorescence), centrifuges machines, a laminar flux chamber, a vortex and a manual blood cell counter.

If there are requests for tests that are not performed in the laboratory, the samples are separated, chilled or frozen, and sent to external laboratories, CERBA and SYNLAB.

4 HEMATOLOGY

Hematology is the section of the laboratory responsible for the study and clinical evaluation of blood cells, the mechanisms of hemostasis and coagulation, specific hemoglobin's and the rate of sedimentation.

On the structural level, this section presents an area destined the study of hemograms, which has an auto-analyzer, a bench for the carrying out the coagulation tests, which also have an analyzer for this purpose, a bench with the optical microscope that is also used for manual preparation of peripheral blood smears and coloration and the equipment used for determining of specific hemoglobin and sedimentation rate.

The samples evaluated in this section are whole blood, collected with an anticoagulant in the specific proportion of the test to be carried out, with the exception of the samples intended for the hemostasis, which are previously centrifuged to obtain the plasma fraction that is going to be analyzed, in order to eliminate all the interference from suspended cells in the plasma, in particular the platelets. Anticoagulants contained in the collecting tubes are shown in table 6.

In Hematology, studies conducted using whole blood samples are: hemogram (CBC) with platelet/reticulocyte count; erythrocyte sedimentation rate and the analysis of the glycated hemoglobin. In blood coagulation tests, plasma samples are used and the interpretation of results is performed through the times of prothrombin and thromboplastin. The self-analyzers and equipment used to perform these examinations are summarized in the table 7.

Table 7: Haematology auto-analyzers and parameters of each one, in LACSL.

Autoanalyzer	**Function/Parameters**
Hematology	
Sysmex® XT-4000i™	Blood analyzer.
ADAMS A1c HA-8160	Determination of glycosylated hemoglobin a1c and a1.
VES- MATIC Cube 200	Determination of sedimentation rate.
Sysmex® CA-600 series	Coagulation tests.

4.1 CBC WITH PLATELET COUNT

The CBC (figure 9) (erythogram, leucogram and platelet count) is performed from blood samples collected in a tube with K3-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). This anticoagulant preserves cellular morphology by acting as a chelator, when together with Ca^{2+} ions. The samples are processed automatically by Sysmex XT-4000i (figure 10). This system uses fluorescence flux cytometry and hydrodynamic focus technology to count and differentiate the constituents present in whole blood, allowing to consistently classify normal populations of leukocytes, erythrocytes and platelets, differentiating them from abnormal populations.

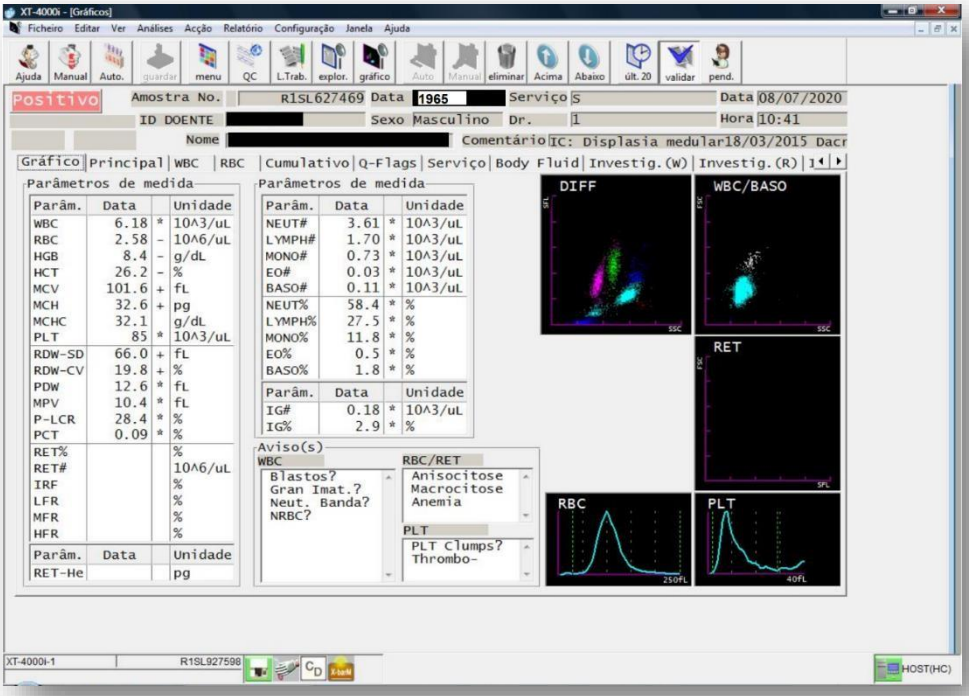


Figure 9: Example of a positive (with abnormal values) CBC performed by Sysmex XT-4000i, with flags and scattergram for each channel. Taken by the author.

The differentiation between the different cell types is ensured by the distribution of the samples in the different counting chambers together with the addition of specific reagents. Leukocytes and reticulocytes are analyzed by optical detection using the fluorescent flux cytometry method, with a semiconductor laser. The erythrocytes count are analyzed by the hydrodynamic focus method and platelet count is done by fluorescence (PLT-O) and impedance(PLT-I), which improves accuracy in very low and very high platelet counts.



Figure 10: Auto analizer Sysmex XT-4000i. Withdrawn from (2).

RBC (RBC/PLT CHANNEL – HYDRODYNAMIC FOCUS)

The erythrocytes are the most numerous figurative elements in circulation, have no nucleus and have an average diameter of 7.5 micrometers (µm). They have a biconcave disk shape, which facilitates gas exchange and mobility through small blood vessels. The main component of the erythrocyte is haemoglobin, a pigmented protein responsible for the transport of oxygen to tissues and the return of carbon dioxide from tissues to the lungs.

The erythrocytes are analyzed by the erythrocyte detector, using the method of hydrodynamic focus. Each cell passes through an isolated direct current, which generates a small pulse due to the increase of impedance. The height of the pulse is proportional to the volume of the cell and also provides information on the number of erythrocytes. The hematocrit corresponds to the percentage of total blood volume that is composed of erythrocytes and it is calculated based on the volume measured by the direct tidal detection method. Since the pulse height of each red cell is proportional to the volume of each cell, the hematocrit value is generated by the heights of the cumulative pulses of all erythrocytes. The Mean Corpuscular Volume (MVC) and Red

Cell Distribution Width (RDW) are determined by calculation. The MVC (in phentoliters - fL) is calculated by dividing the hematocrit by the number of red cells. The RDW is derived from the analysis of pulse height and can be expressed as the standard deviation (fL) or as the coefficient of variation (%) of the volume measurements of the red cells.

The hydrodynamic focus forces all the cells to pass through the central path of the detection hole, which prevents the formation of distorted pulses that do not correspond to a true cell volume. This way, the hydrodynamic focusing method provides a more precise measurement of the volume distribution of the erythrocytes.

HGB (HBG CHANNEL – SLS-HB METHOD)

A haemoglobin molecule is formed by four globin chains, each with a heme group attached to a Fe^{2+} molecule. One haemoglobin molecule can carry up to four oxygen molecules. From 3 to 6 months of age, hemoglobin A (Hb A) is dominant and consists of four polypeptide chains α2β2. However, there are also small amounts of fetal hemoglobin (Hb F) (α2γ2 chains) and hemoglobin A2 (Hb A2) (α2δ2 chains) in adult blood.

The method used by Sysmex for the determination of haemoglobin is sodium lauryl sulphate (SLS), free of cyanide. The chemical reaction begins by altering the globin and then oxidizing the haeme group, so the SLS' hydrophilic groups can bind to the haeme group and form a stable, coloured complex (SLS-HGB), which is analyzed using a photometric method. An LED sends out monochromatic light and by moving through the mixture light is absorbed by the SLS-HGB complexes. The absorbance is measured by a photo sensor and is proportional to the haemoglobin concentration of the sample.

Absorption photometric methods are usually influenced by the turbidity of the sample itself. In blood samples, turbidity can be caused due to lipaemia or leucocytosis. By using the SLS-HGB method these interferences can be minimized due to the effect of the reagent. The haemoglobin is analyzed in a separate channel, minimizing the interference of high concentrations of leukocytes. The determination of hemoglobin concentration is done after erythrocyte lysis and analyzed by spectrophotometry (2).

Mean Corpuscular Hemoglobin (HCM) and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (CHCM) are parameters obtained through calculation. The HCM (in picograms - pg) is derived from the quotient of haemoglobin and the number of

erythrocytes and the HCM (in grams per litre - g/L) is obtained by dividing the haemoglobin by the hematocrit.

PLT (RBC/PLT CHANNEL – HYDRODYNAMIC FOCUS)

The platelets are small cells (2 to 4 µm in diameter) and contain granules. The platelet count is performed in the same channel, by the same methodology applied in erythrocyte analysis (hydrodynamic focusing method with direct detection). However, platelets can also be analyzed by an optical method on RET channel, after being marked with a fluorescent dye. When the number of platelets is reduced, the optical count allows to improve the accuracy and precision of the analysis. Platelet indices, such as the average platelet volume and the Platelet Dispersion Index (IDP/PDW) are also determined by calculation.

WBC (DIFF 6- CHANNEL - FLOW CYTOMETRY)

The leukocytes are the main components of the body's defenses. Although they are less numerous than erythrocytes, leucocytes are larger and the only figurative elements that have nucleus and organelles.

The Sysmex XT-4000-i differential leucogram allows the individual quantification of leukocyte subpopulations: lymphocytes, granulocytes (basophils, eosinophils, neutrophils) and monocytes, and also the counting of immature granulocytes. This method makes it possible to reliably differentiate between normal and abnormal populations.

The determination of the leukocyte formula is based on the flow cytometry technique (see appendix 6), using a semiconductor laser.

The WBC channel measures: a) the lateral dispersion of light, that provides information on of the internal structure of the cell; b) the frontal dispersion, that indicates the size of the cell and c) the intensity of fluorescence, which gives information about the nucleus (DNA and RNA concentration). In another channel, lysis occurs in all cells except basophils. Thus, basophiles can be differentiated from the other leukocytes by the dispersion of frontal and lateral light, because they have denser granules that increase the dispersion of light.

WBC/BASO CHANNEL (FLOW CYTOMETRY)

The WBC/BASO channel differentiates basophiles from the other leukocyte cells, using forward scatter and side scatter signals. An hemolytic reagent with acid pH causes lysis and reduction in volume of erythrocytes, platelets and white cells except basophils. Thus, the leukocyte count results from the sum of basophils and unprotected nuclei.

RET CHANNEL (FLOW CYTOMETRY)

The RET channel differentiates the reticulocytes in circulation. The reticulocyte count is more accurate because there is no interference in the analysis by nucleated cells such as leukocytes, erythroblasts and cytoplasmic inclusions (such as Howell-Jolly's corpuscles) since these have higher fluorescence intensity. The very young reticulocyte population is also analyzed and reported by the IRF (Immature Reticulocyte Fraction) parameter providing information on spinal cord activity.

IMI Channel (RF/DC)

The Sysmex XT-4000-i is equipped with an immature myeloid information channel (IMI) where cells from the immature granulocytic series, that are usually not in circulation in peripheral blood, are selectively detected. This channel uses radiofrequency and direct current (RF/DC) as the detection method and explores the difference between mature and immature granulocytes.

The blood sample is aspirated, diluted (1:250) and sent to the detection chamber. Inside, there is a small orifice flanked by two electrodes where direct current (DC) and radio frequency (RF) pass through. The cells suspended in hemolytic reagent pass through the orifice, altering the chains. The size of the cells will alter the DC while RF is altered by the structure and cell density. These changes are detected and recorded in the form of pulses electrical. Thus, given the amplitude of each impulse, the detector combines methods in order to form a scatter plot, reflecting the size and cell density

simultaneously. These changes are detected and recorded in the form of electrical impulses, reflecting cell size and density simultaneously to form a scattergram.

NRBC CHANNEL (FLOW CYTOMETRY)

The NRBC channel differentiates the erythroblasts (NRBC) circulating in the peripheral blood using side fluorescence and forward scatter information. The hemolytic reagent with acid pH causes a reduction in the volume of red blood cells and platelets, and partial lysis of the leukocyte membrane. The erythroblast membrane is hemolyzed leaving only the nucleus. A second reagent, with dye fluorescent polymethine, stains white cell nucleic acids and erythroblasts. Thus, based on the differences in fluorescence intensity, two different populations will arise. Since leukocytes have a greater amount of genetic material, this channel allows the separation of leukocytes and erythroblasts in a reliable way. Consequently, leukocytes will send greater side fluorescence sign than erythroblasts. The equipment is able to automatically correct the WBC and lymphocyte count when the erythroblasts are present.

4.2 CBC AND HISTOGRAM INTERPRETATION

The interpretation of a CBC and respective histogram, can help to establish the diagnosis; can be useful in the follow-up of treatment and is an indicator of good prognosis in the therapy of some pathological states. The result of a CBC is composed of an erythogram, a leucogram, platelets, reticulocytes and immature granulocytes.

The histograms are graphic representations of different cellular populations. These graphs also report the presence of subpopulations by comparing the patient's cell sizes with those of the normal population. In a homogeneous cell population the curve assumes a Gaussian distribution and deviations in one direction or another from the mean may be important for the diagnosis because they may indicate changes in cell number and morphology (1).

When the results obtained in Sysmex 4000i are outside the reference limits for any of the parameters, the self-analyser activates flags (table 9), the result is recorded in SIS (figure 9) and it may be necessary to repeat the analysis, as well as to study the blood smear. The result recorded in the SIS is used for comparison with previous results

of the patient and depending on these results, the abnormal value is validated or a new analysis is made.

