



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Pereira Moreira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Catarina Pereira Moreira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pela Professora Doutora Armanda Emanuela Castro e Santos e pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., no período entre 15 de março a 13 de agosto de 2021.

Abordagem às áreas clínicas de Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, referindo sucintamente as áreas de Hematologia e Química Clínica

Outubro de 2021

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Miguel Matos, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por toda paciência e dedicação durante estes dois anos de mestrado, mas também por toda perseverança em conseguir arranjar estágio para os seus alunos, numa época tão difícil.

Ao Doutor Luís Espírito Santo Nina, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, e meu orientador externo, pela oportunidade de estagiar no Serviço de Patologia Clínica do IPOFG e por toda a ajuda prestada.

À Professora Doutora Armanda Emanuela Santos e Castro, minha orientadora interna, por toda a dedicação, empenho, disponibilidade, orientação e prontidão no esclarecimento de todas as minhas dúvidas e por todo o tempo que despendeu na revisão, correções e sugestões de melhoria do relatório.

A toda a equipa multidisciplinar do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG e em particular aos orientadores dos diversos Setores, Dra. Maria Alexandre Mendes e Dr. Nuno Gonzaga na Microbiologia, Dr. Jorge dos Reis na Hematologia, Dr. Nuno Cunha, Dra. Sofia Carreiro e Dr. Jorge Pimenta na Imunologia, Dra. Ana Paiva e Dra. Ana Catarina Fonseca na Química Clínica, por todos os conhecimentos transmitidos e toda a ajuda prestada.

Aos meus pais e irmã, por todo o apoio incondicional, por me motivarem diariamente a seguir os meus objetivos e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado Filipe, por todo o apoio, paciência e palavras de incentivo naqueles dias menos bons.

E por fim, mas não menos importante, aos meus colegas de mestrado, em especial à Andreia Correia, por todo o apoio, paciência, motivação e companheirismo, sem ti esta experiência não teria sido tão memorável, levo-te comigo para a vida.

Obrigado!

Índice

Agradecimentos -----	v
Índice -----	vii
Índice de Figuras -----	ix
Índice de Tabelas -----	xi
Abreviaturas -----	xiii
Resumo -----	I
Abstract -----	I
Introdução -----	3
Caracterização do Laboratório de Estágio -----	4
Qualidade Laboratorial -----	5
Controlo de Qualidade -----	6
1. Controlo de qualidade interno -----	6
2. Controlo de qualidade externo -----	7
Hematologia -----	9
Química Clínica -----	10
Microbiologia -----	12
Setor de Microbiologia -----	12
1. Receção de amostras -----	13
2. Processamento Laboratorial das Amostras Biológicas -----	13
3. Exame Direto/ Técnicas de coloração -----	14
3.1. Coloração de Gram-----	14
3.2. Coloração de <i>Ziehl-Neelsen</i> modificada (Coloração de <i>Kinyoun</i>) -----	15
4. Meios de Cultura -----	16
5. Sangue -----	19
5.1. Exame Bacteriológico e Micológico-----	20
6. Secreções respiratórias -----	21
6.1. Exame Bacteriológico-----	23
6.2. Exame Micológico -----	23
6.3. Exame Micobacteriológico-----	24
7. Exsudatos Purulentos Superficiais e Profundos -----	25
7.1. Exame Bacteriológico e Micológico-----	26
8. Urina -----	26
8.1. Urocultura -----	27
8.2. Análise Sumária de Urina ou Urina Tipo II -----	28
9. Fezes -----	29
9.1. Exame Bacteriológico-----	30
9.2. Exame Parasitológico -----	31
10. Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana 31	
10.1. Técnicas de identificação-----	32
10.1.1. Provas bioquímicas auxiliares na identificação: -----	32
10.1.2. Galeria de identificação BD BBL™ <i>Crystal</i> ™ -----	33
10.2. Identificação e TSA: <i>Vitek</i> ®2 <i>Compact 15</i> -----	34

10.3.	Pesquisa de Mecanismos de Resistência: β -lactamases de Espectro Alargado (ESBL), AmpC e Carbapenemases.	37
10.4.	Testes de Biologia Molecular	39
Imunologia		41
Setor de Imunologia/Hormonologia		41
1.	Imunoensaios não competitivos ou “sandwich” e competitivos	43
2.	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)	43
3.	Nefelometria e Turbidimetria	44
4.	Quimioluminescência	44
5.	Eletroquimioluminescência	45
6.	Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)	46
7.	Radioimmunoassay (RIA)	46
MARCADORES TUMORAIS		47
1.	Antígenos Oncofetais	48
1.1.	Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	48
1.2.	α -Fetoproteína (AFP)	48
2.	Antígenos Tumorais	49
2.1.	Glicoproteína 15.3 (CA 15.3)	49
2.2.	Glicoproteína 125 (CA 125)	49
2.3.	Glicoproteína 19.9 (CA 19.9)	49
2.4.	Glicoproteína 72.4 (CA 72.4)	50
2.5.	Proteína Epidídima Humana 4 (HE-4)	50
3.	Citoqueratinas (CK)	50
3.1.	CYFRA 21.1	50
4.	Enzimas	51
4.1.	Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA)	51
4.2.	Antígeno Específico da Próstata (PSA), total e livre	51
4.3.	Enolase Neuro-específica (NSE)	52
5.	Proteínas	52
5.1.	β 2-microglobulina (BMG)	52
5.2.	Peptídeo libertador de gastrina (ProGRP)	53
5.3.	Proteína S-100	53
6.	Hormonas	53
6.1.	Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)	53
6.2.	Tiroglobulina (Tg)	54
6.3.	Calcitonina	54
7.	Outros Metabolitos	55
7.1.	Metanefrinas e Normetanefrinas	55
7.2.	Ácido Vanilmandélico (VMA)	55
7.3.	Ácido 5-hidroxi-indolacético	55
8.	Eletroforese de Proteínas Séricas (Proteinograma) e Imunofixação	56
Conclusão		58
Referências Bibliográficas		59
Anexos		66

Índice de Figuras

Figura 1- Carta de controlo estatístico; A-Processo sob controlo; B- Processo fora de controlo -----	7
Figura 2- Parede Celular de bactérias de Gram positivo (A) e Gram negativo (B) -----	14
Figura 3- A- Bacilos Gram Negativo; B- Cocos Gram Positivo em téttrada (Seta)-----	14
Figura 4- Garrafas para Hemoculturas: A- Garrafa de Hemocultura para Micobactérias; B- Garrafa de Hemocultura para microrganismos Anaeróbios; C- Garrafa de Hemocultura para microrganismos Aeróbios/Fungos -----	20
Figura 5- Saco de atmosfera anaeróbia: A-Gerador de atmosfera anaeróbia; B- Indicador de humidade; C- Saco de plástico para colocar as placas do meio -----	21
Figura 6- Amostra de expetoração corada pela técnica de Gram, representativa do grupo 5 dos critérios de <i>Murray-Washington</i> . -----	22
Figura 7- Amostra de Expetoração positiva para presença de BAAR (Seta)-----	24
Figura 8- Colónias com aspeto de “couve-flor” de <i>M. tuberculosis</i> em meio sólido de Lowenstein-Jensen-----	25
Figura 9- Sementeira quantitativa de uma amostra urina em meio sólido-----	28
Figura 10- Observação, na objetiva de 10x, de um ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> (seta), corado com soluto de Lugol -----	31
Figura 11- Esquema utilizado no Setor como guia para o processamento da identificação de bactérias. -----	32
Figura 12- Teste da Oxidase: A- Oxidase Positiva; B- Oxidase Negativa-----	33
Figura 13- Teste da Catalase: A- Catalase Negativa; B- Catalase Positiva -----	33
Figura 14- Sistema de identificação BD BBL™ Crystal™: A-Painel de 30 poços; B-Carta de leitura dos poços -----	33
Figura 15- Cartas de ID e TSA para o equipamento Vitek 2 Compact 15 -----	34
Figura 16- Testes de suscetibilidade antimicrobiana -----	36
Figura 17- Metodologia <i>E-test</i> -----	37
Figura 18- Pesquisa dos mecanismos de resistência: ESBL, AmpC e Carbapenemases, pelo método de difusão em disco em placa de MHE.-----	39
Figura 19- Imunoensaios (A) não competitivo ou "sandwich"; (B) competitivo -----	43
Figura 20- Imunoensaio EMIT -----	43
Figura 21- Imunoensaio de (A) Nefelometria e (B) Turbidimetria-----	44
Figura 22- Imunoensaio de Quimioluminescência -----	45
Figura 23- Imunoensaio de Eletroquimioluminescência -----	45

Figura 24- Imunoensaio TRACE-----	46
Figura 25- Radioimunoensaio -----	46
Figura 26- Alguns exemplos de Marcadores Tumorais que se podem determinar na clínica consoante o tipo de cancro-----	47
Figura 27- Mobilidade eletroforética no gel de agarose das proteínas séricas -----	56
Figura 28- Espectro do Perfil Eletroforético das Globuinas)-----	56
Figura 29- Imunofixação -----	57

Índice de Tabelas

Tabela I- Coloração de Gram.....	15
Tabela II- Coloração de <i>Kinyoun</i>	Erro! Marcador não definido.
Tabela III- Meios de Cultura utilizados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.....	17
Tabela IV- Critério de <i>Murray-Washington</i>	22
Tabela V- Critério de Quantificação de BAAR.....	24
Tabela VI- Cartas de Identificação utilizadas para o sistema automático <i>Vitek®2 Compact 15</i> associando os grupos de microrganismos que se pretendem identificar e respectivas densidades	35
Tabela VII- Cartas de TSA utilizadas no sistema automático <i>Vitek®2 Compact 15</i> associadas os grupos de microrganismos a determinar.....	35
Tabela VIII- Testes de Biologia Molecular realizados no setor de microbiologia do SPC do IPOFG.....	40
Tabela IX- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.	66
Tabela X- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.	67
Tabela XI- Equipamentos do Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG	68
Tabela XII- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Imunologia/Hormonologia do SPC-IPOCFG	69

Abreviaturas

25 – DTotal- Vitamina D total

5-HIAA- ácido 5-hidroxi-indolacético

AFP- Alfa fetoproteína

ALP- Fosfatase alcalina

ALT- Alanina amino-transferase

AST- Aspartato amino-transferase

ATCC- *American Type Culture Collection*

ATG- Anticorpo Anti-tiroglobulina aureus)

BAAR- bacilo-ácido-álcool-resistente

BHI- (meio) *brain heart infusion*

BIL D- Bilirrubina directa

BIL T- Bilirrubina total

BLSE- beta lactamases de espectro alargado

BMG- β 2-Microglobulina

C3- Factor 3 do complemento

C4- Factor 4 do complemento

Ca 125- Glicoproteína 125

Ca 15.3- Glicoproteína 15.3

Ca 19.9- Glicoproteína 19.9

Ca 72.4- Glicoproteína 72.4

CAL- Calcitonina

CAT- teste para deteção de atividade de carbapenemases

CEA- Antígeno carcinoembrionário

CHUC- Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

CK- Citoqueratinas

CLED- (meio) cistina-lactose-deficiente em eletrólitos

CLIA- Ensaio ImunoQuimioluminescentes

Cl⁻- Ião cloreto

CNA- (meio) Columbia com sangue, colistina e ácido nalidíxico

COS- (meio) Columbia

CQE- Controlo de Qualidade Externo

CQI- Controlo de Qualidade Interno

CRH- Hormona libertadora da corticotrofina

DGS- Direção Geral de Saúde

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ECLA- Ensaios

Electroquimioluminescentes

EPO- Eritropoietina

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FISH- Hibridização *In Situ* por Fluorescência

FSH- Hormona estimulante do folículo

FT3- Triiodotirina 3 livre

FT4- Tiroxina livre

GH- Hormona de crescimento

GN- caldo para bactérias Gram negativas

GnRH- Hormona libertadora das gonodotrofinas

HbA1C- Hmoglobina glicosilada

ID- teste de identificação

IgA- Imunoglobulina A

IgD- Imunoglobulina D

IgE- Imunoglobulina E

IGF-I- Factor de crescimento similar da insulina I

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

INSA- Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge

IPOCFG- Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

ITU- Infecção do Trato Urinário

K⁺- Ião potássio

KCS- (meio) Schaedler com vitamina

LDH- Lactato desidrogenase

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

LH- Hormona luteinizante

LJ- (meio) *Löwenstein Jensen*

MGIT- tubo indicador do crescimento de micobactérias

MH- (meio) Mueller-Hinton

MIC- Concentração Inibitória Mínima (*minimum inhibitory concentration*)

MRSA- *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

Na⁺- Ião sódio

NAD- dinucleótido de nicotinamida adenina (nicotinamide adenine dinucleotide)

β-hCG- Gonadotrofina coriónica human

NH- carta de identificação de *Neisseria e Haemophilus*

NSE- Enolase neuro específica

PCR- Proteína C reactiva

PCT- Procalcitonina

PSA- Antígeno específico da próstata

PTH- Hormona paratiróide

PT- Proteínas totais

RIA- Radioimunoensaio

RIQAS- *Randox International Quality Assessment Service*

RT-PCR- reação de polimerase em cadeia em tempo real

SCCA- Antígeno do carcinoma de células escamosas

SCG2- (meio) Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina

SCS- (meio) Schaedler

SPC- Serviço de Patologia Clínica

T3- Triiodotironina total

T4- Tiroxina total

TG- Tiroglobulina

TSA- Testes de suscetibilidade a Antimicrobianos

TSH- Hormona estimuladora da tiróide

UFC- unidades formadoras de colónia

VMA- Ácido Vanilmandélico

Resumo

No âmbito da disciplina de Estágio/Projeto, do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, foi realizado o estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil.

Tendo em foco a aplicação dos conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do mestrado referido, foram realizadas diversas atividades em laboratório que serão descritas no presente relatório. Além da descrição das atividades, este relatório tem como objetivo retratar a rotina de trabalho de um laboratório de análises clínicas, que necessita de prestar resultados rápidos e fiáveis para o diagnóstico e monitorização de diversas patologias, em particular as oncológicas.

Neste relatório serão abordadas todas as áreas clínicas, tendo maior incidência nas áreas da Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, referindo sucintamente as áreas da Hematologia e Química Clínica.<

Palavras-chave. Análises Clínicas, Oncologia, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia

Abstract

Within the scope of the Internship/Project subject of the Master's Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, a curricular internship was carried out in the Clinical Pathology Department of the Portuguese Institute of Oncology of Coimbra Francisco Gentil.