Table 8: Examples of flags given by the Sysmex 4000i self-analyser and its procedure.

Flags	Abnormal values	Observations/Procedure
Anaemia	HGB<100 g/L	-
PLT agregation	-	Smear
RBC agregation	MCHC > 40 g/dL RBC ≤ 0,5 1012/L	Warm up the sample to 37ªC and repit the analyses
↑ HGB + Blurred sample	MCHC > 365 g/L	Falsely high HGB due to high lipids, proteins in plasma, high WBC. Probable causes: haemolysis, lipemia, RBC: cold agglutinins.
↓ HGB	RDW ≤ 15,0% MCV < 75fL	Smear
Microcytosis	MCV < 70 fL	-
Macrocytosis	MCV > 110 fL	-
Hypochromia	MCHC < 290 g/L	-
Thrombocytosis	PLT > 450 109 /	Pseudotrombocytosis: due to RBC fragments or extreme microcytosis. Smear
Thrombocytopenia	PLT < 150 109 /L	Possible platelet aggregation. Smear. Pseudothrombocytopenia: due to giant platelets or clusters of platelets.
Abnormal NRBC Scattergram	NRBC ≥ 1%.	Possible presence of erythroblasts. The presence of erythroblasts is confirmed and the WBC count corrected. There may be interference from fragile lymphocytes or lipid particles that may prevent a clear separation between the WBC and NRBC.
Abnormal Scattergram with Left Deviation	-	Possible presence of banded neutrophils or neutrophilia.

Immature Granulocytes	≥ 3%	Smear to confirm presence of immature granulocytes.
Lymphoblasts	HGB ≤ 11,5 g/dL	Lymphoblasts behave in the same way as mature leukocytes in relation to the IMI channel reagent. Therefore, the IMI channel will have a normal diagram and the 5Diff channel will have an abnormality in the area of separation between lymphocytes and monocytes.

4.3 THE MORPHOLOGICAL STUDY OF PERIPHERAL BLOOD

The morphological study of peripheral blood is performed whenever requested or due to unexpected changes in cellular counts and/or hematometric indices. Smear observation is important to evaluate the automatic counts and to detect or confirm clinical changes. The staining used for the microscopic observation of the figurative elements of the blood is of the Romanowsky type, based on alcoholic solutions with basic and acidic components. In this type of staining, it gives a typical color to certain cellular components and reflects the combined action of the staining contained in the dye at a pH between 6.7 and 7.0. The cell nucleus stains purple, the cytoplasm of blue and pink, and the different granules of other specific colors. The methylene blue is a basic dye that stains the nucleus and some cytoplasmic structures of blue or purple. These stained structures are basophilic structures, such as DNA and RNA. Eosin, in turn, is an acidic dye that stains some cytoplasmic structures of orange red. These stained structures are acidophilic, as is the case with some proteins. When both basic and acidic components stain a cytoplasmic structure it takes on the colour pink or lilac (1).

In LACSL, smears are manually prepared from whole blood samples in EDTA, which allows an even distribution of platelets. After fixation, the smear is stained by the Hemacolor® Kit (see appendix 8) which is based on the Pappenheim method. In this coloring, a basic dye (azure B) gives a blue or blue-violet colour to the nucleic acids, nucleoproteins and basophil/neutrophil/platelet granules. Also, an acidic dye (eosin Y) transmits a red color to hemoglobin and eosinophil granules. Eosin Y also contributes to the staining of the cell nucleus. When blood smears are visualized under the optical

microscope, the field is focused with the 10X objective and the erythrocytes, leucocytes, platelets and platelet aggregates are observed with the immersion objective (100X).

The peripheral blood smear is necessary in all cases of anaemia, as the observation of erythrocytes of different shapes (poikilocytosis) and sizes (anisocytosis), as well as abnormal cells (i.e. basophils with blue dots) may suggest a particular diagnosis. During my internship, I saw the flags presented on table 9.

4.4 GLYCATED HEMOGLOBIN DETERMINATION

HbA1c results from a slow and irreversible non-enzymatic reaction (glycation) between the circulating glucose in the blood and the free amine groups of hemoglobin chains β, present in the type A of hemoglobin. This parameter varies depending on the concentration of glucose to which red blood cells are exposed over their lifetime (120n days) so it is a more reliable result than the glucose dosage, which evaluates the glucose present at the time of harvesting. The glycated hemoglobin is thus an indicator of great clinical utility, reflecting the patient's average glycaemia in the last 8 to 12 weeks.

According to the General Health Management (DGS), the A1c hemoglobin (HbA1c) is routinely determined in all persons diagnosed with diabetes mellitus. This parameter is determined from whole blood. It can be used as a method to diagnose the disease when HbA1c >6.5%. For the diagnosis of diabetes, the value of glucose obtained from fasting venous plasma or the values of the oral glucose tolerance test should be preferred. However, the determination of HbA1c should be performed at least every six months in all people with diabetes.

4.4.1 AUTO ANALYZER ADAMS A1C HA-8160

On LACSL, the determination of HbA1c is performed on ADAMS A1c HA-8160, by the method of HPLC (high efficiency liquid chromatography) (see appendix 9) and the results are presented in percentage and in the form of a chromatogram showing the A1c, HbA1, HbF hemoglobin fractions.

As soon as the sample is introduced in the analyzer, the erythrocytes are hemolyzed and the elution reagents act on the hemoglobin. Hemoglobin fractions are

separated by electrostatic interactions with a column consisting of a material that allows ionic exchange. The results are based on color natural haemoglobin in the fractions, measured at a wavelength of 415 nm, as measured that elute in the column. The results are calculated from the peak areas of the different haemoglobin fractions and presented as a percentage of HbA1c.



Figure 11: ADAMS A1c HA-8160 for determination of glycosilated haemoglobin.

4.5 SEDIMENTATION RATE

The erythrocyte sedimentation rate (ESR) is an analytical, chronic and acute nonspecific inflammation parameter. Although not specific, it is a very sensitive test and it is the first disease indicator, when other chemical and physical parameters remain normal (11).

This parameter corresponds to the speed at which erythrocytes are separated from the plasma and aggregate under controlled conditions, in millimeter per hour (mm/h). RBCs typically fall at a faster rate in people with inflammatory conditions such as infections, cancer, or autoimmune conditions. These conditions lead to an inflammatory response with an increase in the number of proteins in the blood. The tissue injury (acute phase response) includes changes in the concentration of serum proteins: decrease in the albumin and increases of fibrinogen, haptoglobin, ceruloplasmin, and immunoglobulins and c-reactive protein. These changes causes red blood cells to clump and settle at a faster rate. On the other hand, factors that reduce ESR include increased blood viscosity, stiffness and morphological changes in erythrocytes. In conditions such

as polycythemia, hypofibrinogenemia and congestive heart failure, ESR is diminished (1).

4.5.1 AUTO ANALYZER VESMATIC CUBE 200

The ESR is performed from blood collected in tubes with K3-EDTA at the Vesmatic Cube 200. In this device, the inserted tubes are first agitated, remaining fterwards in a vertical position, allowing sedimentation to happen. Then, the device uses an IV ray sensor and calculates the difference in opacity of the blood column, making a temperature correction at the same time (temperature kept at 18ºC). The first reading is taken after homogenization of the sample. The optical reader rises vertically and measures the blood level before starting the sedimentation, detecting the opacity of the blood column in the tube. 20 minutes later it's made the last reading. This way, the result is given in approximately 20 minutes, using only the optical sensor, that reads the height of the erythrocyte column that sediments, avoiding the use of other consumables and reagents. The result will be extrapolated to a period of one hour of sedimentation and they are comparable to those obtained with the Westergren citrate reference method.

In hematology sector, when the tubes arrive for analyses, the ERS is the first parameter to be evaluated, since it doesn't consume any sample volume.

4.6 CLOTTING TESTS

The haemostatic system consists of keeping the blood in a fluid state while it remains in circulation in the vascular system; stopping the bleeding by the formation of a haemostatic buffer and ensuring the eventual removal of the buffer when healing is complete. The main components involved in hemostasis are platelets, blood vessels, the fibrinolytic system, as well as plasma coagulation factors and their inhibitors.

Blood clotting tests are done to adapt the dose of medication for hypocoagulated patients (usually warfarin) or to control blood clotting before and after surgical procedures.

4.6.1 SYSMEX® CA-600 SERIES ANALYZER

On LACSL, partially activated thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) are performed on Sysmex® CA-600 Series Analyzer. This equipment determines several parameters related to the plasma coagulation function, from optical detection of the formed clot. Increasing clouding during the formation of a fibrin clot is measured as an increase in the intensity of scattered light when the sample is exposed to light (λ=660 nm).

APTT evaluates the intrinsic pathway of the coagulation cascade and may be prolonged in a situation of coagulation factor deficiency I, II, V, VIII, IX, X, XI, and XII; use of heparin; disseminated intravascular coagulation or liver disease. It may be decreased in any situation of hypercoagulability. APTT values are expressed in seconds.

PT evaluates the extrinsic pathway from the factors dependent on vitamin K (II, VII, X), fibrinogen, and factor V. An increase in PT may be a result of a deficiency of these factors; a deficiency of the vitamin K itself or in result of anticoagulation therapies. PT values are expressed by the international standardized ratio (INR), but can also be expressed in seconds and percentage. INR is calculated from the quotient of the user's TP and a standard normal TP, elevated to the International Sensitivity Index (ISI) of the thromboplastin reagent in use. The ISI is a value predetermined by the manufacturer and corresponds to 0.99. The standard TP is 10.6 seconds and was established by LACSL, taking into account its population.

INR is widely used in monitoring the anticoagulant therapy: 0,8-1,2 being considered normal for a non-medicated individual, up to 3 for a patient in anticoagulant therapy, or up to 4.5 depending on the associated pathology (12).

5 BIOCHEMISTRY

The Biochemistry laboratory brings together Clinical Chemistry and Immunology/Endrochronology in one laboratory. Serum samples arrive essentially in gel tubes and urine. During the time in the section, it was possible to integrate in the routine by handling the different equipments, both in the processing of the samples and in their maintenance.

Serum and urine samples are processed in this section for monitoring of certain biochemical parameters, through the automated analyzer ADVIA 1800. Qualitative detection of drugs of abuse, such as cannabinoids, cocaine, opiates and amphetamines is performed by immunochromatographic urine tests on Sure Step™. The study of gases, electrolytes and metabolites in arterial blood is performed on EPOC® gasometry system (Siemens) and the determination of ionized calcium was the most required analysis on this equipment.

5.1 BIOCHEMICAL PARAMETERS DETERMINATION (ADVIA 1800 CHEMESTRY SYSTEM)

Advia 1800 Chemistry System is an automatic clinical chemistry analyzer for in vitro use that can perform tests on human serum, plasma or urine. The result of the reactions is obtained by spectrophotometry. The spectrophotometer measures the amount of light absorbed at 14 specific wavelengths by liquids contained in reaction cuvettes. Every six seconds, the reaction tray (RRV) moves cuvettes containing reaction liquid (sample and reagent) in front of a halogen lamp, which sends light through the cuvettes. Each time, a different wavelength is measured. The photometer then measures the absorbance based on the lamp energy and the optical density of the cuvettes. This process is repeated for as many times and wavelengths as required by the assay conditions.

This autoanalyzer also has an electrolyte analyzer (ISE) that measures the amount of sodium (Na), potassium (K), and chloride (Cl) in serum or urine samples through voltage measurement by ion-selective electrodes. The sample-dilution probe (DPP) aspirates the sample for electrolyte analysis. This analysis uses buffer as reagents. In a two-stage process, the buffer voltage is measured, then the sample

voltage is measured. The difference between these voltages, the reference voltage, and the temperatures of the liquids determine the concentration of Na, Cl, and K in the sample. The parameters analyzed by this equipment are listed on table 10.

Table 9: Parameters done by Advia 1800 Chemistry System in Biochemistry sector on LACSL.

Type of sample	Parameters
Serum Plasma Urine	**General Chemistry**
	Alanine Aminotransferase; Albumin (BCG); Alkaline Phosphatase (AMP); Amylase Aspartate; Aminotransferase; Bilirubin, Direct; Bilirubin, Total; Calcium (Arsenazo); Chloride Cholesterol; Creatine; Kinase Creatinine; Gamma-Glutamyltransferase (GGT); Glucose (Hexokinase); HDL; Cholesterol Iron; Lactate; Dehydrogenase (L-P); Magnesium; Microalbumin; Phosphorus; Potassium; Sodium; Total Protein; Total Protein, CSF/Urine; Triglycerides; Urea Nitrogen (BUN); Uric Acid;
	Specific Proteins
	Antistreptolysin O; CRP, Wide Range; Rheumatoid Factor; Transferrin;

6 IMMUNOLOGY AND ENDOCRINOLOGY

On LACSL, the Immunology/Endocrinology section, is highly automated, so my internship was mainly directed towards the theoretical foundations of the tests, the principles of operation of the equipment, its maintenance, calibration and internal and external quality control and interpretation of results obtained in the clinical and methodological context.

The Immunology/Endocrinology section, is equipped with three main equipment: Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens), mini-VIDAS® (BioMérieux) and ImmunoCAP 250 (Phadia). As the biochemistry and immunology/endocrinology sectors are located in the same physical space, auxiliary equipment, such as centrifuges, are shared by both sectors.

6.1 DETERMINATION OF IMMUNOLOGICAL MARKERS

6.1.1 ADVIA CENTAUR XP IMMUNOASSAY SYSTEM

Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens) uses chemiluminescence technology combined with direct immunoassay, using conjugate molecules generating chemiluminescence. Chemiluminescence is a chemical reaction that emits energy in the form of light. In general, luminescence is the emission of visible or near-visible (λ = 300–800 nm) radiation which is generated when an electron transitions from an excited state to ground state and the resultant potential energy in the atom gets released in the form of light. When used in combination with immunoassay technology, the light produced by the reaction indicates the amount of analyte in a sample (13).

The parameters done by Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens) in Imunology/Endocrinology sector on LACS are shown in table 10.

Table 10: Parameters done by Advia Centaur XP Immunoassay System (Siemens) in Imunology/Endocrinology sector on LACSL.

Type of sample	Parameters
Serum **Plasma** **Urine**	Anemia
	Ferritin; Folate; Vitamin B12
	Hepatitis
	HBc Total; HBs Ag; HCV;
	Allergies
	IgE, Total;
	Metabolic
	Cortisol;
	Oncology
	AFP; CA 125; CA19-9; CEA; Free PSA; PSA;
	Reproductive/Endrochronology
	AFP; DHEAS; FSH; LH; Progesterone; Prolactin; Testosterone;
	Thyroid
	Anti-TgII; Anti-TPO; Free T3; Free T4; Total T3; Total T4; TSH3-Ultra;
	ToRCH Syndrome
	Rub IgGII; Rub IgM; Toxo IgG; Toxo IgM;

Legend: HBc – antibody HBc; HBs – antigen HBs; HCV – Hepatytis C; IgE – Immunoglobulin E; AFP - Alpha Fetoprotein; CA – Cancer Antigen; CEA – Carcioembryonic Antigen; PSA - Prostate Specific Antigen; DHEAS - Dehydroepiandrosterone sulfate (androgen); FSH - Follicle-stimulating hormone; LH – Luteinizing hormone; TgII – Thyroglobulin II; TPO- Thyroperoxidase; T3 – Triiodothyronine (hormone); T4 – Thyroxine (hormone); TSH – Thyroid-stimulating hormone; Rub – Rubella; IgG – Immunoglobulin G; IgM – Immunoglobulin M; Toxo– Toxoplasmosis.

6.1.2 MINI-VIDAS® (BIOMÉRIEUX)

MINI-VIDAS® is a compact automated immunoassay system, based on the Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) (see appendix 10) principle, that combines the ELISA process with a fluorescent reading at the end, product of the interaction with the immunoglobulin-linked enzyme, which increases the sensitivity of the test, compared to ELISA.

This auto analyzer has a UV lamp (370nm) and an automated fluorescent reading (450nm) to recognize the fluorescence in each sample. MINI VIDAS® uses a ready-to-use single-dose reagent strip system. The Solid Phase Receptacle (SPR) is coated with specific antibodies, antigens and/or phage proteins and contains all the reagents necessary for the reactions to happen. It has a pipetting device to transfer the reagents in and out each cuvette and a wash is done between each step. This concept prevents any contamination between reagents or between samples. In addition, the absence of tubes, syringes and needles reduces system maintenance to a minimum.

The parameters done by Mini-VIDAS® in Immunology/Endocrinology sector on LACS are shown below.

Vitamin D	25-OH vitamin D3	HAV IgG/IgM
Ab anti-CMV IgG/IgM*	Toxo IgM*	Rub IgM*
Ab HIV*		

6.2 IMMUNOALLERGOLOGY

Immunoallergology is a form of hypersensitivity reaction that can also take the form of reactivity to self-antigens or to antigens of another species. These reactions can be classified, according to the mechanisms involved, into allergic reactions mediated by IgE, which may be atopic or non-atopic, and not IgE-mediated reactions (IgG-mediated or T cells, among other mechanisms).

The assessment of allergic reactions is often made by quantification of total IgE antibodies, since it allows the identification of allergic reactions mediated by this immunoglobulin. After this, in order to identify and differentiate the source of the allergic reaction, in the presence of an IgE-mediated allergic reaction, the next step at the

laboratory level consists of identifying the allergens involved by quantifying specifics IgE antibodies.

On LACSL, the samples that require allergenic studies of specific IgE are separated in aliquots (RASTS) in screening, to be forwarded to the self-analyzer ImmunoCap™ 250 (*Phadia*). The samples that require allergenic studies of total IgE are forwarded to Centaur XP. The antibodies appear in serum as a result of sensitization to a specific allergen and measurement of circulating IgE antibodies provides an objective evaluation of this sensitization. In general, low levels of IgE antibodies indicate a low probability of disease, while high levels of an antigen antibody reveal a strong correlation with disease.

6.2.1 IMMUNOCAP 250 (PHADIA)

The ImmunoCap 250 is an equipment designed for allergy testing for several categories (see table 12) and for testing of autoimmunity, covering the clinically relevant markers for the assessment of the most common autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, celiac disease and connective tissue.

The technology used is fluoroenzymatic sandwich immunoassay (ELFA) in which the well is coated with an antigen that is recognized by the target antibodies, representing the markers for a particular autoimmune disease. If these specific antibodies are present in the patient's blood sample, they will bind to the antigen. Then, a secondary enzyme-linkase conjugated antibody to the target antibody, bounds to the antigen. The enzyme transforms an added substrate into a fluorescent product. The comparison of the fluorescence signal with that of known concentrations make it possible to determine the concentration of antibodies in the sample.

Table 11: Parameters done by ImmunoCap 250 in Immunology/Endocrinology sector on LACSL.

Type of sample	RASTS / Parameters
Serum **Plasma**	Epidermal and animal proteins
	Cat dander; Dog dander;
	Mites
	Dermatophagoides pteronyssinus; Dermatophagoides farinae;
	Food
	Egg; Fish (*Gadus morhua*); Wheat (*Triticum aestivum*); Milk;
	House dust

	Greer Labs., Inc.
	Multi tests (Multi-RASTS)
	- Egg white, Milk, Fish, Wheat, Peanut, Soybean; - *Dactylis glomerata, Festuca elatior, Lolium perenne, Phleum pratense, Poa pratensis;* - *Penicillium chrysogenum, Cladosporium herbarum, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Alternaria alternata, Setomelanomma rostrate;* - *Olea europaea, Salix caprea, Pinus strobus, Eucalyptus spp., Acacia longifolia, Melaleuca Leucadendron*; - *Ambrosia artemisiifolia (A. elatior), Artemisia vulgaris, Plantago lanceolata, Chenopodium album, Salsola kali;*

6.3 SERUM PROTEINS ELECTROPHORESIS

Serum protein electrophoresis is an easy method of separating proteins based on their net charge, size, and shape. Electrophoresis had been widely used in clinical medicine for aiding in diagnosis of various clinical conditions like acute and chronic inflammations, among others, since under these conditions, the serum values of these proteins are usually altered (1).

By capillary electrophoresis six protein fractions with different relative concentrations are obtained: albumin (55.8% - 66.1%), α1-globulins (2.9% - 4.9%), α2-globulins (7.1% - 11.8%), β1-globulins (4.7% - 7.2%), β2-globulins (3.2% - 6.5%) and γ-globulins (11.1% - 18.8%).

On LACSL, the determination of serum protein by electrophoresis is carried out on Capillarys Sebia 2.

6.3.1 CAPILLARYS SEBIA 2

With the capillary electrophoresis method, serum proteins are separated according to its electrophoretic mobility with alkaline buffer with a specific pH, in tubes with a diameter of 100 µm.

- The sample is diluted with pH 9.9 buffer and injected by suction at the anionic (+) terminal of the capillary and an electric potential is applied across the capillary to start the protein separation through wards the cathode (-). For protein separation, the detection is made at 200 nm and fractions are detected in the following order: gamma globulins, beta-2 globulins, beta-1 globins, alpha-2globins, alpha-1 globulins, albumin, pre-albumin, with each zone containing one or more proteins;
- Proteins are detected directly and simultaneously in each capillary by absorption photometry at 200 nm, eliminating the need for staining and while improving accuracy and linearity. Once the electrophoresis has been completed, the results (figure 10) are verified and exported to the laboratory's computer system, ending with validation in the lab's computer system.

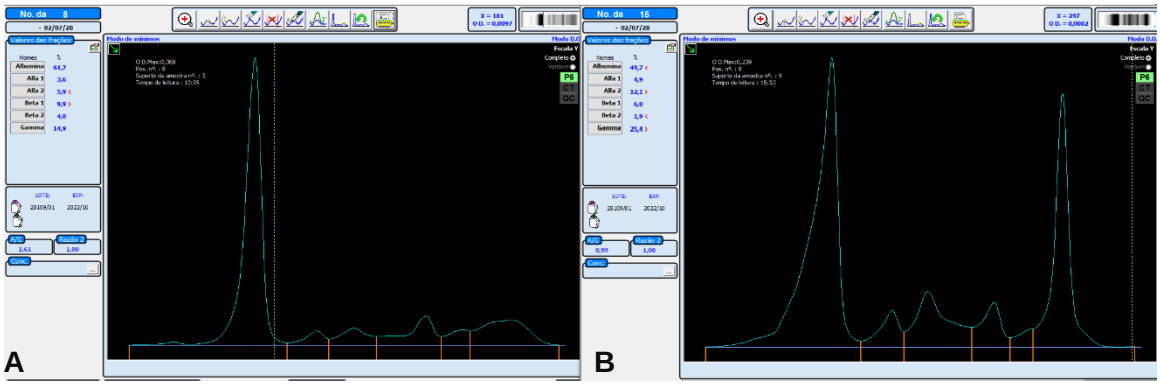


Figure 12: Protein electrophoresis results. A) Normal values; B) Abnormal values, with the monoclonal gamma-globulin protein band.

6.4 ARTERIAL AND VENOUS GASOMETRY

Gasometry allows the measurement of respiratory gas exchange and metabolic parameters of the patient in order to assess pulmonary performance. Thus, the gasometry test is an aid to the diagnosis and monitoring of lung, metabolic or renal diseases (the dosage of glucose, urea and creatinine) that may cause acid-base imbalance or respiratory difficulties.

Arterial blood collection is done in the radial artery only by a specialist. The arterial blood and venous blood samples are delivered in the biochemical sector, in the tube with lithium heparin for analysis of ionized calcium. The device used for this analysis is the EPOC® Blood Analysis System.

6.4.1 EPOC® BLOOD ANALYSIS SYSTEM

The equipment quantifies the parameters blood pH, partial pressure of carbon dioxide (pCO2), partial pressure of oxygen (pO2), sodium (Na+), potassium (K+), chlorine (Cl-), calcium (Ca2+), glucose, lactose, hematocrit (Hct), CO-oxymeter and other parameters derived by the analyzer, such as bicarbonate ion (HCO3 -). CO-oximeter evaluates the ability of the blood to carry oxygen by measuring total hemoglobin (tHb) and determining the percentage of functional and dysfunctional hemoglobin species such as oxyhemoglobin (O2Hb), carboxyhemoglobin (COHb), methemoglobin (MetHb), deoxy-hemoglobin or reduced hemoglobin (HHb).

To determine the various parameters required, the EPOC® Blood Analysis System features four measurement methods:

- Potentiometric sensors, to measure pH, pCO2, Na+ , K+ , Cle Ca2+ ;
- Amperimetric sensors, to measure glucose, lactate and pO2;
- Blood conductivity, to measure Ht of the sample;
- Wide spectrophotometer, to measure CO-oximetry - the whole blood sample is chemically lysed and then measured to evaluate the sample at a variety of wavelengths.

All the components required to perform the analyses (reagents, quality control, optical cell, sensors, CO-oximeter, waste compartment) are contained in cartridges. Before processing the sample, it is of utmost importance that it is completely homogenized in order to obtain reliable results. In LACSL, this device is used daily for the dosage of ionized calcium.

6.5 AUTOIMMUNE DISEASE

Autoimmune disease comprehends an extensive set of pathologies whose pathogenicity is based on activating the cellular immune response against the body's own structures, called autoantigens, to the point of causing cause tissue and organ injuries. It occurs in those individuals in whom the breakdown of one or more of the basic mechanisms that regulate immune tolerance results in self-reactivity.

Autoimmune diseases can be limited to one organ, which include some pathologies that affect the endocrine organs, such as Hashimoto thyroiditis, or they can be systemic diseases, such as pathologies affecting the connective tissue and the joints (such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis)

The common characteristic of all these pathologies is the presence of autoantibodies in the serum, which can be natural or pathogenic. Natural autoantibodies are present in low concentrations in serum and are mainly IgM type. On the other hand, pathogenic autoantibodies are present in high concentrations in serum and they are mainly IgG type. These autoantibodies bind to tissues and induce damage, activation of the complement cascade or induction of cell destruction (14).

As the presence of autoantibodies occurs in all autoimmune diseases, their detection can be applied as markers to help diagnose and monitor these pathologies. However, most autoantibodies are non-specific for just one pathology and are not always detected in the major diseases to which they are associated.

The IIF tests (appendix 11) allow the more complete autoantibody screening, since they detect any component that reacts with the autoantigens present in the substrates. The interpretation of results is done based on the intensity and fluorescence patterns displayed from a certain dilution of the sample.

6.5.1 ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES (ANA)

ANA are specific autoantibodies to the components of the cell nucleus, including DNA, RNA and various proteins and ribonucleoproteins. Despite being rather unspecific of one disease, ANA are present in high amounts in serum from patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and are therefore a good aid in the diagnosis of this disease.

Due to its high sensitivity and specificity, the Indirect Immunofluorescence (IIF) assay using human epithelial cells (Hep-20-10) and primate liver is the gold standard for detection of ANA.