Focusing on the application of the theoretical and practical knowledge acquired during the mentioned master's degree, several laboratory activities were carried out, which will be described in this report. Besides describing the activities, this report aims to portray the work routine of a clinical analysis laboratory, which needs to provide fast and reliable results for the diagnosis and monitoring of several pathologies, particularly oncological ones.

This report will cover all clinical areas, with greater focus on the areas of Microbiology and Immunology/Hormonology, briefly mentioning the areas of Hematology and Clinical Chemistry.

Keywords. *Clinical Analysis, Oncology, Microbiology and Immunology/Hormonology*

Introdução

A doença oncológica tem sido alvo de inúmeros estudos, sendo um problema de saúde pública cada vez mais grave (Gomes *et al.*, 2010), visto que resulta de uma interação complexa entre fatores ambientais (envelhecimento da população, tabaco, álcool, exposição solar, radiação ionizante, infeções, dieta inadequada, determinados químicos e outras substâncias, entre outros fatores) e suscetibilidade genética (Simões, 2016; Liga nacional contra o cancro; Stein e Colditz, 2004), por isso é fundamental que haja um conhecimento aprofundado, para que o diagnóstico vise o tratamento precoce e/ou a monitorização da doença.

Para que o diagnóstico da doença oncológica e a monitorização dos doentes possam ser rápidos e eficazes, o laboratório de análises clínicas promove a interligação entre a Oncologia e o diagnóstico clínico, sendo que é um dos muitos ramos onde se unem inúmeros conhecimentos, dispondo de equipas especializadas e multidisciplinares, que visam complementar os resultados clínicos, ajudando no rastreio, na exatidão do diagnóstico, na prevenção e na monitorização da doença, para que seja possível melhorar a qualidade de vida do doente oncológico (Liga nacional contra o cancro; Martelli, 2011).

No âmbito do estágio curricular, realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil (IPOCFG, E.P.E), iniciado a 15 de março de 2021 e terminado a 13 agosto de 2021 (com a duração de 5 meses), existiu a oportunidade de contactar com a rotina e exigência de um laboratório de análises clínicas e a sua vasta complexidade de amostras, bem como de presenciar a interligação dos resultados clínicos de diversas áreas, para que se consiga promover o bem-estar e conforto do doente oncológico.

Com a realização do estágio, conseguiu-se consolidar, aprofundar e por em prática todos os conhecimentos teórico-práticos abordados no plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas, realçando especialmente o contato com as áreas de Hematologia, Química Clínica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, que constituem o SPC do IPOCFG.

Este estágio, e mais concretamente o trabalho desenvolvido no SPC, permitiu uma reflexão mais aprofundada sobre interação com o doente oncológico, mesmo de modo indireto, lembrando que a obtenção de resultados clínicos rápidos, eficazes e íntegros, possibilitam um diagnóstico atempado e um planeamento terapêutico personalizado, com vista à obtenção de cuidados que melhoram substancialmente a qualidade de vida do doente.

Existindo uma maior diversidade de metodologias, amostras e análises nas áreas de Microbiologia e da Imunologia/Hormonologia, optou-se por aprofundar conhecimentos

nestas duas grandes áreas. Faz-se também menção às áreas de Hematologia e Química Clínica, referindo sucintamente a rotina laboratorial destes setores.

Caracterização do Laboratório de Estágio

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, Entidade Pública Empresarial (IPOCFG, E.P.E), tem como missão a prestação de cuidados de saúde, a prevenção, a investigação, o rastreio, a formação, e o acompanhamento oncológico nacional, sendo uma instituição de referência para os cidadãos e serviços de saúde, tendo responsabilidade de topo no diagnóstico, tratamento e monitorização das doenças oncológicas em toda a região centro (IPO Coimbra).

Inserido nesta instituição está o Serviço de Patologia Clínica (SPC), que se situa no edifício de Oncologia Médica e Laboratórios (piso 0), que tem um papel fulcral no seguimento dos doentes, bem como no seu tratamento. O SPC é dirigido pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina, Médico especialista em Patologia Clínica, que conta com o apoio e ajuda de vários profissionais de saúde com especialidades variadas, desde os médicos especialistas, aos técnicos superiores de saúde (TSS): como farmacêuticos, biólogos e bioquímicos; técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TSDT), pessoal administrativo e assistentes auxiliares. Este serviço dispõe de diversos espaços comuns como o secretariado/atendimento ao público, salas de colheitas e de triagem, gabinetes de direção, gabinete médico, sala de tratamento de materiais, salas de arrumos e uma sala polivalente/descanso. A área laboratorial divide-se em cinco setores: a Microbiologia, a Hematologia, a Imunologia/ Hormonologia, a Química Clínica e o mais recente, a Virologia. Este último, não vai ser abordado neste relatório devido há impossibilidade de estagiar neste setor, que abriu ao público em fevereiro de 2020 e tendo como objetivo o rastreio do Sars-Cov-2, quer de todos os funcionários quer dos doentes. Os departamentos e serviços complementam-se entre si para proporcionar uma resposta eficiente, multidisciplinar e integrada neste tipo de cuidados de saúde.

O SPC tem um fluxo diário médio de 400 a 500 amostras, preocupando-se em garantir uma boa qualidade a todos os procedimentos analíticos desde o atendimento até à emissão do relatório clínico.

Qualidade Laboratorial

A qualidade laboratorial pode ser dividida em 3 fases, a fase Pré-analítica, a fase Analítica e a fase Pós-analítica (Atay *et al.*, 2014). A fase pré-analítica diz respeito a todas as etapas anteriores à fase analítica, que vão desde a requisição do exame pelo clínico, à preparação do utente, colheita da amostra, triagem, transporte e armazenamento das amostras. Nesta fase também se processa a manutenção dos equipamentos, as calibrações e os controlos de qualidade.

É na fase pré-analítica que geralmente ocorrem mais erros, visto que há dificuldade em controlar as variáveis anteriores ao processamento da amostra. (Marques-Garcia *et al.*, 2015; Magnette *et al.*, 2016). A maioria dos erros devem-se a requisições incorretas, etiquetagem inadequada das amostras, volume de amostra insuficiente, confusão na utilização de tubos, hemólise ou presença de coágulos, entre outros (Guimarães *et al.*, 2011). Qualquer um destes erros nesta fase irá influenciar os resultados emitidos, podendo assim levar a falsos positivos e/ou negativos e conseqüentemente a um diagnóstico ineficaz e terapêuticas incorreta (Ashakiran, Sumati e Murthy, 2011).

A fase analítica começa após a solicitação dos parâmetros analíticos, por pedido do médico, através do sistema informático. Após a retificação pelo pessoal administrativo dos dados do utente, no sistema informático *Modulab (Werfen)*, começa o percurso das amostras pelo Serviço de Patologia Clínica (SPC). É atribuído a cada utente um código de barras que é composto por um número de dia, caracterizado por 9 dígitos, ou seja, ano/mês/dia/número de amostra, preparando assim todas as amostras que são necessárias para as análises requisitadas. A seguir à colheita das amostras (sangue, urina, fezes, expetorações, etc.) é feita a sua triagem, sendo depois distribuídas pelos diferentes setores. Uma vez nos respetivos setores, é dada a entrada destas no sistema informático, segue-se a fase analítica, na qual vão decorrer os ensaios necessários à determinação dos parâmetros analíticos solicitados pelo médico.

A fase final do processo corresponde à fase pós-analítica, relativa à interpretação e validação dos resultados clínicos, sendo depois emitido o relatório clínico (Ashakiran, Sumati e Murthy, 2011).

Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade é definido como um sistema de programas que proporcionam as condições necessárias para a melhoria da qualidade que deve ser implementada e mantida com o intuito de atingir a satisfação do cliente, resolvendo não conformidades e promovendo melhorias no sistema, bem como a melhoria da qualidade analítica que se irá traduzir numa maior fiabilidade, exatidão e reprodutibilidade dos resultados (Martelli, 2011; Magnette *et al.*, 2016).

O objetivo do laboratório de análises clínicas é assegurar, de uma forma fidedigna e cuidada, os resultados dos processamentos de cada amostra, para que se possa determinar e realizar o diagnóstico, tratamento e prognóstico das doenças (Chaves, 2010). Para que não ocorram erros laboratoriais graves que possam colocar em risco a saúde do doente e o diagnóstico clínico, é imprescindível uma boa gestão da qualidade, para que o laboratório seja capaz de identificar ou corrigir as possíveis falhas que possam ter ocorrido (Berlitz, 2010).

Para que haja um bom controlo de qualidade, é necessário ter em conta todas as etapas do processo, nas quais estão compreendidas as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Chaves, 2010). A garantia da qualidade de todas as fases pode ser conseguida por meio da padronização de cada uma das atividades envolvidas, desde o atendimento ao paciente até à libertação do relatório clínico (Chaves, 2010). E sendo que, a nível laboratorial, cada vez mais são utilizados métodos de automatização, isto obriga ainda mais a uma implementação de programas de controlo de qualidade mais rigorosos.

Para garantir a qualidade e eficácia de todos os procedimentos analíticos, são efetuados dois tipos de controlo de qualidade: o Controlo de Qualidade Interno (CQI) e o Controlo de Qualidade Externo (CQE).

I. Controlo de qualidade interno

Este tem como objetivo a avaliação da reprodutibilidade e a precisão dos métodos utilizados. Nos setores de Imunologia/Hormonologia, Hematologia e Química Clínica este controlo realiza-se diariamente recorrendo a amostras comerciais, para que todos os parâmetros analíticos sejam assegurados e que estes se encontrem dentro dos valores de referência pretendidos. Estes controlos das firmas comerciais, que são utilizados nos diversos equipamentos, apresentam três níveis (normal, alto e baixo) e são processados no início do fluxo de trabalho, isto é, antes das amostras dos utentes, para que se necessário, sejam aplicadas as ações corretivas para que os resultados sejam viáveis.

Os valores obtidos são analisados através das cartas de controlo de *Levey-Jennings*, tendo por base as regras de *Westgard*. Consideramos que o método está sob controlo, quando os valores obtidos se distribuem em torno da linha média central aleatoriamente (Figura I-A). Se alguma das regras forem ultrapassadas (Figura I-B), é preciso investigar o motivo do erro, para que seja possível a sua correção. São adotadas medidas como a repetição do ensaio com amostras e controlos, uso de um novo lote de reagentes ou mesmo a calibração do equipamento para que seja possível corrigir o motivo do erro detetado no processamento da amostra controlo.

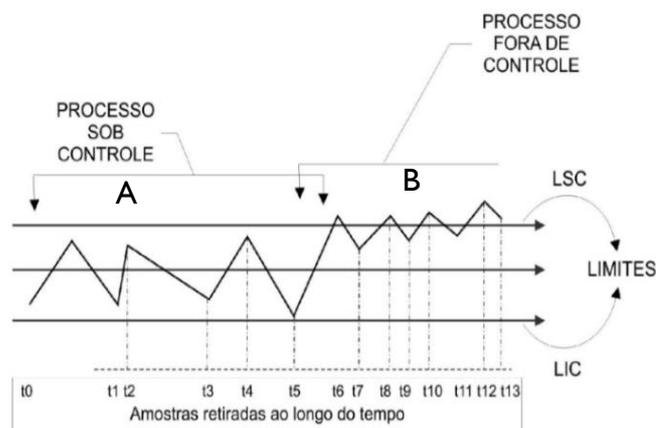


Figura I- Carta de controlo estatístico; A-Processo sob controlo; B- Processo fora de controlo (Adaptado de: Carneiro Neto W. Controlo estatístico de processo)

No Setor de Microbiologia o controlo decorre de modo diferente, visto que este setor ainda depende muito de técnicas manuais. Assim sendo, é realizado diariamente um controlo das temperaturas dos frigoríficos e das estufas. O controlo da esterilidade da solução salina, dos corantes e dos meios de cultura/reagentes, é feito semanalmente aquando da utilização de um novo lote e sempre que se verifiquem inconsistências que o justifiquem. Por último, é realizado mensalmente o controlo de esterilidade do equipamento automático *Vitek®2 Compact 15* da *bioMérieux*, utilizando estirpes da *American Type Culture Collection (ATCC)*, cuja identificação (ID) e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (TSA) é conhecida, permitindo assim a confirmação da qualidade das cartas de ID e TSA.

2. Controlo de qualidade externo

Este tem como objetivo avaliar a exatidão dos métodos laboratoriais utilizados pelo laboratório, comparando depois o seu desempenho com os resultados laboratoriais de outros laboratórios de referência, que se faz uma ou duas vezes por ano consoante o setor.

No SPC, os setores de Imunologia/Hormonologia, Hematologia e Química Clínica participam em vários programas de controlo externo de qualidade, o programa nacional de avaliação externa da qualidade do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e um programa internacional, o *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)*. Os Setores recebem as amostras, onde a concentração dos analitos é desconhecida. Estas são depois processadas como se fossem amostras normais de doentes, e após o seu processamento os

resultados são enviados para as entidades respetivas (INSA ou RIQAS). Posteriormente, as entidades responsáveis reportam o relatório final, onde é possível comparar os resultados obtidos no laboratório, com os resultados obtidos noutros laboratórios que participaram no mesmo programa de controlo de qualidade.

O setor de Microbiologia distingue-se mais uma vez dos restantes setores, mas também participa num programa de avaliação externa da qualidade nacional e internacional. Para os ensaios parasitológicos, realizam-se 3 ensaios por ano e é aplicado o programa nacional do INSA, enquanto que para os ensaios bacteriológicos e micológicos se realizam 4 ensaios por ano onde é aplicado o programa internacional da *External Quality Assessment Programmes, LabQuality, Finland*. As amostras para o CQE vêm liofilizadas e acompanhadas de uma breve história clínica. Estas precisam inicialmente de ser hidratadas e depois seguem o seu processamento normal como se fossem uma amostra de um doente. Por fim, os resultados obtidos são enviados à respetiva entidade.

Hematologia

O Setor de Hematologia do SPC apresenta-se coordenado pela Dra. Isabel Joana Diamantino, Médica Assistente Graduada e Especialista em Patologia Clínica.

Neste Setor são realizadas diversas análises a fim de identificar e monitorizar os tipos de doenças hematológicas, tendo por base o estudo de todos os componentes sanguíneos.