In LACSL, IIF assays are made with Hep-20-10 cells, from EUROIMMUN®, using the TITERPLANE technique (see appendix 12). Using HEp-20-10 or Hep-2 cells, many antibodies against cell nuclei can be analyzed, such as antibodies against DNA, histones, RNA, nuclear dots, centromeres, nuclear membrane, nucleoli (PM-Scl, fibrillarin, RNA polymerase I, NOR), midbody, centrioles, among others, and the associated fluorescence patterns are observed under the fluorescence microscope.

- Hep-20-10 cells

Due to the large number of antigens presented by a Hep-20-10 cell substrate, the determination is highly sensitive, but the specificity is limited. ANA tests on Hep-20-10

cells are often positive in patients who do not have an autoimmune disease. A study showed that high titers of ANA were found in approximately 13% of healthy individuals, although in these individuals, titers tend to be low (<1:80). On the other hand, most people suffering from an autoimmune disease exhibit high titers of ANA (≥ 1:80) (15).

Hep-20-10 cells are incubated with the patient's diluted serum sample. If the reaction is positive, specific IgA, IgG and IgM antibodies bind to the antigens. These antibodies are then stained with fluorescein-labeled anti-human antibodies and visualized under the fluorescence microscope to see the formed patterns. Each bounded autoantibody causes a typical fluorescence pattern, depending on the location of the corresponding autoantigen. If the analysis result is positive, the doctor can ask for other complementary tests such as immunoblot ou ELISA, addressed to some specifics antibodies to verify the positive result.

6.6 MANUAL SEROLOGY

Still within the immunology/endocrinology sector, I performed some manual serology techniques, in serum samples, such as the detection of non-treponemal or treponemal antibodies for the detection of syphilis; determination of the ABO and Rhesus (Rh) blood group; detection of antibodies against febrile antigens present in infections such as brucellosis, salmonellosis and rickettsiosis; detection of the Rheumatoid Factor and detection of the Epstein-Barr (EBV) virus infection.

6.6.1 SYPHILIS DIAGNOSTIC

Syphilis is a complex disease where the etiological agent is *Treponema pallidium*. It is usually transmitted sexually, but can also be transmitted vertically during pregnancy or childbirth, resulting in congenital syphilis. The infection is diagnosed by the detection of specific antibodies to *T. pallidium* from the third or fourth week after contact with the microorganism and may remain at detectable levels for long periods after treatment.

After contact with the bacteria, two groups of antibodies are formed: 1) group that reacts with the non-treponemal antigens, used in the RPR test (Rapid Plasma Reagin), and 2) group that reacts with the *T. pallidum* specific antigens, used in the TPHA test (*Treponema pallidum* Haemoagglutination Assay). As non-treponemal antibodies can be

found in infections other than syphilis, the detection of these antibodies should always be complemented by treponemic antibody testing (14).

6.6.1.1 VDRL (RPR - Rapid Plasma Reagin)

The kit used NO LACSL for the detection of non-treponemal antibodies is the Lab 21 RPR. This test is based on the agglutination of non-treponemal antibodies (IgM and IgG) with the antigens present in the reagent (VDRL antigens containing carbon particles). The presence or absence of agglutination is examined visually after shaking for 8 minutes at 100 rpm. Reactivity is considered to occur when agglutination and lack of reactivity is observed in the absence of agglutination. For reactive sera, semi quantification is performed by double dilutions starting at 1:16 with saline solution and the titre is defined as the highest dilution with positive result.

False positives can occur in situations such as drug addiction, other venereal diseases, pregnancy and postpartum and some autoimmune diseases. Therefore, any positive result must be confirmed by a treponemal test.

6.6.1.2 Total antibody test for *Treponema pallidum*

The commercial kit used in LACSL for this test is the BIOLINE SD Syphilis 3.0. It is a solid phase immunochromatographic assay for the detection of anti-*Treponema pallidum* antibodies in serum.

6.6.2 FEBRILE SERODIAGNOSIS

Febrile antigens are standardized suspensions of dyed bacteria used to identify and quantify specific antibodies that the human body develops during some fever infections, such as brucellosis, salmonellosis and certain diseases caused by *Proteus spp*..

The antigen in suspension agglutinates in the presence of the corresponding homologous antibody in the samples tested. The research of antibodies against febrile antigens is done by 3 MICROPATH® direct agglutination tests: 1) Wright Reaction; 2)

Widal Reaction and 3) Weil-Felix Reaction. The antigens used in each reaction are described in the table 13.

The antigen in the suspension agglutin in the presence of the corresponding homologous antibody in serum samples. Positive results are an aid in the diagnosis of these febrile diseases but agglutination cannot be considered evidence of infection by a given organism as different micro-organisms have common antigens.

Table 12: Researched antibodies against febrile antigens by MICROPATH® direct agglutination tests.

Aglutination test	Antigens
Wright	Brucella abortus
Widal	*Salmonella typhi* H
	Salmonella typhi O
	Salmonella paratyphi AH
	Salmonella paratyphi AO
	Salmonella paratyphi BH
	Salmonella paratyphi BO
Weil Felix	Proteus OX19
	Proteus OX2
	Proteus OXK

6.6.3 WAALER-ROSE REACTION

AVITEX® Rose Waaler is a rapid slide test for rheumatoid factor (RF) detection. RF consists of IgM antibodies and can be found in the serum of patients with Rheumatoid Artitis.

In the Waaler-Rose test, stabilized sheep erythrocytes, sensitized with Ig G of anti-ovageing rabbit, agglutinate in the presence of rheumatoid factors. The slides are macroscopically examined for the presence or absence of immediate agglutination.

6.6.4 PAUL-BUNNEL REACTION

The AVITEX® IM Latex Serology Test is used for the semi-quantitative detection and determination of heterophilic antibodies to the Epstein-Barr virus (EBV) causing infectious mononucleosis.

This test is based on the agglutination reaction between the patient's antibodies and the reagent with a suspension of sensitized latex particles with mononucleosis causative antigen from bovine erythrocytes. The addition of the latex reagent to the serum sample containing heterophilic antibodies results in visible agglutination within a short time. For the semiquantitative determination, positive samples are double diluted. The titration is defined as the highest dilution giving a positive result.

6.6.5 ABO/RH SYSTEMS

The international Society of Blood Transfusion already recognized 33 blood group systems. ABO and Rhesus systems are the most known and studied, but many other types of antigens have been found on the RBC membranes.

In the ABO system, the classification of blood groups is performed by the type of antigen present on the surface of the erythrocytes. In this sense, type A blood has type A antigens, type B antigens have type B antigens, type AB antigens have both and type 0 antigens have neither A nor B antigens on the surface of the erythrocytes. In the absence of A or B antigens antibodies to A and B are produced.

The Rh system is more complex than ABO system and consists of at least 50 antigens. The most common Rh antigens are: D, C or c and E or e. RBC surface may or may not have a Rh factor or immunogenic D-antigen (Rh-negative, because D-antigen is absent). The D antigen is very immunogenic and it induces an immune response, IgG type, in Rh-D individuals negative, in case of transfusion with Rh-D positive blood. Because these immunoglobulins can cross the placenta, an immune response can be very dangerous for women during pregnancy. This is why prophylaxis against Rh immunization using anti-D Ig is given to pregnant Rh-negative mothers who have given birth to Rh-positive child (16).

6.6.5.1 Blood group determination – Indirect Coombs Test

Antiglobulin testing, also known as the Coombs test, is a procedure used to detect the presence of antibodies against circulating RBCs that induce hemolysis. Antiglobulin testing can be either direct antiglobulin testing (DAT) or indirect antiglobulin testing (IAT).

AB0 and Rh systems are usually tested together in immunohematological assays, based on the detection of antigen-antibody complexes, by IAT. IAT is used to detect unbound antibodies to RBCs, which may be present in the patient's serum. For this, the patient's serum is separated by centrifugation so the sample to be used does not contain the patient's RBCs. The isolated serum sample then gets incubated with foreign RBCs of known antigenicity. Antiglobulin reagent is then added, and the presence of agglutination indicates a positive result (17).

In LACSL, the determination of the blood group is performed through DiaClon AB0/Rh (Bio-Rad) identification cards (figure 13). In each microtube of the chart is present a matrix of gel with a specific known monoclonal antibody. The previously prepared suspension of erythrocytes is prepared and added to the microtubes. During centrifugation on ID-Centrifuge 6S QiaMed-ID, the erythrocytes that are agglutinated by the formation of antigen-antibody complexes, are fixed on top of the gel. If there is no antigens to agglutinate with their specific antibodies, the erythrocytes are deposited at the bottom of the microtubes.

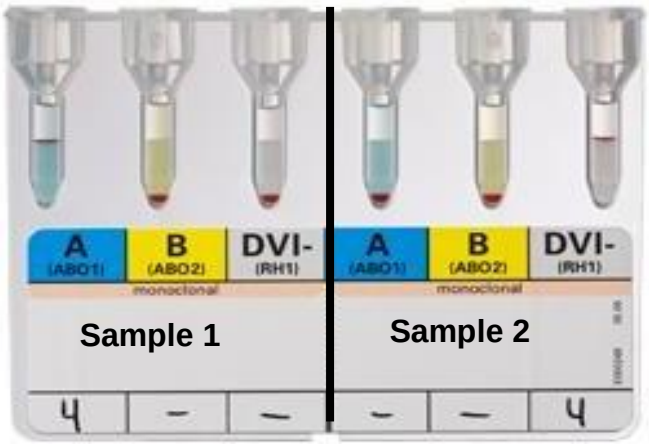


Figure 13: DiaClon AB0/Rh (Bio-Rad) identification card. Each card gives the result for up to two different samples. From left to right: erythrocyte agglutination in wells 1 and 6; erythrocyte deposition in wells 2, 3, 4 and 5. Result: sample 1 (left) - type A/Rh positive; sample 2 (right) - type O/Rh+. Photo taken by the author, on LACSL.

6.6.6 COVID-19 DIAGNOSTIC

COVID-19 is an infectious disease caused by the recently discovered SARS-CoV-2. The incubation period of this virus can range from 1 to 14 days and the most common symptoms are fever, dry cough, fatigue, production of sputum, shortness of breath, sore throat and headache, among others. However, some people infected with this virus may not show any of these symptoms and may therefore be asymptomatic patients. In the case of symptomatic patients, the transmission between people is made through respiratory droplets exhaled through coughing, sneezing or talking (18).

Because it is a recent disease that has caused a worldwide pandemic, several serological tests have been developed to determine IgM and IgG antibody production in infected patients.

The serological diagnostic for the most recent SARCoV virus is done in LACSL by the commercial immunochromatography kit NADAL® COVID-19 IgG/IgM Test. This is a lateral flow chromatographic immunoassay for the qualitative detection of anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM in human whole blood, serum or plasma specimens of symptomatic patients.

7 OTHER SECTIONS AND SAMPLES

As previously mentioned, the internship held at the Clinical Pathology Service of LACSL only took place at the Haematology, Biochemistry and Immunology/Endrochronology service. However, the laboratory is also made up of the areas of Microbiology and Urinary Chemistry.

The Microbiology and Urinary Chemistry sections are mainly reserved for the isolation of pathogens agents from various biological products, to their identification and assessment of their susceptibility to antibiotherapy, within the clinical context. These sections are also intended to type II urine and urinary sediment analysis. Unlike the sections mentioned above, the microbiology section has a larger practical and manual component.

7.1 SEMINAL FLUID (SPERMOGRAM)

During ejaculation, semen is produced from a concentrated suspension of spermatozoa, stored in the paired epididymides, mixed with, and diluted by, fl uid secretions from the accessory sex organs. The nature of the spermatozoa (their vitality, motility and morphology) and the composition of seminal fluid are also important for sperm function. Thus, performing the spermogram is of great interest in the evaluation of male fertility and post-vasectomy monitoring.

In LACSL the equipment that makes the spermograms is the MES SQA-V GOLD from BioLab, which evaluates the sample by spectrophotometry. The interpretation of the spermogram values is based on the WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen, 4th edition (8).



Figure 14: MES SQA-V GOLD from BioLab and Qwick Check strips. Taken by the author.

7.1.1 MACROSCOPIC EXAM

The macroscopic examination consists of evaluating the appearance, colour and smell of the sample, measuring the volume, classifying the viscosity and liquefaction and pH.

*Table 13:Macroscopic characteristics assessed in the macroscopic examination of seminal fluid and normal values according to **(8)**.*

Macroscopic Characteristics	Observations
Homogeneous Liquid	Normal liquid semen has an opalescent homogeneous appearance. It may appear less opaque if the sperm concentration is low.
Colour	It has a whitish colour, and may be brownish-red, indicating the presence of RBC; or yellowish, suggestive of prolonged period of abstinence, contamination by urine or medication.
Smell	It has a liquid's own smell and can be absent or stinking in some cases of infection or other pathologies.
Liquefaction	After the rest period of 30 min., the liquefaction is complete if there is no granules, or incomplete if granules exist.
Volume	It is measured with a graduated full-flow pipette and the reference lower limit is 1.5 mL. Low volume of seminal liquid is often associated with infertility and may indicate

	dysfunction of the seminal vesicles, but an inadequate harvest could also be considered. On the other hand, a high volume of seminal liquid may reflect an inflammation. In the case of a volume too small for evaluation in the auto analyser, the microscopic evaluation is done in a New Bauer chamber.
Viscosity	Viscosity is normal when the liquid drops drop by drop after the liquefaction rest time. It is considered an increased viscosity when the pipette removes from the sample wires longer than 2 cm. A greatly increased viscosity may interfere on the motility and concentration determination.
pH	The normal pH is between 7.2 and 8.0. A lower pH may be indicative of an obstructive process. On the other hand, higher pH can be suggestive of infection. The pH is measured through the colorimetric reaction of Qwik Check Strips pH and Leukocyte test strips.

7.1.2 MICROSCOPIC EXAM

The microscopic examination consists of assessing the presence of aggregates, the motility, vitality, concentration and morphology of sperm. This exam provides an overview to reveal the aggregation or agglutination of sperm, the presence of cells other than sperm, such as cells epithelial cells, leukocytes, immature germ cells and isolated heads or tails, which can contribute to decreased male fertility.

The microscopic examination is done on MES SQA-V GOLD from BioLab and by observation of a semen smear on the optical microscope.

*Table 14: Microscopic characteristics assessed in the macroscopic examination of seminal fluid and normal values according to **(8)**.*

Microscopic Characteristics	Observations
Concentration	The quantification of sperm concentration is important in the diagnosis of oligozoospermia and azoospermia. These conditions may be associated with possible epididymis and seminifera tube disorders. The reference value is ≥ $20x10^6$ spermatozoa/mL.

Morphology	The morphology of a sperm is evaluated with respect to head, intermediate piece and tail (figure 11). An abnormal head morphology is associated with poor penetration of the egg, while the abnormal morphology of the neck, intermediate piece and tail affects motility. The reference percentage of normal sperm is equal to or greater than 14%. This is an important parameter to diagnose tetratozoospermia (decreased number of morphologically normal sperm, and increased abnormal sperm).
Motility	The autoanalyzer uses a system to classify the motility of the sperm that distinguishes spermatozoa with motility progressive (fast and slow) and non-progressive spermatozoa. **Type a**: progressive spermatozoids that move actively, both linearly as in wide circles, regardless of speed (fast or slow); **Type b and c**: non-progressive sperm are all the other movement patterns without progression; **Type d**: immobile sperm; The reference values are: a ≥ 25%; (a+b) ≥ 50%

Observation: The characteristics mentioned in the table were observed by me during the internship. However, there are other important sperm characteristics to evaluate male fertility, such as the agglutination of immobile spermatozoa; the presence of cells in the seminal fluid other than spermatozoa (leukocytes, erythrocytes, among others) and the vitality of spermatozoa to distinguish immobile from dead.

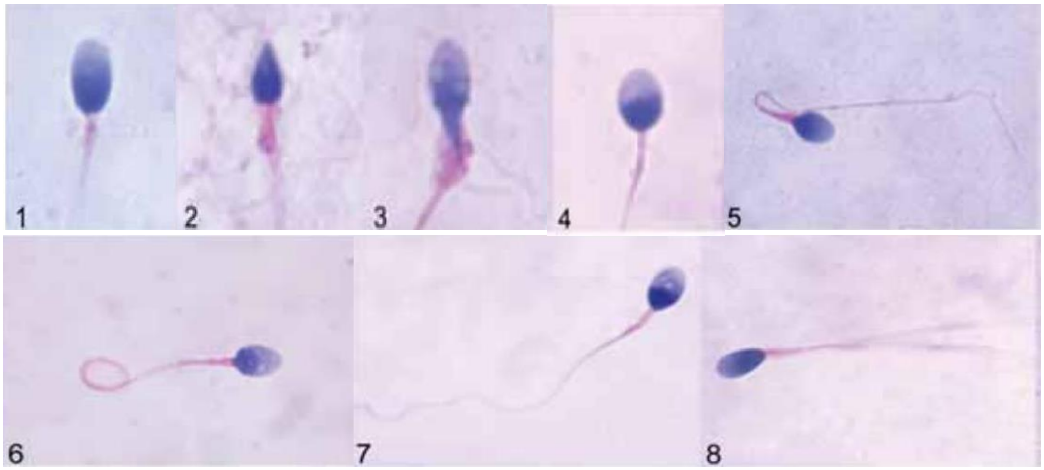


Figure 15: Micrographs of sperm. 1) Normal spermatozoa; 2) Abnormal head and irregular intermediate piece; 3) Abnormal piriform head and irregular intermediated piece; 4) Abnormal round head. 5) normal head, thick abnormal intermediated piece and looped abnormal tail; 6) Abnormal head, normal intermediate piece and abnormal looped tail; 7) Normal spermatozoa; 8) Normal head and intermediate piece and abnormal double tail. Adapted from (8).

7.2 FAECES (SAT – *HELICOBACTER PYLORI*)

Stool antigen testing (SAT) is a relatively inexpensive test because it does not require very advanced laboratory equipment and the stool sample can be collected by the patient at home and stored at 2°C, at 8°C for up to three days or at -20°C indefinitely. SAT is based on the use of monoclonal antibodies, which are more widely used and more sensitive or polyclonal for detection of *Helicobacter pylori* antigens in faeces samples.

In LACSL, the immunochromatographic test used is bioNexia from BioMérieux. This test allows a quick diagnosis of *H. pyori*, with a specificity and a sensitivity of over 90%. In this examination it must be taken into account that in patients with diarrhoea or with shapeless or watery stools, sensitivity is reduced because the concentration of antigen is diluted.

QUALITY CONTROL

According to the International Organization for Standardization (ISO) definition, the Quality System is "an organizational structure that defines responsibilities, procedures, activities, capabilities and resources, which ensures that processes, products and services meet the established quality requirements". It is a set of procedures put in place in the laboratory to allow quality control of analysis results as they are performed. It is based on daily analysis of a control sample that have known analytical values, making it possible to: a) evaluate the precision of the tests; b) guarantee the reproducibility of the results and c) check the calibration of the analytical systems. Through internal and external quality control, the effectiveness and efficiency of laboratory procedures can be assessed by providing valid results that contribute to the establishment of a good diagnosis by the clinician.

On LACSL, the quality management system has been certified since december, 2001, by the NP EN ISO 9001:2000 standard for the performance of clinical analyses, and in 2009 the transition to the new version of the standard (NP EN ISO 9001:2008) was made. Currently and after a revision of the quality management system, the laboratory is certified by NP EN ISO 9001:2015. The quality management is in charge of Dra. Cristina Silva and each device has its own IQC and EQC guidelines.

CALIBRATION

Calibration is a method to determine the concentration of a substance in an unknown sample by comparing the unknown with a set of standard samples, in order to generate a calibration curve for every equipment. The standard sample has a known amount of a certain analyte and this amount is reported to the equipment for reference.

It is not necessary to recalibrate the tests every time, however, certain circumstances make recalibration necessary. The frequency with which the calibration is performed in each instrument in the LACSL is unique and it depends on several factors such as: change of reagent; change of reagent lot; if the internal control starts not to be within acceptable values, among others.

INTERNAL QUALITY CONTROL (IQC)

In LACSL, the IQC is done using three different control levels (normal, low pathological and high pathological) at the beginning of each analytical procedure. This procedure is repeated with the same samples from the same day, selected at random and executed at different stages of the working day, to evaluate if the result of the different parameters is maintained at different times of the day.

LACSL uses Westgard Rules to evaluate the controls of each parameter on a daily basis. If the value obtained in the IQC does not comply with the Westgard Rules, the analysis must be repeated. If the error persists, a new aliquot of the used calibrator must be thawed or recalibrated and the control must be repeated. If the error still persists, it is necessary to ask for technical help.

EXTERNAL QUALITY CONTROL (EQC)

This is an inter-laboratory evaluation, by means of proficiency tests in which the result of each parameter performed in the participating laboratory is compared with the consensus average, obtained from the participating laboratories that use the same methodology, to regularly verify the accuracy of the results. The participants, in turn, receive individual and overall performance reports in which they can evaluate their own practice. Thus, EQC samples are human samples, tested negatively for diseases, which are passed through various parameters and returned to external laboratories for evaluation.

The LACSL participates in the following EQA programs:

- INSA (National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge)
- RIQAS (Randox International Quality Assessement Schemes)
- Labquality - Helsinki - Finland
- UKNEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service)
- SEQC (Sociedad Espaňola de Biquímica Clínica y Patologia Molecular).

CLINICAL CASE

At the end of my probationary period, I was given the following clinical case to assess. It should be noted that the following information does not actually belong to a patient and the values were changed for confidentiality purposes.

It was received on the Haematology section a blood sample, taken with EDTA, from a 77 years old women. The request was for a CBC with platelets, whose results are available on the table 15. At the same time, in the biochemistry and immunology/endocrinology section, a biochemistry tube was received, from the same patient, for analysis of biochemical parameters and protein electrophoresis (see table 16 and figure 16). In addition to these determinations, the complementary tests were performed and the results are presented on table 17.

Table 15: Clinical case laboratory results, from hematology sector.

HEMATOLOGY						
Parameter	**Result 02/07/2020**		**Reference Values**	**Prior Result 26/05/2020**	**Prior Result 16/12/2019**	**Observation (Flags)**
Erythogram						
RBC	3,9	10^{12}/L	3,8 - 5,8	3,7	3,5	
HGB	10,2	g/dL	11,5 – 16,5	10,3	9,6	↓*
HTC	32,0	%	35,0 – 47,0	31,0	30,6	↓*
MGV	85,0	fL	83,0 – 99,0	82,9	87,2	
MGH	26,8	Pg	27,0 – 32,0	27,5	27,4	↓*
MGHC	31,8	g/Dl	32,0 – 36,0	33,2	31,4	↓*
RDW	15,5	%	11,0 – 16,0	14,9	14,7	
Leukogram						
WBC	4,5	10^{9}/L	4,0 – 11,0	5,1	4,6	
Neutrophils	69,0%	3,06	2,1 – 7,6	64,2%	60,7%	
Eosinophils	3,6%	0,16	0,0 – 0,4	3,3%	4,3%	
Basophils	1,4%	0,06	0,0 – 0,2	0,8%	0,7%	↑
Lynphocytes	18,3%	0,81	1,0 – 4,2	24,4%	27,6%	↓
Monocytes	7,7%	0,34	0,1 – 0,8	7,3%	6,7%	↑*
Plaquetels	130	10^{9}/L	150 – 400	109	132	↓*
RET	1,0	%	0,2 – 2,0	-	-	
ESR (1H)	106	mm	< 15	-	-	↑

* Altered results compared to the reference values but in agreement with the patient's history.

Table 16: Clinical case laboratory results, from biochemistry sector.

BIOCHEMISTRY					
Parameters	**Result**		**Reference Values**	**Prior Result 26/05/2020**	**Observation (Flags)**
Serum iron	32	mcg/dL	50-170	-	29
Ferritin	85	pmol/L	20-650	-	64
Creatinine	1,0	mg/dL	0,4 – 1,1	1,2	
TGO/AST	20	U/L	7 – 34	-	
TGP/ALT	25	U/L	7 – 49	-	
GAMA GT	20	U/L	<38	-	
Alkaline Phosphatase	70	U/L	30 – 129	-	
Total Bilirubin	0,50	mg/dL	< 1,20	-	
Direct Bilirubin	0,20	mg/dL	< 0,30	-	
Total Calcium	10,0	mg/dL	8,1 – 11,0	-	
Albumin	4,2	g/dL	3,2 – 4,8	-	
Protein Electrophoresis					
Total Proteins	7,5	g/dL	6,2 – 8,4	-	
Albumin	49,7%	3,8	55,0 – 66,0	-	↓
μ 1 Globulin	4,9%	0,4	2,0 – 5,0	-	
μ 2 Globulin	12,1%	0,9	6,0 – 12,0	-	
β 1 Globulin	6,0%	0,5	4,5 – 7,5	-	
β 2 Globulin	1,9%	0,1	3,0 – 6,5	-	↓
Gama Globulin	25,4%	1,9	11,0 – 19,0	-	↑
Albumin/Globulin	0,99	-	1,4 – 2,2	-	↓

* Altered results compared to the reference values but in agreement with the patient's history.

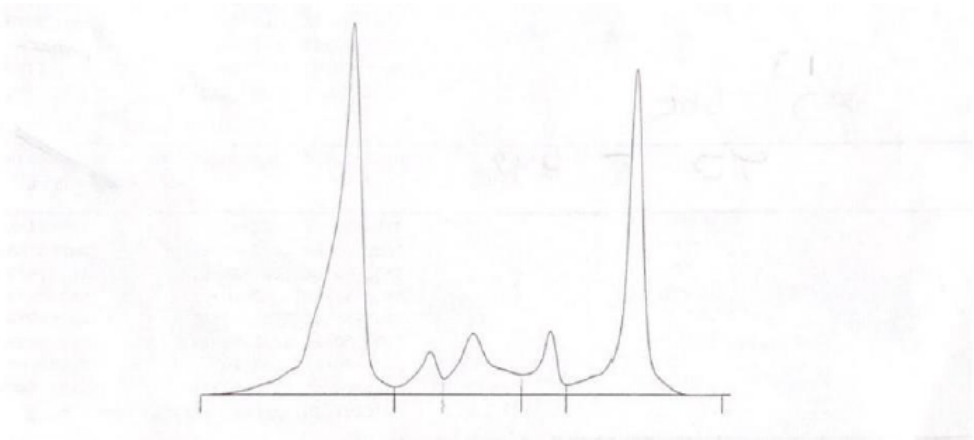


Figure 16: Laboratory results of clinical case protein electrophoresis.

Table 17: Clinical case complementary tests.