As amostras, quando chegam a este Setor, são separadas consoante o exame pedido:

- Hemogramas: onde se avaliam todas as alterações dos parâmetros inerentes às células da série vermelha, branca, plaquetas e reticulócitos (quando estes são solicitados) e determinação da velocidade de sedimentação. São observados dos esfregaços de sangue periférico ao microscópio e colorações de esfregaços sanguíneos, recorrendo à coloração de *Wright-Giemsa* em sistema automático.

- Com menor frequência, as lâminas com os esfregaços e aspirados de medula óssea são coradas, de modo automático, pela coloração de *Wright-Giemsa*. Existindo ainda outro tipo de lâminas coradas manualmente pela coloração de *Perls*, onde nesta, são avaliados os depósitos de ferro presentes nos eritroblastos.

Numa outra sala, procede-se à avaliação da cascata de coagulação e hemostase, imunofenotipagem por Citometria de Fluxo e preparação de amostras para a pesquisa e quantificação do gene de fusão BRC-ABL por *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e pesquisa de alterações genéticas por Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH).

Neste setor a amostra mais frequente é o sangue total, que é recolhido para tubos de EDTA tripotássico (K₃-EDTA) para que se evite a coagulação sanguínea, garantindo assim que todas as células se encontram em suspensão na amostra. Este tubo de K₃-EDTA permite que o cálcio seja quelado inibindo assim a coagulação, o que permite a conservação das células, como os leucócitos e eritrócitos, evitando a hemólise e preservando a morfologia celular. Estes tubos são colocados num agitador, durante 10 minutos, até serem processados, permitindo que a amostra de sangue permaneça homogénea para que se evitem erros na determinação dos diversos parâmetros. Para os estudos da coagulação, a amostra é colhida para um tubo com citrato de sódio, sendo posteriormente centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos, obtendo-se um plasma pobre em plaquetas.

No Anexo I encontram-se indicados a tabela dos equipamentos e os parâmetros analisados no Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

Durante a estadia neste setor, foi realizado o acompanhamento de toda a rotina de trabalho, desde a receção dos tubos das amostras, à realização dos hemogramas, bem como o acompanhamento dos testes de coagulação e análise de controlos de qualidade.

Relativamente à execução das técnicas manuais, existiu a oportunidade de realizar esfregaços de sangue periférico, de visualização dos mesmos ao microscópio e de contagem diferencial de forma a corroborar os resultados do hemograma.

Química Clínica

O Setor de Química Clínica está sob orientação da Dra. Ana Raquel Paiva, médica assistente e especialista em Patologia Clínica.

Este Setor também apresenta grande autonomia, sendo que é um dos setores mais automatizados, onde se realiza a análise bioquímica de diversos parâmetros, tendo por base diversos tipos de amostras.

A amostra mais frequente é o soro, mas neste setor também se recebe, sangue total, urina ocasional ou de 24h. O soro é obtido, através da centrifugação (3000 rpm durante 10 minutos) do sangue total, que é colhido para tubos com esferas de sílica que favorecem a ativação da cascata de coagulação fisiológica. Também se recebem outros tipos de líquidos orgânicos, para realização das análises bioquímicas, apesar de não serem tão comumente pedidos, como líquido cefalorraquidiano (LCR), líquidos ascíticos e líquido pleural, entre outros. Estas amostras requerem um tratamento prévio antes do seu processamento, como homogeneização e centrifugação.

Após a preparação prévia dos produtos biológicos é crucial remover todos os artefactos/interferentes, para que as amostras possam seguir o seu circuito de processamento. No caso do soro, é crucial verificar a existência de fibrina, pois esta pode interferir na aspiração da amostra nos equipamentos. Após centrifugação, se for observada uma amostra hemolisada, esta deve ser rejeitada e realizada nova colheita para que não haja erros nos resultados analíticos, visto que a hemólise irá traduzir um aumento dos valores séricos de potássio (K^+), da lactato desidrogenase (LDH) e de outras enzimas intracelulares. Também as amostras ictéricas e lipémicas têm uma análise cuidada, visto que estas condições podem influenciar a absorvância das determinações analíticas.

Relativamente às amostras de sangue total, estas são recebidas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio (K_3 -EDTA), para a determinação da hemoglobina glicada (HbA1C) e de marcadores da função cardíaca. Para a determinação do cálcio ionizado, é colhido sangue venoso em seringas de heparina equilibrada eletrolicamente. Estas seringas evitam que o cálcio da amostra seja consumido no processo de coagulação e permite também que as concentrações dos iões se mantenham constantes. Este Setor também recebe amostras de sangue arterial em seringas para a realização de gasometrias. Estas são metodologias

invasivas e urgentes, sendo apenas realizadas pelos clínicos, que permitem avaliar a pressão parcial de gases no sangue, determinação do pH, e fornecem-nos informações acerca do equilíbrio ácido-base dos doentes. Estas amostras quando chegam ao laboratório devem ser processadas o mais rapidamente possível e os resultados clínicos devem ser transmitidos de imediato para o médico.

Este setor, apesar de ser muito automatizado, ainda realiza algumas técnicas serológicas manuais, mais especificamente técnicas de aglutinação que têm por base reações antigénio-anticorpo, cuja leitura é realizada macroscopicamente. Realizam-se testes de *Waler Rose* (deteção de fatores reumatóides), de *RPR – Nosticon II* (diagnóstico da Sífilis), de *Avitex SLE* (diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistémico) e testes de *Wright* (diagnóstico de Brucelose), entre outros. De uma forma geral as amostras, quando comparadas com os controlos positivo e negativo (com aglutinação e sem aglutinação, respetivamente) são positivas quando se observa aglutinação.

No Anexo 2 encontram-se indicados a tabela dos equipamentos e os parâmetros analisados no Setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.

Durante a passagem por este setor, foi realizado o acompanhamento de todo o percurso das amostras, desde o registo ao processamento e validação dos resultados, tendo sempre em atenção a interligação dos valores obtidos com a história clínica do doente. Acompanhou-se também o controlo de qualidade, inclusive a leitura de cartas de *Levey-Jennings* consoante as regras de *Westgard* e as calibrações dos equipamentos.

Microbiologia

Os microrganismos são um grupo muito diverso e estão presentes em todos os ecossistemas, estando também integrados no organismo humano, mantendo uma relação de equilíbrio com este (Nester, Anderson e Roberts, 2016). Nesta relação benéfica, podemos destacar as bactérias devido à sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Quando o sistema imunitário do homem está debilitado esta relação pode alterar-se, por proliferação de maneira anómala, tornando-se patogénica. Num ambiente hospitalar, a incidência e a interação dos microrganismos com os indivíduos, tornam-se maiores (Khan, Baig e Mehboob, 2017), devido a fatores que levam à depressão do sistema imunológico dos doentes, como a idade, doenças subjacentes, uso de procedimentos invasivos (catéteres, ventilação mecânica, entre outros), bem como com a resistência a determinados fármacos por parte dos microrganismos, o que representa um problema preocupante e complexo de saúde pública (Monteiro, 1993). Também o uso inapropriado de antibióticos, entre outras razões, fazem do ambiente hospitalar o habitat ideal para a disseminação de estirpes multirresistentes (Khan, Baig e Mehboob, 2017; Sydnor e Perl, 2011).

No IPOCFG, a maioria dos utentes são doentes oncológicos, logo esta temática torna-se importante pois o seu sistema imunológico já se encontra muito debilitado. Assim sendo, é imprescindível que as amostras colhidas sejam adequadas, para que se consiga chegar a um diagnóstico acertado e seja possível a erradicação do agente causador da infeção. Para que assim seja, a amostra tem de ser representativa do local da infeção, logo tudo deve ser feito para se evitarem quaisquer contaminações, quer cruzadas, quer devido à microbiota do indivíduo aquando da colheita das amostras.

Setor de Microbiologia

O Setor de Microbiologia do SPC, está sob a responsabilidade da Dra. Maria Alexandre Vaz Mendes, Farmacêutica Assistente e Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos.

A Microbiologia é o setor menos automatizado do SPC, no entanto, este setor dispõe de diversos equipamentos que proporcionam uma ajuda na rotina de trabalho. No Anexo 3 encontram-se descrita a tabela dos equipamentos utilizados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Comparando o fluxo de amostras recebidas com as dos restantes setores do SPC, este Setor apresenta uma variedade mais diversificada, desde sangue, urina, secreções respiratórias, fezes, exsudatos, pontas de cateter e fâneros, entre outras. São analisados diversos

parâmetros para que se consiga identificar a presença do microrganismo causador da infeção e para seja possível definir o seu perfil de suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos.

I. Receção de amostras

As amostras que chegam ao setor vêm previamente identificadas e acompanhadas de uma requisição, onde está presente a identificação do utente, a identificação do clínico, os exames pedidos, a informação clínica, caso seja relevante, e a natureza do produto biológico. Aquando da receção da amostra, é necessário confirmar se esta cumpre todos os requisitos para o seu processamento, tais como: quantidade de produto biológico e modo de acondicionamento, entre outros motivos que possam levar à sua rejeição. Depois desta confirmação, a amostra é registada no sistema informático *Modulab*, onde é gerado um número de cultura, que corresponde aos diversos tipos de exames a realizar (bacteriológico, micológico e, quando requerido, micobacteriológico).

Aquando deste procedimento inicial, são impressas as etiquetas de identificação do material biológico e dos diferentes meios de cultura a semear, sendo também impressa a folha de trabalho usada para seguimento da amostra.

A análise detalhada de todas as amostras processadas, juntamente com as folhas de trabalho, inicia-se todas as manhãs com o intuito de averiguar e interpretar os resultados das culturas de microrganismos e dos testes de Identificação (ID) e de Suscetibilidade Antimicrobiana (TSA) pesquisados.

2. Processamento Laboratorial das Amostras Biológicas

No Setor de Microbiologia, trabalha-se de modo a concretizar todas as regras de segurança de modo a minimizar o risco de contaminação, evitando que ocorram erros que possam interferir com a análise dos resultados, bem como gerar falsos positivos. Para isto todo o Setor segue regras de segurança como: o uso obrigatório de bata e luvas, a manipulação das amostras na câmara de fluxo laminar e todo o material contaminado (ansas, lâminas, agulhas e seringas) é colocado em contentores específicos para posterior tratamento/eliminação.

Tendo em conta o tipo de amostra e os exames pedidos pelo clínico, o processamento laboratorial varia de modo a que seja possível a chegar à identificação dos microrganismos patogénicos, e este procedimento ocorre por diversas etapas: o exame macroscópico, o exame microscópico direto, o exame cultural, a identificação presuntiva e o isolamento dos microrganismos para posterior ID e TSA.

3. Exame Direto/ Técnicas de coloração

3.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é muito utilizada nos laboratórios de microbiologia, sendo o primeiro passo para a caracterização das bactérias que possam estar presentes nas amostras biológicas (Coico, 2006). Esta análise preliminar permite ao técnico de laboratório ter uma ideia geral do microrganismo causador da infecção, até que se obtenham os restantes dados das amostras cultivadas.

Esta coloração consiste numa técnica diferencial, uma vez que diferencia as bactérias com base na sua parede celular, tendo em conta a sua composição química e estrutural.

(Mahon, Lehman e Donald, 2018; Jorgensen, Carrol e Funke, 2015).

Assim podemos distinguir as bactérias Gram-positivo (Figura 2-A), que têm uma parede celular que contém uma camada espessa de peptidoglicano e que aprisionam o complexo violeta de genciana e soluto de lugol, ficando assim coradas de roxo, das bactérias Gram-negativo

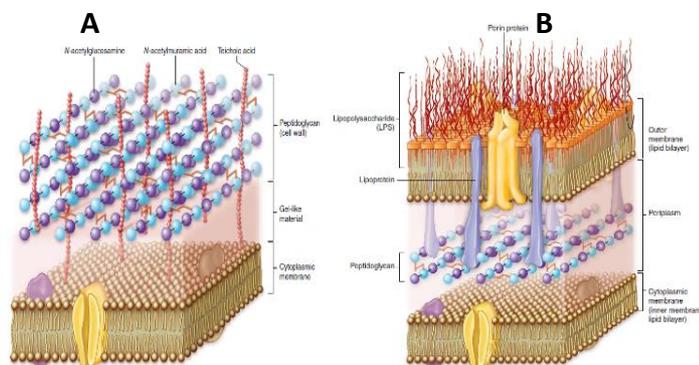


Figura 2- Parede Celular de bactérias de Gram positivo (A) e Gram negativo (B) (Adaptada de: Microbiology: A Human Perspective)

(Figura 2-B) que possuem uma parede celular com uma camada fina de peptidoglicano e alto teor de lipídios e que não retêm o complexo violeta de genciana e soluto de lugol, após o tratamento com o descorante, ficando assim coradas de rosa (Cappuccino e Welsh, 2017).

Esta técnica permite também distinguir as bactérias com base na sua morfologia, como bacilos (Figura 3-A) ou cocos (Figura 3-B), tornando-se assim útil para o diagnóstico preliminar, bem como a avaliação da pureza das amostras (Beveridge, 2001).

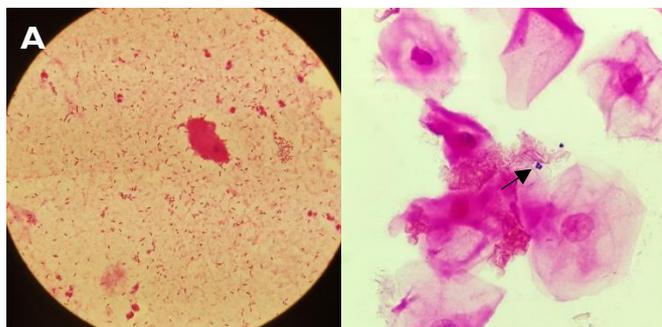


Figura 3- A- Bacilos Gram Negativo; B- Cocos Gram Positivo em tetrada (Seta) (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

A Tabela I representa o processamento da técnica de coloração de Gram.

Tabela I- Coloração de Gram

Esfregação da amostra, na lâmina, fixado por calor			
Reagentes	Violeta de Genciana (Corante Primário)	1 minuto	Tempo
	Soluto de Lugol (Mordente)	30 segundos	
	Álcool-Acetona (Descorante)	Gota-a-gota até descorar	
	Lavar com água corrente		
	Fucsina Básica/Safranina (Corante Secundário)	30 segundos	
	Lavar com água e secar		

No SPC, a coloração de Gram também é feita de modo automático, sendo que o equipamento que realiza este ensaio fornece resultados rápidos e padronizados.