IMMUNOLOGY/ENDOCRINOLOGY				
Parameter	**Result**		**Reference Values**	**Observations (Flags)**
V.D.R.L.	No Reactive			
Wright Reaction	NEGATIVE			
C Reactive Protein (ultra sensible)	0,67	mg/dL	< 0,30	↑
Ab. Anti – HIV ½ + Ag. p24	NEGATIVE			
Ab. Anti – HAV Total	POSITIVE			Suggests anti-Hepatitis A vaccination or old infection with Hepatitis A virus. Request for confirmation.
Ab. Anti-HAV - IgM	0,13			
Ag. HBs	NEGATIVE			
Ag. HBe	NEGATIVE			
Ab. HBs	< 3,1	mU/mL	Imune >10	Suggests absence of ongoing infection by Hepatitis B virus.
Ab. Anti - HCV	0,05		Negative < 0,80 Doubtful 0,80-1,10 Positive > 1,10	
Free T4	17,0	pmol/L	11,5 22,7	
TSH	1,68	mUI/L	0,55 – 4,78	
CEA	>100,0	ng/mL	Non smokers < 5,0 Smokers < 7,0	↑↑↑
Faeces parasitologic exame	NEGATIVE			

CLINICAL CASE INTERPRETATION

The patient has hypochromic normocytic anemia, with low serum iron values and a normal ferritin, which may indicate, a chronic disease anemia.

She has basophilia, lymphopenia, and thrombocytopenia, with increased ESR. Although, in the elderly, the ESR increase between 35 - 40 mm/h is considered a normal parameter, in this case the value is 105 at the end of 1h. This increase is probably related to the monoclonal gamma globulin band (observed in protein electrophoresis). In addition, there is also an increase in reactive protein C, which demonstrates an ongoig

inflammatory process (results concordant with the increase in Ig and ESR). Finally, the tumor marker CEA presents a very high value in relation to the reference value.

The interpretation of these data may suggest the presence of an ongoing malignant pathology. However, it is necessary to perform new complementary tests, such as, immunofixation, CA125 and CA19-9 for better clinical diagnosis.

BIBLIOGRAPHY

1. Turgeon ML. Clinical Hematology: Theory and Procedures: Wolters Kluwer; 2017.

2. SYSMEX. Analisador hematológico Sysmex XT-4000i™ 2020 [Available from: https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XTSeries/Pages/XT-4000-Hematology-Analyzer.aspx.

3. BIOMÉRIEUX INDIA. PREVI® Isola 2018 [Available from: https://www.biomerieuxindia.in/product/previ-isola.

4. BIOMÉRIEUX SA. BACT/ALERT® 3D Rapid Microbial Detection

Patented Colorimetric Technology 2020 [Available from: https://www.biomerieux-industry.com/products/bact/alert-3d-rapid-microbial-detection.

5. Thermo Scientific. Test Principle ImmunoCAP Specific IgE 2012 [Available from: http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/sIgE/Test-Principle/.

6. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography: Wiley; 2010.

7. Alhabbab RY. Immunofluorescence (IF) Assay. Basic Serological Testing. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 119-26.

8. Organisation WH. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction: Cambridge University Press; 1999.

9. World Health O. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Geneva: World Health Organization; 2010.

10. Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC, et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. Clin Chem Lab Med. 2018;56(12):2015-38.

11. Aytekin M. The Current Use and the Evolution of Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement. Middle Black Sea Journal of Health Science. 2018:17-23.

12. Hoffbrand AV, Steensma DP. Hoffbrand's Essential Haematology: Wiley; 2019.

13. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? Auto Immun Highlights. 2017;8(1):9-.

14. Dennis L. Kasper SLh, Joseph Loscalzo, J.Larry Jameson, Dan L. Longo e Anthony S. Fauci Harrison'S Principles Of Internal Medicine. 20th ed2018 08-2018. 4048p.

15. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC.

Pattern on the antinuclear antibody–HEp-2 test is a critical parameter for discriminating

16. antinuclear antibody–positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. Arthritis & Rheumatism. 2011;63(1):191-200.
17. Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. Indian J Anaesth. 2014;58(5):524-8.
18. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.

19. Lee CY-P, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. Front Immunol. 2020;11:879-.
20. Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L. European manual of clinical microbiology2012.
21. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5.1.-5.1.11.
22. Shekarchi IC, Sever JL, Nerurkar L, Fuccillo D. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus. Journal of Clinical Microbiology. 1985;21(1):92-6.

APPENDIX

APPENDIX I - COMMUNITY-ACQUIRED URINARY TRACT INFECTIONS: INTERPRETATION IN THE PRESENCE OF CLINICAL SIGNS, LEUKOCYTURIA AND BACTERIURIA

Table 18: Community-acquired urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria. Withdrawal from (19).

Clinical signs	**Leukocyturia ≥ 10^4/mL**	**Bacteriuria (CFU/mL)**	**Number of species**	**Comments / Important informations about the patient**	**Antimicrobial susceptibility test**
+	+	≥ 10^3 *E. coli* or *S. saprophyticus* ≥ 10^5 for the other species	≤ 2	▪ Urinary infection (acute cystitis) ▪ Bacteriuria ≥ 10^4 CFU/mL for acute pyelonephritis ▪ Bacteriuria ≥ 10^3 CFU/mL for acute prostatitis is considered significant	Yes
+	+	< 10^3	NI	▪ Inflamation without bacteriuria ▪ Antibiotic treatment underway ▪ Investigation for slow-growing or difficult-to-grow microorganisms ▪ Non-infectious etiology	NA
+	-	≥ 10^5	≤ 2	a) Immuno-competent patient: repeat the urine bacteriology and cytology	No

				examination (possible start of a urine infection)	
				b) Immuno-depression (such as chemotherapy or transplant patients)	Yes
-	Variable	10^3-10^4	≥ 1	Probable contamination after poorly taken sample	No
-	Variable	> 10^5	≥ 2	Colonisation	No
Variable	-	< 10^3	NI	No urinary tract infection or colonisation	NA

NA: not applicable; NI: not important for the result

APPENDIX 2 - HEALTH-CARE ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTIONS: INTERPRETATION IN THE PRESENCE OF CLINICAL SIGNS, LEUKOCYTURIA AND BACTERIURIA

Table 19: Health-care associated urinary tract infections: interpretation in the presence of clinical signs, leukocyturia and bacteriuria. Withdrawal from (19).

Context of the patient	Clinical signs		Bacteriuria (CFU/mL) with ≤ 2 different microorganisms	Comments / Important informations about the patient	Antimicrobial susceptibility test
Non-catheterised	+	+	≥ 10^3	▪ Urinary infection	Yes
			< 10^3	▪ Inflammation without bacteriúria ▪ Antibiotic treatment underway or slow growing/difficult-to-grow microorganisms ▪ Non-infectious etiology	NA
	-	Variable	≥ 10^3	▪ Colonisation	No
			< 10^3	▪ No urinary infection or colonisation	NA
	+	-	≥ 10^5	a) Immuno-competent patient: repeat the urine bacteriology and cytology examination (possible start of a urine infection)	No

				b) Immuno-depression (such as chemotherapy or transplant patients)	Yes
Catheterised	+	NI*	≥ 10^5	▪ Urinary infection	Yes
			< 10^5	▪ Inflamation without bacteriuria ▪ Antibiotic treatment underway or slow growing/difficult-to-grow microorganisms ▪ Non-infectious etiology	No
	-	NI*	≥ 10^3	▪ Colonisation	Yes
			< 10^3	▪ No urinary infection or colonisation	No

NA: not applicable; NI: not important for the result; * Leukocyturia is not contributory information if there is a urinarycatheter.

APPENDIX 3 – URINE OBTAINED FROM AN INTERMITTENT URETHRAL CATHETER, BY PYELOSTOMY, BY URETEROSTOMY, BY CYSTOSCOPY OR BY SUPRAPUBIC ASPIRATION

Table 20: Urine obtained from an intermittent urethral catheter, by pyelostomy, by ureterostomy, by cystoscopy or by suprapubic aspiration (19).

Sample technique	Symptoms	Leukocytes (> 10^4/mL)	Bacterial count (per mL)	Number of species	Antimicrobial susceptibility test
Intermittent urethral catheter	+ or -	+ or -	< 10^2	1 or 2	No
Pyelostomy, ureterostomy or cystoscopy	+ or -	+ or -	≥ 10^2	1 or 2	Yes
Suprapubic aspiration	+ or -	+ or -	≥ 10	1 or 2	Yes

APPENDIX 4 - IMMUNOCHROMATOGRAPHY ASSAY (LATERAL FLOW TESTS)

Immunochromatography is a combination of chromatography and immunoassay technics. Depending on the assay, the aim is to immobilize antigen (for detection of antibody) or antibodies (for detection of antigens), with the addition of an enzyme-labeled conjugate and substrate that results in the appearance of a colored reaction, directly on the membrane.

Usually, a typical immunochromatographic test strip (commercial kit) consists of:

1) an absorbent pad onto which specimen is applied;

2) a conjugate or reagent pad that contains antibodies specific to the target analyte conjugated to colored particles (for example latex microspheres);

3) a reaction membrane onto which the specific antibodies are immobilized in a line across the membrane as a capture zone or test line;

4) a control zone containing antibodies specific for the conjugate antibodies;

5) waste reservoir composed of another absorbent pad, designed to draw the sample across the reaction membrane by capillary action.

However, commercial kits vary by brand. Therefore, it is important to always read the instructions for use of each commercial kit, as well as the interpretation of the results, which may also change depending on the commercial kit.

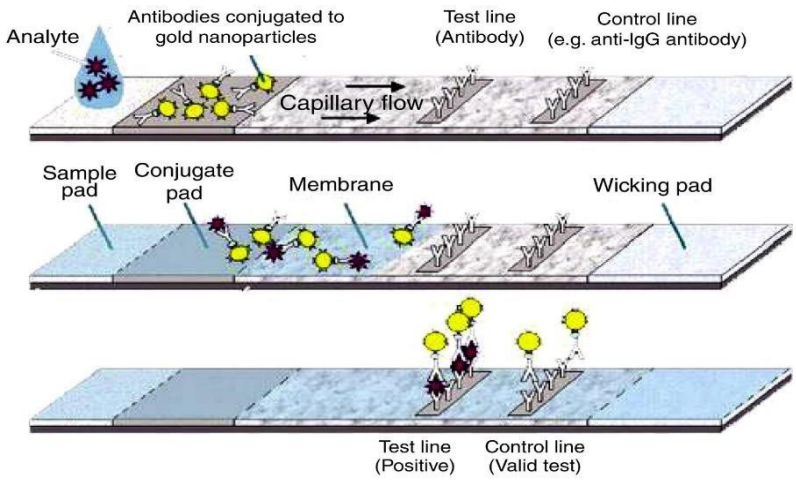


Figure 17: Scheme of an immunochromatographic test.

APPENDIX 5 - PANTHER® CULTURE AND INCUBATION CRITERIA FOR DIFFERENT HUMAN SAMPLES IN THE EXALAB MICROBIOLOGY SECTOr

Table 21: PANTHER ® culture and incubation criteria for different human samples in EXALAB Microbiology sector.

Sample	Culture Medium	Incubetion Temperature (ºC)	Incubation Time-hours (H) or days (d)	Observations and Complementary Tests
Urogenital System				
Endometrium	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+ (CO_2 5%), VCAT	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Glandula de Skène and Bartholin	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+ (for Gram +), VCAT			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Sperm	COS, COS (anaerobise), PVX, MCK, COS+, VCAT, CAND			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Anogenital Ulcerations	PVX, COS+, VCAT, CAND, STRB (if pregnant)			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Urethral				
Vaginal				
Vulva				
Vaginal: *Streptococcus B* (in case of pregnancy)	STRB			▪ Microscopic Exam
Vaginal: *Escherichia coli* K1 (in case of pregnancy)	CPS			▪ Microscopic Exam
New-born – Mother				

Amniotic Fluid	COS, COS (anaerobiosis), CPS, PVX, CAND (if positive for yeasts and filaments on direct exam)	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Lochia	COS, COS (anaerobiosis), CPS, PVX, STRB, CAND (if positive for yeasts and filaments on direct exam)			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Placenta				
Gastric Fluid				
New-born: multi-oriferal peripheral sampling	COS, PVX, MCK			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Maternal Milk	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Facial				
Mouth, Gum, Jugal mucous membranes, Hard and soft palate	MCK, COS+, CAND	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Throat	COS+, CAND			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Nose (nasal cavities)	COS, MCK, COS+, HAEM, CAND			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Ear (external auditory canal)				
Ear (otorrhea)				
Ear (paracentesis pus)	COS, MCK, COS+, HAEM			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Facial Sinus	PVX, MCK, COS+, CAND			▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Eye				
Conjunctival	PVX, MCK, COS+, CAND	35 ± 2	48H to 14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Tears				

Cornea (pre-graft removal) and corneal graft, corneal scraping product & endo-ocular puncture fluids (aqueous humor, vitreous body and vitrectomy fluid)	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+, LBM Thiol			▪ Microscopic Exam
Contact lenses and preservative liquid				
Transplant conservation liquid				
Puncture liquid or other				
Ascite	Hemoculture Bottles – aerobiosis and anaerobiosis	35 ± 2	5d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Bile	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+		48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Articular / synovial liquid	Hemoculture Bottles - aerobiosis and anaerobiosis		5d to 14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Cerebrospinal liquid (CSL)	Hemoculture Bottles - aerobiosis and anaerobiosis		5d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Peritoneal dialysis liquid	Hemoculture Bottles - aerobiosis and anaerobiosis		5d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Douglas liquid	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+, VCAT		48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Drain or blade liquid			48H	▪ Microscopic Exam

Miscellaneous puncture liquid (cyst, hematoma)	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+			▪ Gram Stain
Pericardial Liquid Pleural liquid	Hemoculture Bottles - aerobiosis and anaerobiosis		5d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain ▪ Ziehl-Neelson Stain
Conservation liquid and material				
Intravascular catheter	COS	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam
Implantable chamber	COS, PVX		48H	
Otopedic material	LBM Thiol		14d	
Pacemaker and other stimulation dispositives	COS, COS (anaerobic), PVX, LBM Thiol		48H to 14d	
DIU sterile	COS, COS (anaerobic), PVX, MCK, COS+, VCAT		48H	
Bronchopulmonary Secretions				
Endobronchial Aspiration Endotracheal Suction Broncho-alveolar Lavage	COS, MCK, COS+, HAEM, CAND	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Ziehl-Neelson Stain
Sputum ans sputum in the cystic fibrosis patient	Pure culture: COS, MCK, COS+, HAEM, CAND 10^{-5}: MCK, COS+, HAEM 10^{-3}: COS, MCK, COS+, HAEM 10^{-7}: MCK, COS+, HAEM		5d	
Tissue Biopsies				

Articular or synovial, bone and para and periarticular tissues	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+	35 ± 2	48H to 14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Gastric when seraching for *Helicobacter pylori*	Sample sent to CNR (CHU Pellegrin) to further analysis			
Out-of-stomach intestine	SALM, MCK, COS+ CAMPY, YER, CLOS, VIB, VCAT (if it is an ano-rectal biopsy and/or STD context)	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Other than osteoarticular or intestinal and gastric	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+		48H to 14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Ziehl-Neelson Stain
Native (and mechanical) heart valve and heart valve vegetations	COS, COS (anaerobiosis), PVX, LBM Thiol + Freeze sample at -20ºC for 2 months		48H to 14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Giemsa Stain
Superficial and deep pus				
▪ Chronic skin wound, ▪ Ulcer and eschar ▪ Spontaneous discharge from a skin fistula	PVX, MCK, COS+, CAND	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain
Deep pus	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+, LBM Thiol (if intracranial or osteo-articular or peri-articular suppuration)		48H to 14d	
Calculus/ Lithiasis				
Calculus / Lithiasis	COS, COS (anaerobiosis), PVX, MCK, COS+	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain

Cropo culture				
Conventional cropo culture	0 (zero)H: MCK, YER, CAMPY, Selenite Broth 24H: after culture replicate on Selenite Broth, SALM	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam
Blood and Bone Marrow				
Blood (positive hemoculture)	COS, PVX MCK, COS+ (if presence of mix infection by Gram positive and Gram negative bacterias on fresh preparation) CAND (if presence of yeasts and/or filaments on direct exam)	35 ± 2	48H	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain ▪ Fresh preparation
Bone Marrow	Hemoculture Bottles - aerobiosis and anaerobiosis		14d	▪ Microscopic Exam ▪ Gram Stain

APPENDIX 6 – FLOW CYTOMETRY

Flow cytometry measures multiple physical characteristics of a single cell, using fluorescence measurement, usually with a laser light source. In laser flow cytometers, light scatter is used to measure the intrinsic size and granularity of the cell and fluorescence can be used to measure extrinsic features (e.g., specific protein expression and nucleic acid content) by adding reagents, such as fluorescent stains and antibodies. Fluorescent dyes must bind or react specifically with the cellular component of interest, so flow cytometric assays uses direct immunofluorescence staining with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies to identify cells expressing specific antigens.

Principle:

The flow cytometers runs a cell at a time through a laser (or multiple lasers, each one with a certain wavelength of light) while suspended in a buffered salt-based solution. Each particle is analyzed for visible light scatter and one or multiple fluorescence parameters and the information is recorded for subsequent analysis. Visible light scatter is measured in two different directions (figure 18):

- Forward scatter (FSC), which can indicate the relative size of the cell;
- Side Scatter (SSC), at 90º, which indicates the internal complexity or granularity of the cell (1, 20).

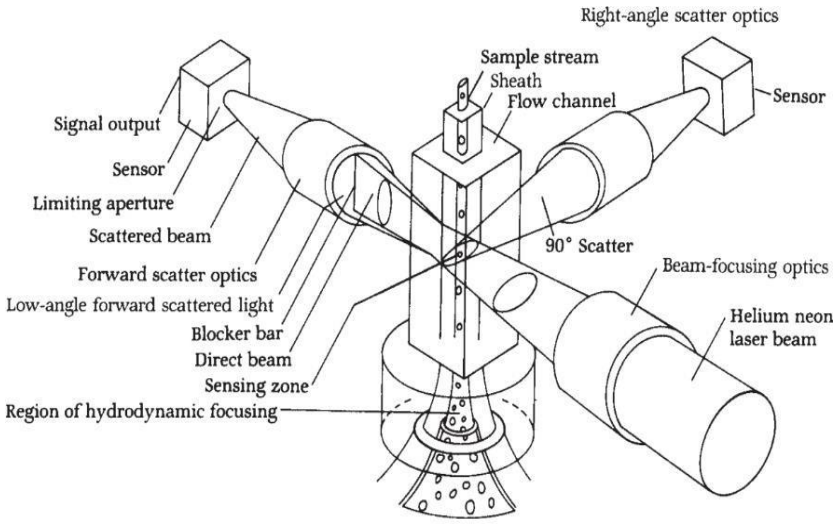


Figure 18: Flow cytometry scheme. Withdrawal from (1).

APPENDIX 7 – SCATTERGRAMS OF EACH CHANNEL FROM SYSMEX XT-4000I

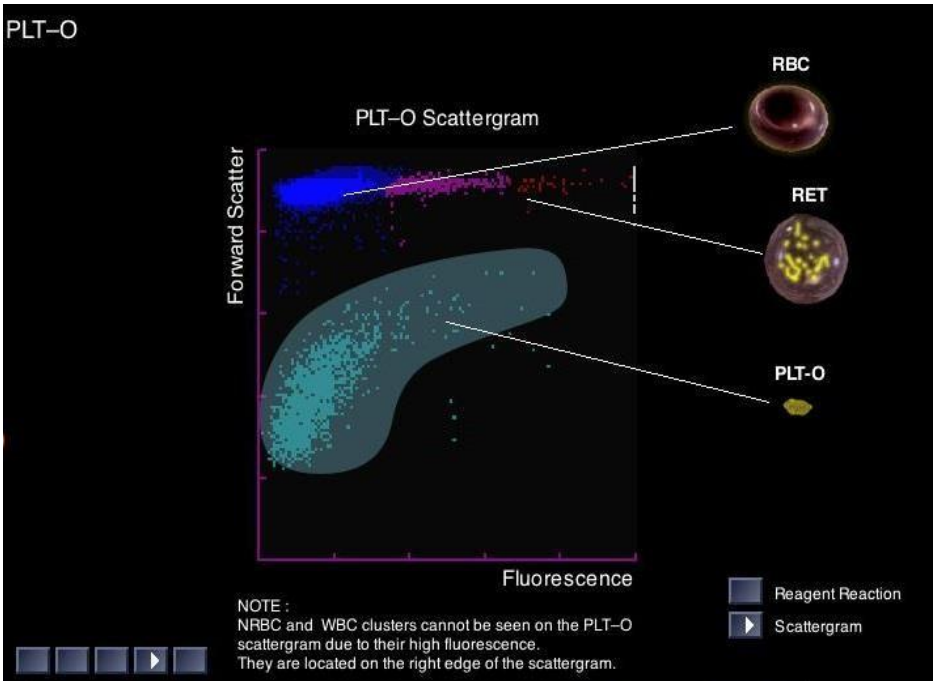


Figure 19: Example of scattergram on RET channel. Withdrawal from Sysmex XT-4000i CD-ROM.

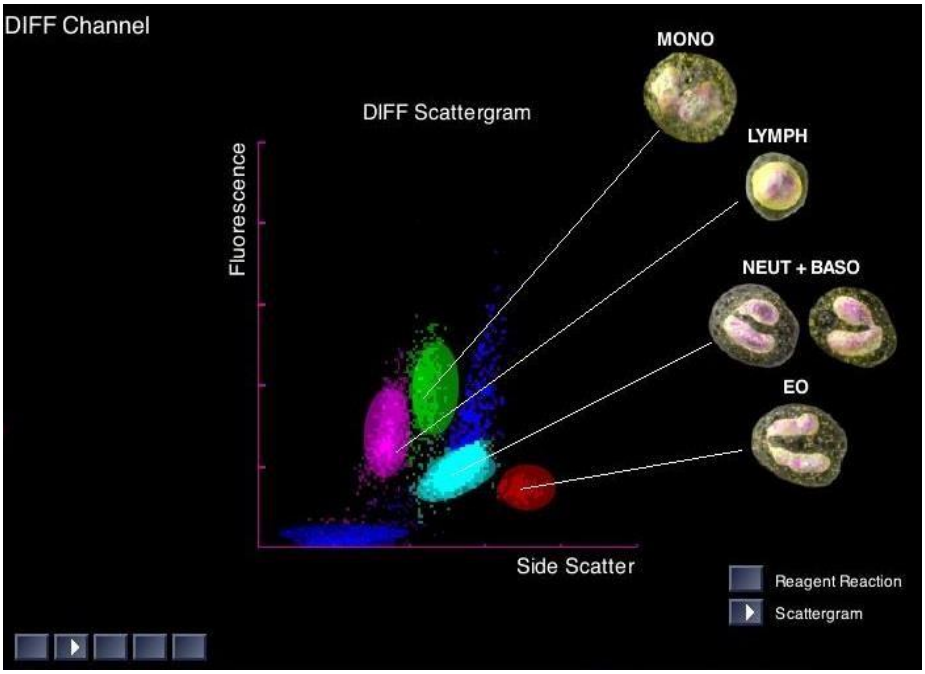


Figure 20: Example of scattergram on DIFF 6 channel. Withdrawal from Sysmex XT-4000i CD-ROM.

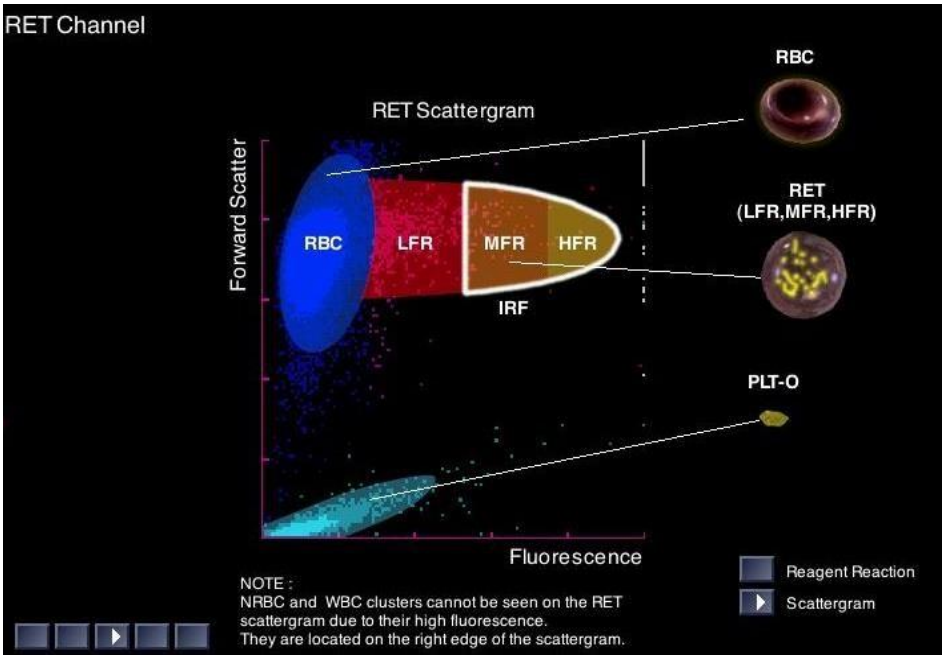


Figure 21: Example of scattergram on RET channel. Withdrawal from Sysmex XT-4000i CD-ROM.

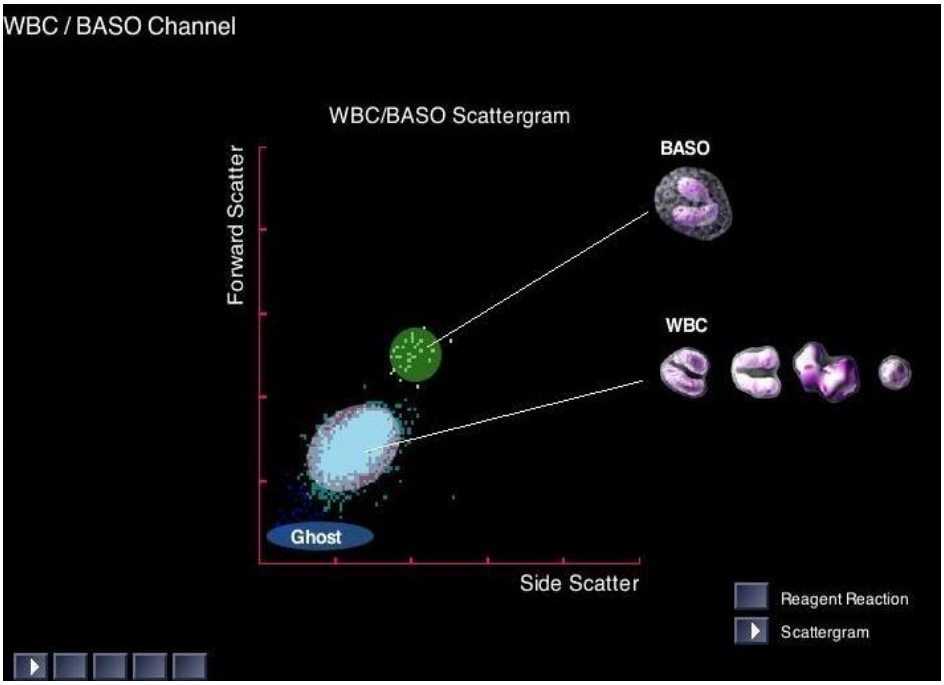


Figure 22: Example of scattergram on WBC/BASO channel. Withdrawal from Sysmex XT-4000i CD-ROM.