3.2. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Coloração de Kinyoun)

A Coloração de Ziehl-Neelsen é uma técnica de coloração de bactérias mais agressiva comparativamente à coloração de Gram, visto que as bactérias que são coradas por esta técnica, são mais resistentes aos processos de descoloração, denominando-se de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) (da Costa, Silva e Gonçalves, 2018). Estas bactérias possuem uma parede celular muito característica, devido ao seu elevado teor em lípidos presentes na sua parede celular: os ácidos micólicos. Possuem ainda uma camada de arabinoglicano (Tille, 2016; Jorgensen, Carrol e Funke, 2015).

No SPC, é utilizada a coloração de Kinyoun que se trata de uma técnica semelhante à de Ziehl-Neelsen, mas sem recurso ao calor, é uma “técnica a frio” (Tille, 2016). Desta forma, é aplicada carbolfucsina numa maior concentração seguida do descorante (solução de álcool/etanol e ácido clorídrico), onde este vai descorar todas as estruturas celulares, exceto os BAAR, e por fim, o verde brilhante que funciona como corante de contraste. A carbolfucsina, tendo grupos fenol, consegue penetrar a parede celular dos BAAR que retêm este corante ficando com uma tonalidade avermelhada em contraste com o fundo verde-azulado. A Tabela II representada o processamento da coloração de Kinyoun.

Tabela II- Coloração de Kinyoun

Reagentes	Tempo
Carbolfucsina	4 minuto
Lavar com água corrente	
Descorante (álcool-ácido)	5 segundos
Lavar com água corrente	
Verde-Brilhante	30 segundos
Lavar com água e secar	

No SPC, a coloração para BAAR também é feita de modo automático, sendo que o equipamento usado para esta finalidade fornece resultados rápidos e padronizados.

4. Meios de Cultura

Os microrganismos também precisam, tal como todos os outros organismos vivos, de obter os nutrientes adequados para o seu crescimento (Jorgensen, Carrol e Funke, 2015). Assim, para que seja possível cultivá-los em meio laboratorial é necessário inocular a amostra em meios de cultura (sementeira), de forma a identificar posteriormente o agente causador da infecção e também para corroborar o que foi visto no exame direto. A seleção dos meios de cultura a usar é realizada consoante o tipo de produto biológico.

Podemos ter três tipos de meios de cultura: os sólidos, que têm 1,5% de agar, os semissólidos, com 0,5% de agar e os líquidos. Estes meios de cultura podem ainda ser classificados como (Fonseca *et al.*, 2004):

- Meios seletivos, que visam a seleção de determinados grupos de bactérias e que contêm substâncias que inibem o crescimento dos outros grupos.

- Meios não-seletivos, que favorecem o crescimento de todo o tipo de microrganismos. Estes podem ser enriquecidos com sangue (de origem animal como sangue de carneiro ou cavalo) para que seja possível o crescimento dos microrganismos mais fastidiosos.

Existem ainda meios diferenciais que permitem uma identificação prévia, tendo por base a adição de determinados componentes que permitem revelar características bioquímicas do microrganismo ou mesmo direcionar para o tipo de agente infeccioso (Cappuccino e Welsh, 2017).

Na preparação dos meios e na manutenção das culturas de microrganismos é importante observar as condições de assepsia, de modo a que se evitem contaminações com outros microrganismos. Para além disto, é inclusivamente necessário que as condições de oxigénio (presença ou ausência) e de pH, entre outras, sejam adequadas ao crescimento desses microrganismos (Cappuccino e Welsh, 2017; Bonnet *et al.*, 2020). A Tabela III estão representados os meios de cultura mais utilizados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Tabela III- Meios de Cultura utilizados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG (Baseado nos livros: *Microbiology A Laboratory Manual* e *Textbook of diagnostic microbiology*)

Meios de Cultura	Classificação	Princípio
Meios Sólidos		
Gelose Columbia com sangue (COS)	Meio não seletivo	Meio base Gelose Columbia adicionado com 5% sangue desfibrinado de carneiro fornece o fator X (grupo Heme), permitindo assim a observação da presença ou ausência de hemólise e permitindo o crescimento e isolamento da maioria dos microrganismos, sejam estes fastidiosos ou não.
Gelose de Chocolate com Polyvitex (PVX)	Meio não seletivo	Meio enriquecido, obtido a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com sangue que é aquecido a 80 °C, com hemólise dos eritrócitos. Devido à presença do fator X e V fornecido pelo grupo heme do sangue de carneiro e pelo Polyvitex, respetivamente, favorece o crescimento de <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>
Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED)	Meio não seletivo e de isolamento diferencial	Meio de cultura utilizado no isolamento, quantificação e identificação presuntiva de microrganismos em amostras de urina, assim como de bactérias de Gram negativo de diversas amostras biológicas. A lactose vai permitir distinguir os microrganismos fermentadores dos não fermentadores de lactose, uma vez que a fermentação da lactose vai baixar o pH do meio o que faz com que este altere a sua cor de verde para amarelo. A deficiência em eletrólitos, permite inibir o “swarming” de <i>Proteus spp.</i>
Gelose de Columbia com Sangue, Colistina e Ácido Nalidíxico (CNA)	Meio Seletivo	Meio suplementado com 5% de sangue de carneiro e dois antibióticos, a colistina e o ácido nalidíxico. É um meio seletivo utilizado para o isolamento de microrganismos Gram positivo a partir de amostras clínicas, inibindo o crescimento dos Enterobacterales e Pseudomonas. A presença do sangue de carneiro permite também a visualização dos vários tipos de hemólise. Este meio é utilizado em conjunto com o CLED para a sementeira de amostras de urina.
Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC ₂)	Meio Seletivo	Utilizado para o isolamento de fungos. Meio rico em glicose e com pH ácido, o que não permite o crescimento bacteriano. A este meio ainda são adicionados dois agentes antimicrobianos, a gentamicina e o cloranfenicol, que vão inibir o crescimento da maioria das bactérias Gram negativo, bem como as de Gram positivo.
Meio de Schaedler (SCS)	Meio não seletivo	Meio altamente nutritivo, pois contém 5% de sangue de carneiro, cloreto de sódio e vitamina k ¹ , utilizado para o enriquecimento em bactérias estritamente anaeróbias existentes nas amostras clínicas. Neste meio há crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios fastidiosos.
Löwenstein-Jensen (LJ)	Meio de isolamento diferencial	Meio utilizado para a cultura de micobactérias, nomeadamente de <i>Micobacterium tuberculosis</i> . É constituído por glicerol, ovo cozido coagulado, fécula de batata assim como um corante, o verde malaquite. O glicerol e o ovo fornecem os ácidos gordos e proteínas necessárias para o metabolismo das micobactérias. A coagulação da albumina do ovo, que ocorre durante a esterilização fornece um meio sólido para fins de inoculação. Esta mistura é depois colocada em tubos de vidro de forma inclinada e o crescimento das colónias é vigiado semanalmente durante dois meses.
Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD)	Meio seletivo e de isolamento diferencial	Meio utilizado para aumentar a eficiência do isolamento e diferenciação de microrganismos entéricos de amostras de fezes, particularmente de espécies de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> Este meio contém extrato de levedura como fonte de nutrientes e vitaminas. O desoxicolato de sódio é usado como agente seletivo possuindo uma ação inibitória em relação aos microrganismos Gram-positivo. A adição da xilose permite distinguir as colónias de <i>Shigella spp.</i> , um dos poucos microrganismos entéricos que não fermentam este açúcar.

		<p>É adicionada também a lisina, que vai permitir diferenciar as espécies de <i>Salmonella</i> dos outros microrganismos não patogênicos. Uma vez consumido a fonte de xilose, as <i>Salmonellas</i> fermentam a lisina através da lisina descarboxilase o que vai alcalinizar novamente o meio.</p> <p>Para aumentar a capacidade de distinção é adicionado o sistema de indicador de H₂S que é composto pelo tiosulfato de sódio e o citrato de amônia férrico, o que permite a visualização da produção de FeS₂ resultando em colônias de centro negro.</p>
Gelose Hektoen (HEK)	Meio seletivo e de isolamento diferencial	<p>Meio utilizado no isolamento e crescimento de bactérias de Gram negativo de origem entérica, nomeadamente <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> de amostras de fezes.</p> <p>É composta por sais biliares que vão inibir os microrganismos Gram positivo, mas também retardam o crescimento algumas bactérias Gram negativo. A adição da sacarose, lactose, salicina e dos indicadores de pH azul de bromotimol e fucsina ácida, permitem diferenciar as bactérias entéricas através da cor das colônias e da cor do meio de cultura. Desta forma, os microrganismos não fermentadores destes compostos, como <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>, não alteram a cor do meio de cultura. Já os organismos que acidificam o meio através da fermentação, como <i>Escherichia coli</i>, mudam a cor do meio para laranja.</p>
Meio Mueller Hinton (MH)	Meio não seletivo	Utilizado principalmente para o estudo da suscetibilidade a antimicrobianos (teste de Kirby-Bauer).
Meios Líquidos		
Caldo SelenitoF	Meio de enriquecimento	Meio de enriquecimento para <i>Salmonella spp.</i> O selenito de sódio inibe o crescimento da maioria das Enterobacterales comuns da microbiota intestinal, sendo este meio utilizado em coproculturas e que são posteriormente subcultivadas noutros meios de cultura.
Caldo GN	Meio de enriquecimento	Meio de enriquecimento ao qual são adicionados peptonas, dextrose e manitol. Este último está presente em maior concentração, favorecendo o crescimento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> e limitando o crescimento de outras bactérias fermentadoras de dextrose. Também utilizado em coproculturas.
Brain-Heart Infusion (BHI)	Meio de enriquecimento	Utilizado maioritariamente como um meio de enriquecimento, é constituído por infusões de cérebro e coração, peptonas e dextrose. É recomendado para a recuperação de fungos e bactérias aeróbias que não cresceriam em meios não enriquecidos.
Meio de Schaedler com vitamina K ₃ (KCS)	Meio não seletivo	É um meio enriquecido com fatores de crescimento como hemina e vitamina K ₃ e é perfeitamente adaptado ao crescimento tanto de bactérias exigentes aeróbias como anaeróbias conforme as condições de incubação.
Mycobacteria growth indicator tube (MGIT)		Composto por meio líquido <i>Middlebrook 7H9</i> e uma base de silicone impregnada de rutênio. Esse composto é sensível à presença do oxigênio no meio, tendo as emissões de fluorescência reduzidas, não podendo ser detetada. Assim, com o crescimento dos microrganismos, passa-se a consumir o oxigênio do meio e a fluorescência passa a ser detetada, podendo ser visualizada utilizando-se uma luz UV de 365nm. Desse modo, o nível de fluorescência que o tubo emite corresponde à quantidade de oxigênio consumido e é proporcional ao crescimento de microrganismos.
Meio para Hemoculturas BD BACTEC™		Meio líquidos inseridos em garrafa, à base de tripticase de soja que é adicionado anticoagulante polianetolsulfonato e resinas quelantes de antibióticos, que são úteis para inibir a elevada carga antibiótica a que os doentes estão sujeitos. Estas garrafas tem um sensor químico sensível ao CO ₂ resultante do crescimento celular microbiológico e que emite fluorescência, permitindo detetar este crescimento.

5. Sangue

A invasão da corrente sanguínea por microrganismos constitui uma das situações mais graves no que diz respeito às doenças infecciosas (Tille, 2016). A bacteriemia e fungicemia são definidas como a presença de bactérias e fungos, respetivamente, na corrente sanguínea, podendo provocar infeções denominadas de septicemias (Tille, 2016). A septicemia é das causas de morte mais preocupantes em pacientes imunodeprimidos que estão sob terapêutica ou quimioterapia, visto que estes tratamentos já debilitam muito o sistema imunitário, pelo que a septicemia pode a ser fatal (Mahon e Lehman, 2018). Tendo em conta que o sangue é um fluido biológico estéril, o laboratório tem um papel muito importante na deteção rápida e identificação dos microrganismos patogénicos, bem como na contribuição para a terapêutica a administrar.

A colheita de sangue para hemocultura é realizada através de punção venosa de veias periféricas ou de cateter venoso central (quando presente), colhendo o sangue em diferentes veias e para duas garrafas de hemocultura. O facto de se colher o sangue de punções venosas diferentes e para garrafas de hemocultura diferentes, ajuda a descartar possíveis contaminações aquando da avaliação dos resultados (Fonseca *et al.*, 2004; Mahon e Lehman, 2018).

Para o sucesso de uma hemocultura, a assepsia da pele é um fator crucial, pois assim evita-se que haja contaminação da amostra com a microbiota da pele do doente. Mas para além deste fator, também o volume de sangue é de extrema importância, visto que este está em correlação direta com a probabilidade de detetar o microrganismo em circulação. Sendo assim, ambos os critérios são importantes para o sucesso da deteção da bacteriemia.

Consoante o exame clínico e a suspeita dos agentes patogénicos causadores da infeção, são colhidos 8 a 10 mL de sangue para as garrafas de hemocultura, não devendo este volume ser inferior ou superior a estes valores, de modo a que se evitem resultados positivos falsos.

No Setor de Microbiologia do SPC são utilizados três tipos de garrafas para hemocultura: para microrganismos aeróbios/fungos (Figura 4-C), para microrganismos anaeróbios (Figura 4-B) e para micobactérias (Figura 4-A).

As garrafas para microrganismos aeróbios são constituídas por um meio líquido de tripticase de soja, com resinas quelantes de antibióticos, permitindo assim o crescimento da maioria dos microrganismos. Nestas garrafas, também se pode verificar o desenvolvimento de fungos leveduriformes. As garrafas de hemocultura para microrganismos anaeróbios possuem o meio líquido de tripticase de soja enriquecido em CO₂ e azoto e com adição de agentes hemolisantes que vão permitir o isolamento, não só de microrganismos anaeróbios, mas também de microrganismos fastidiosos e intracelulares. As garrafas destinadas para o crescimento de micobactérias, são mais raramente requeridas e são compostas por um caldo de *Middlebrook 7H9* e de Infusão Cérebro Coração, sendo o volume de sangue necessário mais baixo (1 a 5 mL).