APPENDIX 8 - HEMACOLOR® STAINING

Hemacolor® staining results corresponds to the Pappenheimer stain, with predominantly magenta stained nuclei. This is based on the molecular interaction of the Eosin Y dye and a complex of Azur B with DNA. Both dyes assemble to an Eosin Y - Azur B-DNA complex and the intensity of the resulting stain depends on the content of Azur B and the ratio of Azur B : Eosin Y.

Procedure - Staining in the staining cell:

1. The slides must be immersed and moved into the solutions (simple immersion alone yields inadequate staining results);
2. The slides should be allowed to drip off well after the individual staining steps, as a measure to avoid any unnecessary cross-contamination of the solutions;
3. The stated times should be respected to guarantee an optimal staining results.

Table 22: Reagents and immersion times of Hemacolor® staining kit.

Reagents	Immersion time
Reagent 1 – Metanol (fixation)	5 x 1 sec
Reagent 2 – Eosyn Y (red dye)	3 x 1 sec
Reagent 3 – Azur B (blue dye)	6 x 1 sec
Reagent 4 – Buffer (pH 7,2)	2 x 10 sec
Air-dry	

Table 23: Results of Hemacolor® staining kit.

Type of cell	Coloration
Lymphocytes	Plasma blue-grey; azurophilic granules magenta;
Monocytes	Plasma mainly dove-blue
Neutrophilic granulocytes	Granules light violet
Eosinophilic granulocytes	Granules red to red-brown
Basophilic granulocytes	Granules dark violet to black
Thrombocytes	Violet
Erythrocytes	Reddish

APPENDIX 9 - HPLC

Chromatography is a laboratory technique that allows the separation of different particles of a mixture. The mixture is dissolved in a fluid (mobile phase), which carries it through an holding structure (stationary phase). The various constituents of the mixture have different characteristics, that makes them to travel at different speeds, causing them to separate. The stationary phase is either a solid, porous, surface-active material in small-particle form or a thin film of liquid coated on a solid support or column wall. The mobile phase is a gas or liquid. If a gas is used, the process is known as gas chromatography; if a liquid is used, the process is known as liquid chromatography.

HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) is based on the principle of chromatography but it relies on pressure pumps to pass a pressurized liquid solvent (mobile phase) containing the sample mixture through a column filled with a solid adsorbent material (stationary phase, usually silica). Each component in the sample interacts differently with the adsorbent material, causing different flow rates of the material and leading to the separation of the components as they flow out of the column. Because of the pressure pumps, pressures are significantly higher (50–350 bar) in HPLC, while ordinary liquid chromatography typically relies on the force of gravity to pass the mobile phase through the column. This makes HPLC a more efficient method (6).

An HPLC instrument has, at least, the elements shown in figure 19.

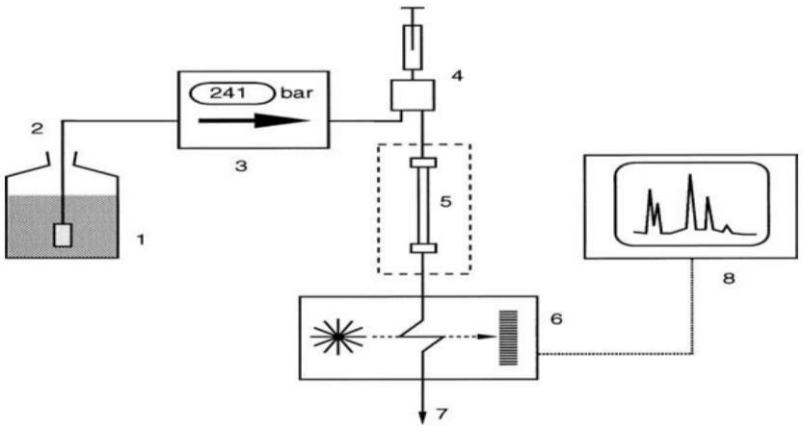


Figure 23: Schematic diagram of an HPLC unit. 1) Solvent reservoir; 2) transfer line; 3) pump (with manometer); 4) sample injection; 5) column (with thermostat); 6) detector; 7) waste; 8) data acquisition system. Withdrawn from (6).

APPENDIX 10 - ELFA

ELFA is a fluorescence enzyme immunoassay and is designed as a sandwich immunoassay. This assay is similar to EIA, except the enzyme catalyses a fluorescence reaction, instead of a colour reaction. This way, ELFA use antibodies to detect the presence of antigens. The substrate for the enzyme is most often a chromogen, colourless molecule that is converted into a fluorescent product. All ELFA involve an antibody molecule whose constant region binds an enzyme, leaving the variable region free to bind its specific antigen. The addition of a substrate for the enzyme allows the antigen to be visualized or quantified (in this case, by a fluorescent method) (21).

In total IgE quantification, IgE is coupled to solid phase, while in specific Ig quantification it is the allergen or the balanced mixture of inhalant allergens that is covalently coupled to solid phase (A). Once the sample is added, the IgE to be quantified will react with the fixed element in the solid phase.

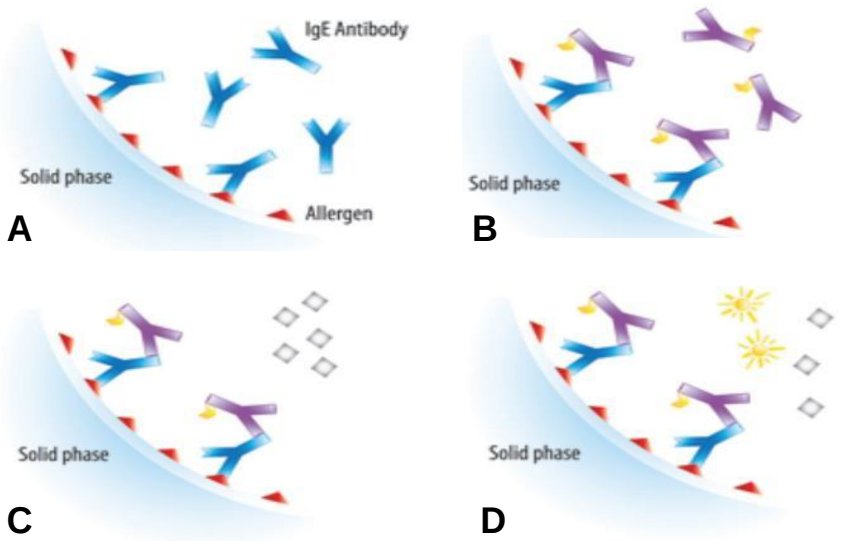


Figure 24: Sandwich immunoassay scheme performed at ImmunoCAP™ 250 for the quantification of specific IgE. Withdrawn from (5).

After washing, antibodies marked by an enzyme against IgE are added to form a complex (B). After incubation, the unbound labelled anti-IgE is washed away and the bound complex is incubated with the substrate (C). The enzyme transforms the substrate into a fluorescent product (D). Through comparing the fluorescence signal with that of calibrators of known concentrations, the antibody concentration in the test sample can be determined (5).

APPENDIX 11 - IFI ASSAY

The IIF is one of the most widely used methods for detecting autoantibodies present in human serum. The detection of patient' autoantibodies is done using a fixed antigen in the surface of a blade and an anti-IgG conjugate, marked with fluorescein. The advantages of using the IIF technique include its high specificity and signal amplification. Positive and negative samples produce a big difference in the strength of the signal, which translates into differences in fluorescence intensity observed.

For positive samples, the autoantibodies of the diluted sample bind to the solid phase coupled antigen substrate. In a second step, is added the marked human anti-IgG conjugate, that will connect to the autoantibodies. Subsequently fluorescence is observed using a microscope, equipped with a mercury lamp.

A wide range of antigen substrates is available to enable detection of a large number of antibodies and to achieve a high detection rate. Each antibody/conjugate bound shows a typical fluorescence pattern as a function of the location of the individual antigens. IIF also has the advantage of allowing detection antibodies simultaneously against several different antigens on a single biological substrate (7).

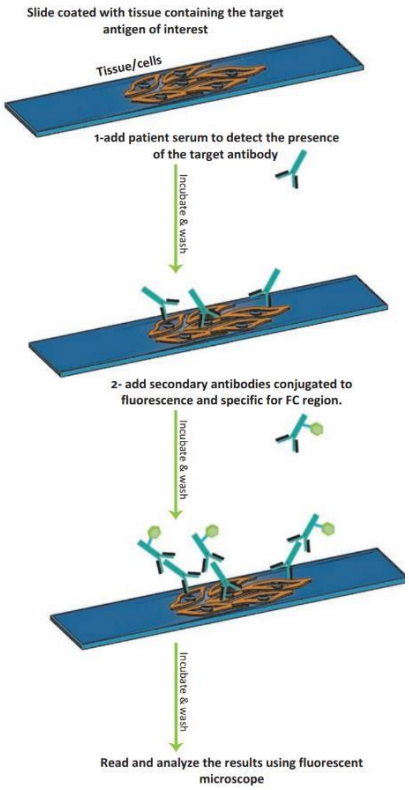


Figure 25: IIF Assay scheme. Withdrawn from (7).

APPENDIX 12 - THE INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TEST PERFORMED USING THE TITERPLANE TECHNIQUE

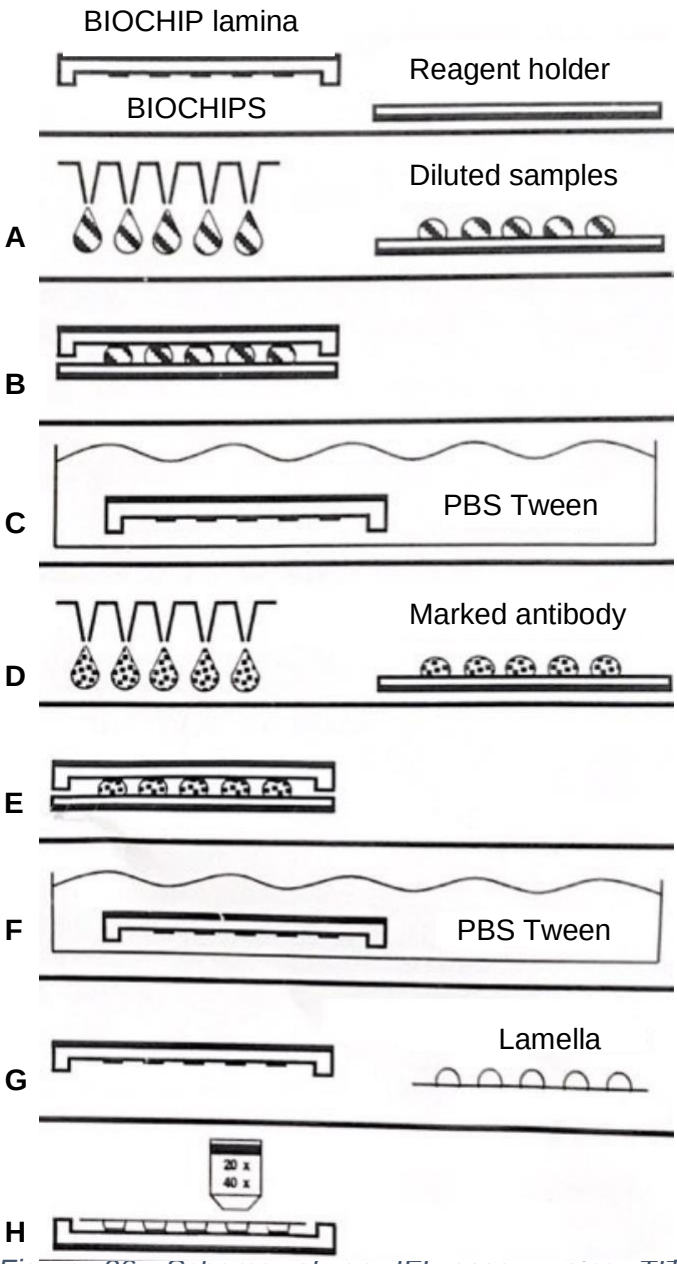


Figure 26: Scheme of an IFI assay using TITERPLANE technique.

A) Dilution: Dilute serum samples according to the user's test protocol. Include positive and negative controls with every test procedure. Mix control sera before use. Pipetting 30µl of the diluted per reaction field;

B) Hatching for 30 min;

C) Wash: Rinse the BIOCHIP Slides with a flush of PBS-Tween using a beaker, and immerse them immediately afterwards in a cuvette containing PBS-Tween for at least 5 min;

D) Pipette: Apply fluorescein-labelled anti–human immunoglobulin (conjugate) onto each reaction field of a clean reagent tray. The labelled anti-human serum should be mixed with a pipette before use;

E) Hatching for 30 min;

F) Wash in PBS Tween;

G) Embed: Place drops of the glycerol/PBS onto a cover glass. Use a polystyrene embedding template. Remove one BIOCHIP Slide from the PBS-Tween and dry the back and all four edges as well as the surface around, but not between, the reaction fields with a paper towel. Put the BIOCHIP Slide, with the BIOCHIPs facing downwards, onto the prepared cover glass. Check if the cover glass is properly fitted into the recesses of the slide.

H) Evaluate: Read the fluorescence under the microscope.