Figura 4- Garrafas para Hemoculturas: A- Garrafa de Hemocultura para Micobactérias; B- Garrafa de Hemocultura para microrganismos Anaeróbios; C- Garrafa de Hemocultura para microrganismos Aeróbios/Fungos (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

5.1. Exame Bacteriológico e Micológico

Após a colheita e receção das garrafas, estas são armazenadas no equipamento automático, *BD Bactec™ 9120 Blood Culture System*, que agita e incuba, a 35°C, as amostras e sistematicamente monitoriza o crescimento bacteriológico. O crescimento microbiano é detetado por fluorescência, que resulta da acidificação do meio pela produção de CO₂, como consequência da metabolização dos substratos presentes no meio de cultura, emitida a partir de um sensor químico presente no fundo de cada garrafa e que é permeável ao gás. Este sensor é monitorizado pelo equipamento de 10 em 10 minutos. O sistema emite alarmes visuais e sonoros aquando de uma amostra positiva, indicando assim a presença de crescimento microbiano.

Quando uma hemocultura tem um resultado positivo, é retirada do equipamento para repicagem para o meio sólido e exame direto. Com ajuda de uma seringa retira-se uma quantidade suficiente de sangue para que seja possível repicar nos meios sólidos de COS para cultivo de microrganismos aeróbios e/ou SCS para cultivo de microrganismos anaeróbios. Este último incuba numa atmosfera anaeróbia, onde se coloca um gerador de atmosfera anaeróbia *GENbag* e um indicador de humidade que vai permitir observar, ao longo da análise dos

resultados, se há ou não umidade dentro deste meio de anaerobiose (Figura 5). Se se observar uma cor azul no indicador de umidade, isto significa que o meio não está em anaerobiose.

A repicagem para estes meios faz-se por estriamento, com a ajuda de uma ansa estéril, pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio. A incubação é feita a 37°C durante 24-48 horas para microrganismos aeróbios ou facultativos, ou 5 dias os anaeróbios. Paralelamente realizam-se dois esfregaços, colocando uma gota de sangue em cada lâmina, para posterior coloração de Gram, para avaliar a morfologia e reação de Gram do microrganismo presente na amostra. Realizam-se esfregaços em duplicado como método de prevenção, no caso de acontecer algum incidente com o primeiro esfregaço ou em caso de dúvida na morfologia, como método confirmatório.

Consoante a morfologia observada nos esfregaços corados pela técnica de Gram e a leitura macroscópica das geloses, procede-se à identificação do microrganismo responsável pela bacteriemia, bem como à realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana.

6. Secreções respiratórias

O trato respiratório é colonizado por uma microbiota muito variável, abundante e não patogénica, apresentando uma densidade baixa em colónias e uma elevada diversidade. Podemos dividir o trato respiratório em duas partes: o superior, que inclui o nariz e a cavidade nasal, faringe e epiglote; e o inferior que inclui a laringe, traqueia, brônquios e pulmões (Nester, Anderson e Roberts, 2011). O trato respiratório inferior geralmente apresenta-se estéril, mas com a existência de patologias pode levar a uma perda de diversidade, com o aumento da presença de bactérias de um dado género em detrimento de outros (da Costa, Silva e Gonçalves, 2018).

Embora as infeções das vias respiratórias superiores sejam muito frequentes, mas raramente ameaçadoras de vida, as infeções das vias respiratórias inferiores são responsáveis por doenças mais graves, que podem mesmo pôr em risco a vida (Nester, Anderson e Roberts, 2011). O doente oncológico é mais suscetível de contrair infeções do que outro tipo de doentes, uma vez que as terapêuticas a que está sujeito debilitam o seu sistema imunitário. O tipo de infeções mais frequente neste tipo de doentes são as infeções do trato respiratório inferior (Tille, 2016), mas deve-se ter em consideração a microbiota das vias respiratórias

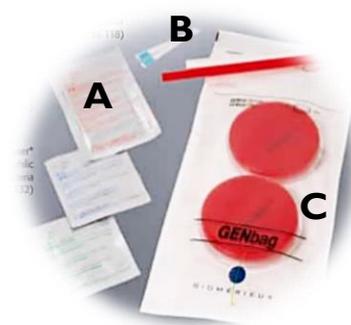


Figura 5- Saco de atmosfera anaeróbia: A- Gerador de atmosfera anaeróbia; B- Indicador de umidade; C- Saco de plástico para colocar as placas do meio (Adaptado de: *bioMérieux*)

superiores e da microbiota oral aquando da colheita de amostras, visto que podem dificultar o diagnóstico laboratorial.

No Setor de Microbiologia do SPC, as amostras de secreções respiratórias mais comuns são expetorações e lavados/aspirados brônquicos.

Relativamente às amostras de expetoração, estas devem ser colhidas na primeira tosse da manhã, por tosse profunda, e após lavagem da boca, tendo o cuidado de desprezar amostras que contenham saliva ou rinorreia, para evitar contaminações (Fonseca *et al.*, 2004). Amostras de lavados e aspirado brônquicos, são obtidas por broncoscopia, um exame médico que permite a visualização interna do aparelho respiratório, nomeadamente dos brônquios e a recolha de material para análise (Fonseca *et al.*, 2004).

Após colheita, as amostras são transportadas num contentor estéril e o procedimento laboratorial começa com a avaliação macroscópica do produto, ou seja, seleciona-se uma porção da amostra e realiza-se um esfregaço, seguida da coloração de Gram e exame direto ao microscópio.

O exame direto de amostras de expetoração, vai permitir avaliar a sua qualidade. Tendo em conta os critérios de *Murray-Washington* (Tabela IV), avaliamos a quantidade média de células epiteliais e leucócitos, por campo, na objetiva de pequena ampliação (10x). Ao observar o esfregaço ao microscópio na objetiva de pequena ampliação, para que possamos considerar a amostra como viável, ou seja, uma verdadeira expetoração, esta tem de estar de acordo com os critérios que se apresentam nos grupos 4 e 5 (Figura 6), pois assim conseguem-se excluir possíveis contaminações pela microbiota da orofaringe, que é o caso dos grupos de 1 a 3. Em doentes oncológicos, estes critérios podem não ser aplicados, sendo por isso exceções, como por exemplo em doentes neutropénicos (Fonseca *et al.*, 2004).

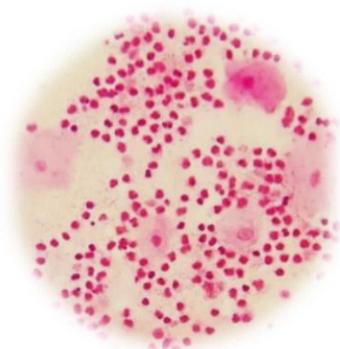


Figura 6- Amostra de expetoração corada pela técnica de Gram, representativa do grupo 5 dos critérios de *Murray-Washington*. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Tabela IV- Critério de *Murray-Washington*

Grupo	Células Epiteliais	Leucócitos
	100x	10x
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	<10	25

e 5 (Figura 6), pois assim conseguem-se excluir possíveis contaminações pela microbiota da orofaringe, que é o caso dos grupos de 1 a 3. Em doentes oncológicos, estes critérios podem não ser aplicados, sendo por isso exceções, como por exemplo em doentes neutropénicos (Fonseca *et al.*, 2004).

Depois da observação do esfregaço ao microscópio, é feito o exame cultural de acordo com o pedido clínico.

6.1. Exame Bacteriológico

As amostras são semeadas em placas de COS e PVX e são incubadas na estufa de 37°C com atmosfera de CO₂ durante 24 horas.

Os meios são analisados após as 24 horas e para que esta análise seja adequada e a avaliação e discussão dos resultados seja fidedigna, é necessário o conhecimento da microbiota de onde é proveniente a amostra. Colônias que tenham características diferentes das da microbiota conhecida ou mesmo o predomínio de um único tipo de colônias, sugere que estas colônias sejam do microrganismo responsável pela infecção, mas isto é sempre confirmado com o que foi observado no exame direto. Se na mesma placa existirem três ou mais morfologias distintas e possíveis microrganismos infetantes, considera-se a amostra como polimicrobiana. Tendo confirmado que é um microrganismo patogénico, procede-se à sua identificação e realização dos testes de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos.

6.2. Exame Micológico

A amostra respiratória é também semeada em duas geloses SGC₂, em paralelo com a cultura bacteriológica, pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio. As placas são depois fechadas com Parafilme[®], para que se evite a desidratação do meio, mas também a contaminação do mesmo e vão a incubar em estufas a duas temperaturas diferentes, uma a 30°C e outra a 37°C. Para a valorização da amostra, é necessário que as duas placas de SGC₂ apresentem crescimento do mesmo tipo de fungo, caso contrário é provável que tenha havido contaminação da amostra. Caso se verifique a contaminação da amostra é solicitada uma nova colheita.

A placa de SGC₂ a 37°C é avaliada para verificar o crescimento de leveduras. Caso se verifique que as leveduras são o agente causador da infecção, estas são valorizadas, sendo repicadas para COS e realizada a sua identificação, no equipamento automático (*Vitek®2 Compact 15*). Contudo qualquer amostra positiva para crescimento de fungos leveduriformes é guardada na estufa de 30°C até perfazer 1 mês, para pesquisa de fungos filamentosos, visto que estes têm um desenvolvimento mais fastidioso do que o das leveduras, efetuando-se neste caso uma avaliação semanal. Se se verificar crescimento de fungos filamentosos, começa-se por avaliar macroscopicamente a sua morfologia (cor, aspeto/textura da colónia e tipo de micélio) e, posteriormente procede-se ao seu exame microscópico. Utiliza-se o método da fita-cola, onde se coloca uma gota de azul de lactofenol entre lâmina e lamela sendo então selado com verniz para que não haja desidratação. Este exame microscópico consiste na avaliação do tipo de hifas (septadas ou asseptadas), pigmentadas ou não e da identificação da

morfologia das estruturas reprodutoras. Para além da observação, o fungo é repicado, com a ajuda de uma ansa retirando um pedaço da periferia da colónia que é colocado ao centro de um novo meio SGC₂, permitindo assim o crescimento contínuo do fungo e caso seja necessário, a continuação do seu estudo.

6.3. Exame Micobacteriológico

A requisição do exame de pesquisa de Micobactérias é feita aquando da suspeita clínica de infeção por estes microrganismos, nomeadamente infeções por *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose. Devem ser colhidas três amostras em dias distintos, visto que a emissão de micobactérias não ocorre de forma contínua. Após a receção da amostra é inicialmente feito um esfregaço pela técnica de *Kinyoun* para a pesquisa de Bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) e os resultados são interpretados de acordo com a tabela V, sendo que basta observar 1 BAAR por campo para darmos como positiva a amostra.

Tabela V- Critério de Quantificação de BAAR

Após observação do esfregaço, procedemos ao processo de homogeneização que envolve um processo de descontaminação (onde é usado o hidróxido de sódio-NaOH), para que seja possível eliminar toda a flora comensal da nossa amostra, liquefação (com NaOH e N-acetil-L-citeína) para que sejam retirados todos os resíduos de mucina e concentração (através da centrifugação) para concentrar as micobactérias que possam existir na nossa amostra. Concluídos estes procedimentos é preparada uma lâmina para nova

Número de BAAR observados	Interpretação
0	Negativo
1 a 2/300 campos	Duvidoso (confirmar)
1 a 9/100 campos	Positivo
1 a 9/10 campos	
1 a 9/campo	
>9/ campo	

coloração de *Kinyoun*, do sedimento obtido (Figura 7).

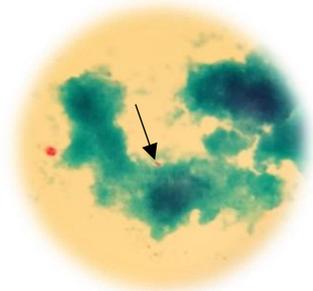


Figura 7- Amostra de Expetoração positiva para presença de BAAR (Seta)
(Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

De seguida, semeamos uma parte da amostra em gelose COS que vai servir para controlo para averiguar se o processo de homogeneização foi bem-sucedido ou não, pois se obtivermos crescimento de colónias na gelose significa que estamos perante uma contaminação e temos de repetir todo o procedimento de novo. Outra parte da amostra homogeneizada, é semeada num tubo com meio sólido de *Löwenstein-Jensen* (LJ) e inoculada num tubo com meio líquido Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). O meio LJ é incubado numa estufa a 37°C em aerobiose,

com uma inclinação de 45° e com a tampa semi-apertada e virada para cima durante 8 semanas.

Os tubos de MGIT são avaliados durante um período de 42 dias, num equipamento próprio para a leitura da fluorescência, e tendo por base um valor de *cut-off*, podemos dizer se a amostra é positiva ou negativa. Todas as semanas são observados os meios LJ e MGIT simultaneamente, para avaliar se há desenvolvimento micobacteriológico ou não.

Relativamente à observação macroscópica das colónias em meio LJ, nesta vão ser observadas, caso sejam positivas, colónias de aspeto rugoso, com aspeto de “couve-flor” (Figura 8). Sempre que os resultados sejam positivos são realizados novos esfregaços em lâmina, para coloração de *Kinyoun*, para a confirmação dos resultados obtidos. Se nestes novos esfregaços forem observados BAAR, procede-se à identificação por PCR em tempo real. As amostras positivas são enviadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para fazer o teste de suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos. Se não houver deteção por PCR em tempo real, mas se forem observados BAAR ao microscópio, podemos estar perante uma outra espécie de micobactérias, e neste caso a amostra é enviada para o CHUC para que se faça a identificação da espécie (por RT-PCR) e determinação da sua suscetibilidade aos antimicrobianos.



Figura 8- Colónias com aspeto de “couve-flor” de *M. tuberculosis* em meio sólido de Löwenstein-Jensen (Adaptado de: Textbook of Diagnostic Microbiology)

7. Exsudatos Purulentos Superficiais e Profundos

Muitas das situações clínicas que levam a infeções localizadas por determinados microrganismos, conduzem à formação de exsudatos purulentos. Posto isto, as metodologias envolvidas para o seu estudo microbiológico têm de ter em consideração: o local da infeção, história clínica (nomeadamente dados epidemiológicos), tipo de infeção com ou sem abscesso e o método de colheita, quer seja por aspiração em seringa, ou por zaragatoa (Fonseca *et al.*, 2004).

Os exsudatos superficiais são colhidos com uma zaragatoa e esta deverá ser colocada em meio de transporte adequado (Stuart ou Amies) (Fonseca *et al.*, 2004).

Relativamente aos exsudatos de feridas profundas, a sua colheita não deve ser feita com o auxílio de uma zaragatoa, mas sim por punção e aspiração com uma agulha e seringa (Fonseca *et al.*, 2004) e com a devida assepsia da pele, para que não ocorram contaminações com os microrganismos da microbiota da pele, evitando assim induzir em erro a avaliação dos resultados laboratoriais (Baron *et al.*, 2013). Este método de colheita tem a finalidade de

pesquisar também microrganismos anaeróbios, pelo que a seringa deve ser transportada capsulada.

7.1. Exame Bacteriológico e Micológico

As amostras provenientes de exsudatos purulentos superficiais são semeadas nos meios de COS, PVX e SGC₂ para pesquisa de bactérias aeróbias e fungos leveduriformes, sendo depois incubados a 37°C durante 18-24 horas. No caso de termos um pús purulento profundo, colhido em condições adequadas de anaerobiose, realiza-se a sementeira em SCS reduzido e coloca-se este numa atmosfera de anaerobiose (*GENbag*) a 37°C durante 5 dias, para pesquisar microrganismos anaeróbios. A amostra é também inoculada em meios líquidos, em BHI e caldo KCS que são incubados a 37°C, durante 24-48 horas, pois estes são caldos de enriquecimento, logo irão permitir a recuperação de microrganismos. No caldo de enriquecimento BHI é importante que a tampa esteja semi-apertada para haver entrada de oxigénio; já no caldo KCS esta deve estar completamente fechada para que se mantenham as condições de anaerobiose. Se, após o tempo estipulado, se observar turvação nestes meios, indicativo de que houve crescimento microbiano, então é realizado novo esfregaço em lâmina para coloração de Gram e efetuada repicagem para corroborar os resultados obtidos com os meios inicialmente inoculados.

No exame direto, para além da observação da morfologia microbiana, teremos também de ter em conta a quantidade de leucócitos que são observados (se polimorfonucleares ou mononucleares). A predominância de leucócitos polimorfonucleares aponta para infeções de origem bacteriana, enquanto que a presença de leucócitos mononucleares pressupõe infeção viral.

Se a amostra, na observação presuntiva for positiva, procede-se à identificação e TSA das colónias isoladas. Mas se observarmos um crescimento proporcional de diversas colónias com aspeto característico da microbiota comensal do local de origem da amostra ou se não houver crescimento de qualquer microrganismo, a amostra é negativa.

8. **Urina**

As infeções do trato urinário (ITU) são das infeções mais recorrentes no Homem, sendo habitualmente causadas por bactérias presentes na microbiota intestinal que, por via ascendente através da uretra, invadem o aparelho urinário (Baron *et al.*, 2013; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2015). Por motivos anatómicos e fisiológicos, tais como alterações no pH, diferenças de osmolaridade e ação bactericida de fluidos prostáticos, as infeções urinárias são

mais comuns no sexo feminino do que no masculino (Fonseca *et al.*, 2004). Os agentes patogénicos mais comuns nestes casos são Enterobacterales, tendo maior destaque a *Escherichia coli*.

Em ambiente hospitalar, o risco de ITU aumenta bem como a diversidade dos agentes etiológicos na sua origem, podendo estes ter uma maior resistência a antimicrobianos (Tille, 2016). Estes doentes têm também uma maior probabilidade de desenvolver este tipo de infeções devido a diversos fatores como a algália prolongada, cálculos urinários, uso de tubos de nefrostomia entre muitos outros fatores e patologias associadas ao trato urinário (Fonseca *et al.*, 2004). Devido a esta relação de fatores podem aparecer outros tipos de microrganismos como: *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus spp.* e fungos.

A colheita de urina é realizada num contentor estéril e pode ser efetuada por diversos métodos, nomeadamente: colheita do jato intermédio, punção supra-púbica, punção de cateter urinário, saco coletor ou por drenagem de nefrostomia/ureterostomia (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2015). Para a obtenção de uma amostra de urina correta, é colhida a primeira urina da manhã após lavagem da região genital e desprezando o primeiro jato, de modo a que se consiga colher o jato intermédio, pois aqui há menor probabilidade de contaminação com a microbiota comensal. É colhida a primeira urina da manhã uma vez que é a que possui uma contagem bacteriana maior, tendo estado sujeita a incubação durante todo o período da noite.

A urina deve ser processada até uma hora após a colheita, caso contrário deverá ser refrigerada a 4°C (Fonseca *et al.*, 2004).

O processamento da amostra de urina ocorre em duas etapas: a urocultura, onde vamos quantificar e identificar os microrganismos presentes na amostra de urina e a análise sumária de urina onde vamos avaliar os parâmetros bioquímicos e onde vamos também observar o sedimento urinário (exame direto a fresco).

8.1. Urocultura

Assim que a amostra chega ao laboratório, é realizada a urocultura para que se evite a contaminação da amostra. Esta é inicialmente homogeneizada e com uma ansa de plástico calibrada de 1 µL procede-se à sementeira, nos meios CLED e CNA. Caso o clínico tenha suspeita de fungos na amostra de urina, é também efetuada uma sementeira da amostra no meio SGC₂. As placas, após sementeira vão a incubar, em condições de aerobiose, a 37°C durante 18-24 horas e terminado este tempo são observadas macroscopicamente as colónias de ambos os meios.

Na valorização dos resultados clínicos das uroculturas, é tido em conta o método de colheita da amostra de urina e o historial clínico do doente.

As uroculturas são técnicas quantitativas (Figura 9) onde a urina do jato intermédio é considerada positiva quando estão presentes 100 ou mais Unidades Formadoras de Colónias (UFC), que representa uma contagem igual ou superior a 10^5 colónias, por mililitro no meio. Podemos também valorizar amostras que apresentem crescimento até, no máximo, de três morfologias distintas, sendo estas amostras consideradas polimicrobianas.

As amostras de urina que apresentem uma contagem inferior a 100 UFC são consideradas negativas. Mas em alguns casos são consideradas positivas, caso a situação clínica do doente seja sugestiva, de acordo com a sintomatologia e/ou resultados bacteriológicos anteriores e tendo também em consideração a eventual administração de terapêutica antibiótica.

As amostras de urina, que são provenientes de punção supra-púbica ou de catéteres, que se apresentem com crescimento, são consideradas positivas independentemente da quantificação das colónias de microrganismos e no caso de não apresentarem características presuntivas de bactérias comensais da pele é descartada a hipótese de contaminação. Os resultados das sumárias de urina também nos fornecem informações relevantes em termos de colonização ou infeção, por exemplo, a presença ou abundância de diversos elementos como leucócitos, células epiteliais, nitritos e eritrócitos é sugestivo de uma ITU. A existência de células epiteliais na amostra, é um fator que juntamente com os elementos referidos anteriormente, ajuda a esclarecer a presença ou ausência de contaminação da amostra. Esta contaminação poderá ter como causa uma ligeira descamação do trato urinário, se existirem pequenas quantidades de células. Na existência de grandes quantidades e relacionando com outros fatores, poderá ser indicativo de infeção.

8.2. Análise Sumária de Urina ou Urina Tipo II

Esta análise compreende três fases distintas: a observação macroscópica (cor e aspeto da urina), determinação de parâmetros bioquímicos (densidade relativa, pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue) e observação do sedimento urinário ou exame microscópico.

A análise dos parâmetros bioquímicos é feita através de tiras-teste *Combur* onde são apresentadas 10 zonas com diferentes reagentes que permitem uma determinação semi-

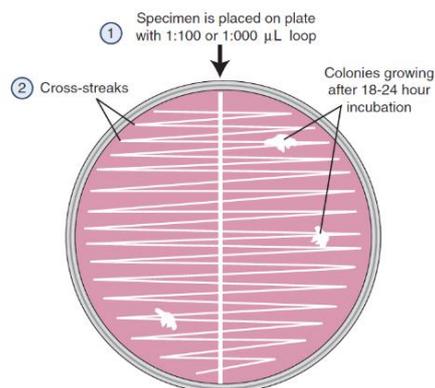


Figura 9- Sementeira quantitativa de uma amostra urina em meio sólido (Adaptado de: Textbook of Diagnostic Microbiology)

quantitativa dos diversos parâmetros. Estas tiras-teste são mergulhadas, durante 1 segundo, num tubo com 10 mL de urina não centrifugada e sendo feita a sua leitura 1 minuto depois.

Os testes têm por base reações químicas de alteração da cor pré-definida. Após esta análise, a urina é centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm para que se obtenha o sedimento urinário. Com uma pipeta são descartados 9 mL do sobrenadante, ficando 1 mL de sedimento que é depois ressuspenso sendo colocada uma gota entre lâmina e lamela para a visualização microscópica dos seus componentes, como elementos celulares (eritrócitos, leucócitos e células epiteliais), cristais e/ou cilindros. É observado na objetiva de 40x e com o condensador para baixo, sendo que como é um exame direto a fresco da amostra, ou seja, sem o recurso a corantes, é necessário que entre o mínimo de luz possível para que seja possível observar todas as estruturas biológicas presentes na amostra. Na avaliação do sedimento são anotados a quantidade/abundância de todos os elementos e também a sua classificação.

9. Fezes

O trato gastrointestinal permanece habitado por uma enorme diversidade de microrganismos ao longo de toda a vida do hospedeiro, que desempenham um papel fundamental na proteção do hospedeiro contra inúmeras infeções (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2015). Em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, indivíduos com cancro, que são indivíduos que realizam quimioterapia, imunoterapia intensiva e antibioterapia, isto são fatores que induzem mudanças extremas e drásticas na composição da microbiota do organismo, sendo mais afetados por microrganismos oportunistas (Tille, 2016).

O Setor de Microbiologia do SPC, nas coproculturas faz por rotina a pesquisa de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Campylobacter spp.*, pois são as mais comumente associadas a gastroenterites. No entanto, podem ser pesquisados outros tipos de agentes infecciosos a pedido do clínico, como *Clostridium difficile* e parasitas. Os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos (náuseas, vômitos e diarreia), assim como o tipo de diarreia dão indicações importantes para a pesquisa do agente etiológico.

As coproculturas, devem ser colhidas para um recipiente de boca larga esterilizado, descartável e estanque, devendo também evitar-se o uso de conservantes e refrigeração, para garantir a viabilidade dos resultados. As amostras não devem estar contaminadas com urina e devem ser processadas até duas horas após a sua emissão.

Para a pesquisa de *Clostridium difficile* a amostra de fezes só deve ser processada se as fezes forem diarreicas, ou seja, se se moldarem ao contentor.

9.1. Exame Bacteriológico

As amostras de fezes são semeadas em dois meios diferentes, gelose Hektoen (HEK) e em gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), quando da suspeita de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* As placas são depois incubadas a 37°C num meio de aerobiose durante 18 a 24 horas. Em adição a estes meios sólidos, uma porção das fezes é também inoculada em meios líquidos de enriquecimento, caldo GN e caldo SelenitoF, para o enriquecimento de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* Estes meios são incubados a 37°C numa atmosfera de aerobiose (com a tampa semi-apertada) durante 6 a 12 horas. A observação de turvação dos meios indica presença de crescimento bacteriano. Os meios de enriquecimento são depois repicados para os meios sólidos (XLD e Hek).

Os meios que apresentem colónias amarelas em XLD ou alaranjadas em Hek são considerados negativos para presença de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*. Contrariamente a observação de colónias incolores (Lactose negativa), vermelhas em XLD ou verdes em Hek, com ou sem presença de centro negro são valorizadas, procedendo-se ao seu isolamento, identificação e TSA.

Como na microbiota intestinal também existem leveduras, o crescimento destas nestes meios sólidos só é valorizado na ausência de crescimento bacteriano. Assim sendo, as placas que apresentam um crescimento isolado de leveduras são repicadas, pela técnica de esgotamento do produto, para gelose SGC₂ e são depois incubadas a 37°C em aerobiose durante 18 a 24 horas. Proceder-se a ID e TSA após a incubação dos meios.

Na rotina do laboratório, também são pesquisadas as espécies de *Campylobacter.*, sendo realizado um teste imunocromatográfico, tendo como finalidade a deteção rápida e qualitativa de antígenos de *Campylobacter spp.*

Em casos onde se suspeite de uma infeção por *Clostridium difficile*, em amostras de fezes diarreicas, realiza-se um teste imunocromatográfico para a pesquisa da enzima glutamato desidrogenase. Aquando da positividade deste teste, faz-se a confirmação da produção de toxina B, através de um ensaio de RT-PCR (GeneXpert RT-PCR) de acordo com a norma da Direção Geral de Saúde (DGS).

9.2. Exame Parasitológico

A colheita de três amostras de fezes em dias consecutivos é importante para a realização do exame parasitológico, uma vez que a eliminação/libertação das estruturas parasitárias (ovos ou vermes/parasitas) não é contínua evitando-se assim a obtenção de resultados falsos negativos. A análise deste tipo de amostras, inicia-se com a observação macroscópica das fezes, avaliando a sua consistência e odor, a presença de sangue e de restos alimentares e existência ou não de muco ou vermes/parasitas adultos.

Após o exame macroscópico, segue-se o exame direto a fresco, onde se coloca uma porção da amostra de fezes numa lâmina. Após este passo, coloca-se uma gota de soluto de Lugol sob a amostra, entre lâmina e lamela e o esfregaço é observado ao microscópio primeiro na objetiva de 10x, para a observação das estruturas parasitárias, como ovos e larvas (Figura 10). De seguida, passa-se para a objetiva de 40x, para a observação de estruturas de menores dimensões, como quistos. Em seguida,

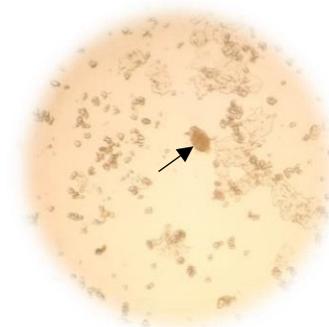


Figura 10- Observação, na objetiva de 10x, de um ovo de *Schistosoma mansoni* (seta), corado com soluto de Lugol (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

realiza-se o método de concentração de fezes, pelo método de Ritchie, que compreende centrifugações sucessivas e adição de formol 10% e éter. Este método vai permitir a separação das estruturas parasitárias (ovos e quistos) dos resíduos fecais. O sedimento obtido no final das centrifugações é usado para realizar um novo esfregaço que é novamente observado ao microscópio. Paralelamente é feito um teste imunocromatográfico para deteção rápida e qualitativa de antígenos de *Giardia lamblia* e/ou *Cryptosporidium parvum*.

10. Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

A identificação das características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos em estudo proporciona informações fundamentais para prosseguir a identificação da(s) espécie(s) de microrganismos que possam estar a causar a infeção no doente. A observação das características das colónias, como a forma, cor, odor, tamanho e capacidade de hemólise, bem como o seu crescimento nos meios de seletivos e a execução de determinadas provas bioquímicas, como a oxidase e catalase, permitem-nos realizar uma identificação preliminar presuntiva do microrganismo causador da infeção, orientando assim para o procedimento laboratorial a seguir para realizarmos os testes de ID e TSA (Figura 11).

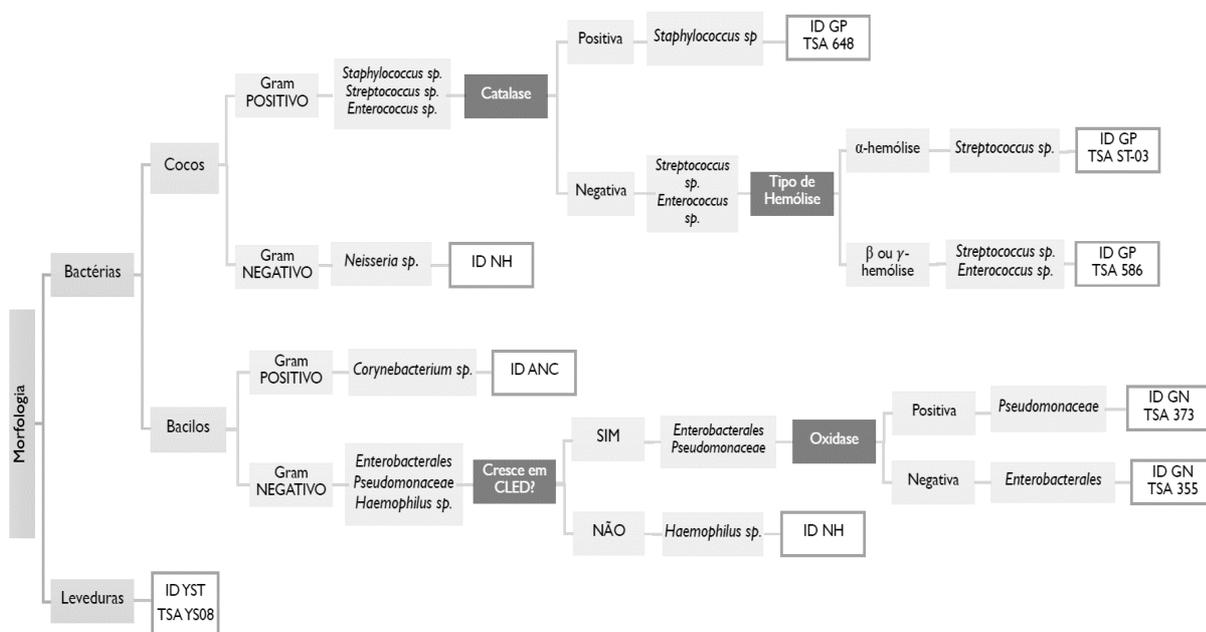


Figura 11 - Esquema utilizado no Setor como guia para o processamento da identificação de bactérias. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG).

Os testes de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos são de grande valor, no Setor de Microbiologia, pois estes são essenciais na administração da antibioterapia para o combate da infeção e erradicação do agente infeccioso. No Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG, os testes de identificação e de suscetibilidade a fármacos antimicrobianos são efetuados maioritariamente num sistema automatizado, o Vitek[®] 2 Compact 15.

10.1. Técnicas de identificação

10.1.1. Provas bioquímicas auxiliares na identificação:

Teste da Oxidase: Este teste permite detetar indiretamente a presença ou ausência da enzima citocromo-oxidase. Esta atividade depende da presença de um sistema de citocromo-oxidase intracelular que catalise a oxidação do citocromo C através de oxigénio molecular que, por sua vez, irá funcionar como o recetor final de eletrões durante a respiração aeróbia (Cappuccino e Welsh, 2017).

Para avaliar a presença desta enzima são usadas, tiras comerciais que contém dicloridrato de tetrametil-p-fenilenediamina. Este, no estado reduzido é incolor, mas aquando da sua oxidação do citocromo C produzido pelos microrganismos, este oxida o reagente presente na tira (dicloridrato de tetrametil-p-fenilenediamina) adquirindo-se uma cor azul arroxeada/púrpura. Para não haver a formação de falsos positivos são usadas ansas de plástico com as quais é retirada uma colónia da placa e coloca-se sobre a tira, observando-se de

imediatamente a leitura do resultado. O aparecimento de uma cor azul arroxeada/púrpura (Figura 12-A) indica a presença da enzima citocromo-oxidase, logo o resultado é positivo, enquanto que a ausência de cor (Figura 12-B) indica um resultado negativo. Este teste possibilita diferenciar as bactérias da família *Enterobacteriales* (oxidase negativa), de outros bacilos Gram-negativo, como as *Pseudomonadaceae* (oxidase positiva) (Tille, 2016).

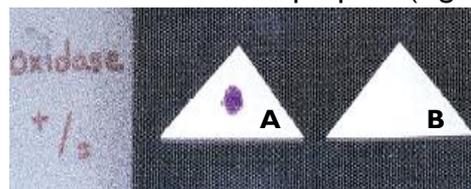


Figura 12- Teste da Oxidase: A- Oxidase Positiva; B- Oxidase Negativa (Adaptado de: Bailey Scott's Diagnostic Microbiology)

Teste da Catalase: Este teste permite detetar a presença da enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em oxigénio e água, levando à libertação de bolhas de oxigénio e permitindo assim, a distinção entre *Staphylococcus* (catalase positiva) e *Streptococcus/Enterococcus* (catalase negativa) (Tille,2016). Numa lâmina coloca-se uma gota de peróxido de hidrogénio, à qual adicionamos, com a ajuda de uma ansa de plástico, a colónia bacteriana. Aquando da observação de efervescência (Figura 13-B) devido à libertação de gás, considera-se o teste positivo. Pelo contrário, se não se observar efervescência (Figura 13-A), o teste é negativo.

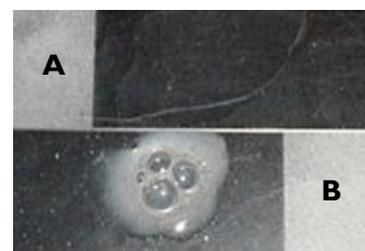


Figura 13- Teste da Catalase: A- Catalase Negativa; B- Catalase Positiva (Adaptado Bailey Scott's Diagnostic Microbiology)

Para evitar falsos positivos, não devemos de efetuar este teste em microrganismos que cresçam em gelose de sangue, ou então devemos evitar tocar com a ansa neste meio de cultura, pois os glóbulos vermelhos presentes na gelose possuem catalase no seu interior (Tille, 2016).

10.1.2. Galeria de identificação BD BBL™ Crystal™

A galeria de identificação BD BBL™ Crystal™ (Figura 14-A) é utilizada aquando da pesquisa de bactérias aeróbias Gram-positivo de difícil identificação, ou seja, sempre que existam dúvidas na identificação de uma bactéria Gram positiva ou quando não existe carta de ID no *Vitek®2 Compact 15*. Usando uma suspensão bacteriana, os substratos (cromogénicos e fluorogénicos) presentes na galeria são rehidratados. Em determinados poços, desencadeia-se a degradação dos substratos cromogénicos que é avaliada, macroscopicamente,



Figura 14- Sistema de identificação BD BBL™ Crystal™: A-Painel de 30 poços; B-Carta de leitura dos poços (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

pela alteração da cor do meio. Através da hidrólise dos substratos fluorogênicos, é produzida fluorescência, que é facilmente detectado por meios visuais utilizando uma fonte de luz UV.

Após a incubação, a interpretação dos resultados dos poços é analisada relativamente à alteração da cor ou à presença de fluorescência (Figura 14-B), consequência das atividades metabólicas dos microrganismos. O padrão de reação de todos os poços da galeria, é convertido num número com 10 dígitos (bionúmero) e é este que é usado como base da identificação. O bionúmero e a morfologia (cocos ou bacilos) dos microrganismos são analisados por um *software* informático do equipamento a fim de se obter a identificação do microrganismo.

10.2. Identificação e TSA: Vitek®2 Compact 15

Após a identificação presuntiva do microrganismo causador da infecção, e consoante todas as características morfológicas observadas e dos testes bioquímicos realizados, é necessário realizar a identificação definitiva.

No Setor de Microbiologia do SPC do IPOFG, esse procedimento é realizado com o sistema automático *Vitek®2 Compact 15*, que utiliza cartas para a identificação e testes de suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos.

Para isso é preparado o inóculo, que é obtido por uma suspensão da colônia bacteriana em 3 mL de solução salina. A turbidez é determinada de acordo com a escala de *McFarland*, usando um densitómetro. Após a preparação do inóculo são depois adicionadas as cartas de ID.



Figura 15- Cartas de ID e TSA para o equipamento Vitek 2 Compact 15 (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Relativamente às cartas de identificação estas permitem-nos identificar qual o microrganismo presente na amostra. Estas cartas descartáveis são compostas por 64 poços (Figura 15), onde estão presentes diferentes substratos, que ao serem utilizados pelos microrganismos, produzem cor (reação colorimétrica) que é lida através de diferentes comprimentos de onda, no espetro do visível. Na Tabela VI estão presentes as cartas de identificação e

respetivas densidades utilizadas no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Tabela VI- Cartas de Identificação utilizadas para o sistema automático *Vitek®2 Compact 15* associando os grupos de microrganismos que se pretendem identificar e respetivas densidades (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Carta de Identificação	Tipo de Microrganismo	Densidade (McFarland)
GN	Gram-Negativo	0,6-0,63
GP	Gram-Positivo	0,6-0,63
YST	Fungos leveduriformes	1,8-2,20
ANC	Anaeróbios e <i>Corynebacterium spp.</i>	2,70-3,30
NH	<i>Haemophilus spp.</i> ; <i>Neisseria spp.</i> ; <i>Campylobacter spp.</i> e outros microrganismos fastidiosos	2,70-3,30

A suspensão utilizada para as cartas de ID é também usada para análise nas cartas de TSA. Estas cartas permitem determinar a suscetibilidade que os microrganismos têm para determinados fármacos antimicrobianos, segundo as regras EUCAST, obtendo-se o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Na Tabela VII estão representadas os tipos de cartas de testes de suscetibilidade aos fármacos antimicrobianos utilizadas no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Tabela VII- Cartas de TSA utilizadas no sistema automático *Vitek®2 Compact 15* associadas os grupos de microrganismos a determinar (Fonte: Setor de Microbiologia do SC-IPOCFG).

Carta de TSA	Tipo de Microrganismo
355	Enterobacterales
373	Pseudomonaceae e Multirresistentes
648	Staphylococcus sp.
586	Streptococcus sp. (β -hemolíticos) e Enterococcus sp. (γ -hemolíticos)
ST-03	Streptococcus sp. (α -hemólise)
YS08	Leveduras

As colónias utilizadas para a realização da suspensão são obtidas a partir da sementeira, ou de isolamento em meios sólidos adequados à ID/TSA a fazer. Os crescimentos, nestes meios de cultura, devem de ser de um só tipo de bactéria, pois são necessárias colónias puras para a suspensão, para que não surjam erros relativos e reações cruzadas entre microrganismos (ID e TSA). Caso contrário todo o procedimento terá de ser repetido. Para que haja um controlo de que a cultura é pura, é realizada a repicagem em meio de cultura, da suspensão *McFarland* utilizada.

As cartas são colocadas numa *rack* de suporte própria para o equipamento, ficando depois em contacto com as suspensões preparadas. Depois são colocadas no *Vitek®2 Compact 15* que, primeiramente as aspira e depois, as incuba num compartimento próprio com uma temperatura controlada. Durante a incubação, o equipamento realiza leituras óticas onde mede a existência de produtos corados/alteração de cor dos poços (cartas ID) e o crescimento bacteriano (densidade) (cartas TSA), de 15 em 15 minutos.

No sistema informático, próprio da casa comercial (*bioMérieux*), realiza-se a comparação dos resultados com uma base de dados e este identifica os microrganismos, associando um valor de percentagem à sensibilidade do resultado obtido. Os resultados obtidos das cartas de TSA, a partir do crescimento bacteriano associado às diluições sucessivas, permitem determinar a CMI baseada numa análise algorítmica e de acordo com as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*. São obtidos os perfis de suscetibilidade, em que são identificados os fármacos aos quais os microrganismos são suscetíveis ou resistentes *in vitro*.

Como existem antibióticos que não estão incluídos nas cartas de TSA, não sendo efetuadas de forma automática no sistema *Vitek®2 Compact 15* ou sempre que necessário, realiza-se TSA manual, através do método de difusão em disco de *Kirby-Bauer*. Este é um método realizado *in vitro*, que nos permite avaliar a resposta de um microrganismo à presença de um fármaco, presente em disco padronizado impregnado com um determinado antibiótico.

Aquando da sementeira, recorre-se ao método de sementeira em toalha em 3 planos, para se inocular as placas de gelose de *Mueller-Hinton*. As placas de MH são inoculadas com uma suspensão de 0,5 *McFarland* de colónias isoladas. Com uma pinça esterilizada são colocados os discos de antibióticos, que queremos estudar para o microrganismo em questão.

Estas placas são então incubadas a 35-37°C e durante 16 a 20 horas, sendo que as condições de aerobiose ou anaerobiose dependem do microrganismo que está a ser estudado. Não devem ser aplicados mais de 5 discos de antibiótico de 90 mm por placa, sendo que os halos de cada fármaco podem interferir uns com os outros.

A interpretação dos resultados (Figura 16) é feita através da medição, em milímetros, dos halos de inibição obtidos e a interpretação é feita a partir dos *breakpoints* das normas EUCAST. Na ausência de halos ou, aquando da medição, o halo é inferior ou igual ao *breakpoint*, dizemos que o microrganismo é resistente (R) ao antibiótico. Quando se observa que o halo

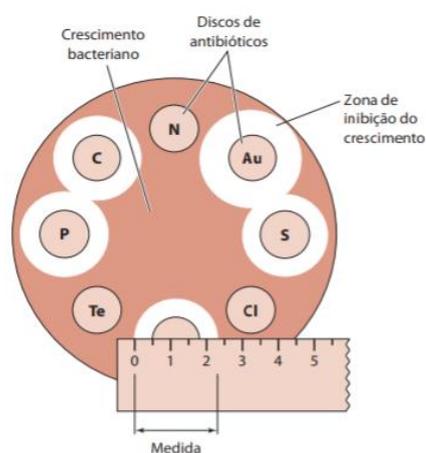


Figura 16- Testes de suscetibilidade antimicrobiana (Adaptado de: Review of medical microbiology and immunology)

é superior ou igual ao *breakpoint* dizemos que o microrganismo é suscetível (S) ao antibiótico estudado.

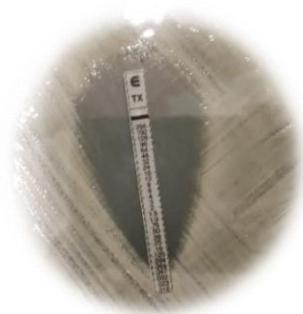


Figura 17- Metodologia E-test (Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Também se utilizam os métodos *E-test*, que consistem em tiras de plástico, onde de um dos lados se apresenta um gradiente de concentração e do outro uma escala que indica a concentração do fármaco. Para este método, também se inocula, numa gelose de MH, uma suspensão de 0,5 *McFarland* de colónias isoladas, por método de sementeira em toalha em 3 planos. A tira *E-test* (Figura 17) é colocada no centro da placa e posteriormente incubada. A interpretação dos resultados é feita com base na interseção da inibição do halo de crescimento com a escala numérica da tira, onde o número correspondente é considerado a CMI. Neste método os microrganismos também são classificados como sendo resistentes ou suscetíveis aos fármacos, consoante as normas da EUCAST.

10.3. Pesquisa de Mecanismos de Resistência: β -lactamases de Espectro Alargado (ESBL), AmpC e Carbapenemases.

Os fármacos β -lactâmicos constituem uma grande família de antibióticos amplamente utilizados na clínica, mas o aumento rápido e irreversível da resistência por parte dos microrganismos patogénicos, tem sido um grande problema na clínica (Mahon e Lehman, 2018). Os fármacos β -lactâmicos caracterizam-se por apresentar um anel beta-lactâmico essencial para a sua atividade antibacteriana. São antibióticos bactericidas, que inibem a síntese da parede celular através da interrupção do processo de transpeptidação necessário para a produção de peptidoglicano. Esse mecanismo baseia-se na união de anéis β -lactâmicos a recetores específicos localizados na superfície interior da membrana celular bacteriana, denominados “*penicilin binding proteins*” (PBPs) (Sutaria *et al.*, 2018). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese de peptidoglicano, visto que estas proteínas catalisam a ligação cruzada das subunidades β -1,4 da parede celular (entre as ligações N-acetil murâmico (NAM) e N-acetil glucosamina (NAG) do peptidoglicano) (Nester, Anderson e Roberts, 2011; Cattoir e Bicêtre, 2008). As bactérias podem desenvolver 3 tipos de mecanismos de resistência aos fármacos β -lactâmicos, como: alteração da permeabilidade de membrana; mecanismos de efluxo; alterações na proteína-alvo do antimicrobiano (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2015). A produção de ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*) constitui um dos principais mecanismos de resistência das bactérias a estes antibióticos, devido à síntese de enzimas que

catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, o que resulta em resistências à ação terapêutica das cefalosporinas podendo afetar até as moléculas de 3^a e 4^a geração.

Normalmente estas ESBL são codificadas por genes localizados em plasmídeos, que podem ser transferidos de uma célula para outra, conferindo assim resistência a outras classes de antimicrobianos (Thomson, 2010). Também as β -lactamases do tipo AmpC tem um perfil de suscetibilidade antimicrobiana semelhante aquelas que produzem ESBLs. Estas são enzimas produzidas, de forma constitutiva ou induzida, codificadas por genes cromossômicos (cAmpCs), em algumas espécies da família *Enterobacteriales*, mas também podem ser encontrados como enzimas mediadas por plasmídeos (pAmpCs) (Meini *et al.*, 2019; Coelho *et al.*, 2015). Os microrganismos do grupo CESP (*Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*), podem expressar o gene cromossômico *ampC*, em níveis baixos, no entanto, quando induzido por fármacos β -lactâmicos, vão desreprimir o gene, induzindo uma hiperprodução de β -lactamase tipo AmpC, conferindo resistência à maioria dos fármacos β -lactâmicos, como cefalosporinas (de 1^a à 3^a geração), penicilinas, e inibidores de β -lactamases (ESBL) (Doern, 2021).

As carbapenemases configuram-se como β -lactamases de maior relevância clínica em *Enterobacteriales*, considerando que o elevado poder hidrolítico de algumas dessas enzimas faz com que os isolados de microrganismos produtores de carbapenemases sejam resistentes não somente aos carbapenemos, mas a todas as classes de β -lactâmicos (Pitout, Nordmann e Poirel, 2015). Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar uma grande variedade de fármacos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e o aztreonam, tornando mais difícil o tratamento das infecções por este tipo de microrganismos (Nodari e Barth, 2016).

No Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG, estes mecanismos de resistência são pesquisados por métodos fenotípicos, genotípicos e imunocromatográficos, em microrganismos isolados da família dos *Enterobacteriales* como: *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus mirabilis*. A detecção da produção de ESBL é realizada pelo Teste de Sinergismo em Duplo Disco, em que são utilizadas cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona e cefotaxima) e um inibidor de β -lactamases (ácido clavulânico). O teste é positivo sempre que se observe sinergismo entre os discos utilizados com aumento do halo de inibição na direção do inibidor de β -lactamases. Para a detecção da produção de AmpC indutíveis, é utilizado um disco de cefoxitina. Para a detecção da produção de carbapenemases sempre que se suspeite da sua presença, é utilizado um disco de faropenemo onde se observa a resistência ao antibiótico se o *breakpoint* for inferior a 12 mm. Para estes estudos é realizada uma

suspensão bacteriana de densidade 0,5 *McFarland*, que é semeada em meio *Muller-Hinton*, pela técnica de sementeira em toalha em 3 planos e, pelo método de *Kirby-Bauer*, são adicionados os discos de antibiótico (amoxicilina-ácido clavulânico no centro, ceftriaxona a 20 mm à direita do centro, a cefotaxima a 20 mm à esquerda do centro, faropenemo e cefoxitina mais afastados dos outros discos). A placa vai a incubar durante 18 horas, a 37°C.

Após incubação observam-se os resultados, e caso ocorra sinergismo entre os antibióticos ceftriaxona, amoxicilina-ácido clavulânico e cefotaxima há indicação da presença de ESBL, ou seja, a bactéria a ser estudada é ESBL positivo. Se não houver sinergismo entre os antibióticos, a bactéria é ESBL negativo (Figura 18-A). A presença de halo de inibição em relação ao disco de cefoxitina indica que houve indução, por parte da bactéria que está a ser estudada, de AmpC, logo a bactéria a ser estudada é AmpC positiva (Figura 18-C). Caso não se observe formação de halo de inibição significa que a bactéria é AmpC negativa.

A presença de halo de inibição em relação ao disco de faropenemo indica que a bactéria inoculada é sensível a este antibiótico, ou seja, não é produtora de carbapenemases. Na ausência de halo de inibição indica a resistência ao faropenemo e, portanto, a bactéria produz carbapenemases (Figura 18-B). Como os fármacos usados contra os microrganismos produtores de carbapenemases são usados como antibiótico de última linha e como cada vez mais existem bactérias resistentes a estes, é necessário que a identificação destes microrganismos seja rápida, para que se inicie a terapêutica e para que se controle a propagação deste tipo de bactérias (Nodari e Barth, 2016). Posto isto, no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG são realizados testes rápidos imunocromatográficos e testes genotípicos para a deteção rápida deste tipo de bactérias produtoras de carbapenemases.

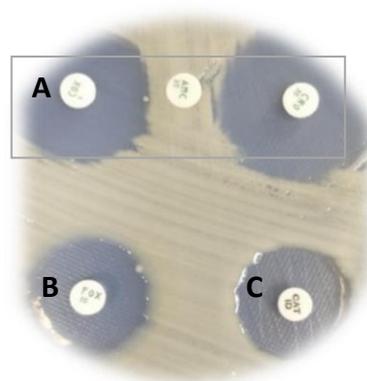


Figura 18- Pesquisa dos mecanismos de resistência: ESBL, AmpC e Carbapenemases, pelo método de difusão em disco em placa de MHE. Legenda: A-ESBL negativo; B- AmpC positiva; C-Faropenemo sensível; (Setor de Microbiologia SPC-IPOCFG)

10.4. Testes de Biologia Molecular

As técnicas de Biologia Molecular, que são realizadas no Setor de Microbiologia, são realizadas no equipamento *GeneXpert*, em que o teste mais utilizado é o que deteta a presença de material genético do microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo o estudo da mutação que confere resistência à rifampicina, fornecendo resultados dentro de 2h (de Lima et al., 2017). Utiliza a metodologia de PCR em tempo real que consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos e permite também o estudo da presença de

sequências do *rpoB* (Tille, 2016). É um sistema fechado e automatizado, de amplificação de ácidos nucleicos, onde as reações ocorrem num único cartucho, que após a adição da amostra de expetoração, permanece fechado, eliminando dessa forma, o risco de contaminação cruzada e por ser um teste fechado não produz aerossóis de bactérias viáveis, sendo, por isso considerado um teste muito seguro (de Lima *et al.*, 2017). A Tabela VIII representa os testes de Biologia Molecular realizados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

Esta metodologia só é utilizada aquando da confirmação da positividade dos métodos laboratoriais (no caso das micobactérias, se o crescimento for positivo; em caso de identificação de microrganismos alerta como os *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente; positividade para *Clostridium difficile*, ou microrganismos multirresistentes).

Tabela VIII- Testes de Biologia Molecular realizados no setor de microbiologia do SPC do IPOFG

Testes	Amostra	Função
Xpert MTB/RIF Ultra	Expetoração (sem tratamento prévio)	Deteção de DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e/ou mutações do gene <i>rpoB</i> associados a resistências à rifampicina
Xpert MRSA/SA Blood Culture	Sangue (hemocultura)	Deteção de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente (gene <i>mecA</i> e gene <i>mecC</i>)
Xpert MRSA NxG	Zaragatoas nasais/axial	
Xpert Carba-R	Zaragatoa retal	Deteção e diferenciação dos genes associados a resistência aos Carbapenemos
Xpert C. difficile BT	Fezes	Deteção de toxinas B e toxina binária

Durante a minha passagem neste setor pude vivenciar o processamento dos diversos tipos de amostras recebidas no Setor de Microbiologia, participei nas técnicas de sementeira nos meios de cultura, execução de esfregaços para as técnicas de coloração de Gram e de Kinyoun e visualização dos resultados ao microscópio ótico. Pude participar também na realização das técnicas de Identificação Microbiana e Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos. Por último, acompanhei toda a validação dos resultados biopatológicos.

Imunologia

O sistema imunológico participa, de maneira essencial, na manutenção da homeostase do organismo (Abbas e Lichtman, 2016). A compreensão e a identificação dos diferentes elementos do sistema imunitário, permitem uma avaliação clínica capaz de identificar padrões fisiopatológicos associados a perturbações do equilíbrio homeostático do sistema imune (Finn, 2008). Com o intuito de obter uma visão geral do sistema imunitário, podemos concentrar a atenção sobre algumas das alterações, como: as infecções, os tumores e os transplantes (Finn, 2008).

A pesquisa de métodos terapêuticos e profiláticos mais eficazes contra o cancro, resultou, com grande impacto, no entendimento das bases imunológicas da oncologia. A descoberta dos antígenos tumorais e dos mecanismos tumorais de evasão ao sistema imunológico, veio revolucionar a compreensão da atuação do sistema imune na gênese e desenvolvimento tumoral (Stephens e Aigner, 2016). O estudo de proteínas de células tumorais oferece uma via potencial para a compreensão dos mecanismos de interação e evasão celular, pesquisa de novos marcadores tumorais, e a produção de uma imunoterapia eficaz.

Setor de Imunologia/Hormonologia

O setor de Imunologia/Hormonologia encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Nuno Cunha, Bioquímico, Técnico Superior de Saúde do ramo Laboratório e Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Biólogos. Este Setor é um dos mais automatizados, onde são utilizadas diversas metodologias para a deteção e quantificação de hormonas, proteínas (sobretudo de fase aguda), anticorpos, autoanticorpos (para estudos de autoimunidade), enzimas, marcadores tumorais séricos e alguns fármacos. Estes parâmetros contribuem para a monitorização do doente oncológico e da sua terapêutica. A generalidade das determinações analíticas são efetuadas com recurso a equipamentos automáticos; contudo, ainda existem alguns parâmetros que são doseados por técnicas manuais, tais como: a testosterona livre, aldosterona e glucagina. Neste setor também são realizados proteinogramas, que visam a deteção de anomalias no perfil eletroforético das proteínas e imunofixações, que permitem a identificação das cadeias pesadas e das cadeias leves das imunoglobulinas, com o intuito de determinar especificamente os seus componentes. Este tipo de análises é requisitado aquando da monitorização das discrasias dos plasmócitos.

As amostras biológicas que mais frequentes são: o soro, obtido pela colheita de sangue venoso num tubo sem preparação com paredes revestidas de sílica, que facilitam a ativação da

coagulação, e gel separador; o plasma, que é obtido pela colheita de sangue para tubos com K₃-EDTA, um anticoagulante que inibe a cascata da coagulação e que permitem a determinação da hormona paratiroide (PTH) e hormona adrenocorticotrófica (ACTH); a urina pontual ou de 24 horas (com e sem HCl). Para além destes produtos, o clínico pode ainda requerer o doseamento do cortisol livre salivar e o doseamento da tiroglobulina, calcitonina ou PTH no lavado de agulha de uma biópsia (de nódulos tiroideus) aspirativa de agulha fina (BAAF).

São também colhidas amostras de sangue para tubos de heparina de lítio para o doseamento das metanefrinas fracionadas (metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina plasmáticas). Uma vez que estes metabolitos são instáveis à temperatura ambiente, têm de ser colhidos em tubos refrigerados e centrifugadas a frio (4-8°C).

Todas as amostras requerem primeiramente uma centrifugação, a 3000 rpm, durante 10 min, com exceção da urina de 24h que é primeiro homogeneizada, registando o volume, aliquotada e posteriormente centrifugada. As amostras para a realização de técnicas manuais são centrifugadas e o soro é separado para um tubo secundário, devidamente identificado e armazenado a -20°C até ao momento do seu processamento.

As amostras, após registo no sistema informático, etiquetagem do contentor (como no caso das urinas e sempre que seja necessário) e centrifugação, são colocadas no equipamento *VersaCell*, que os reencaminha para o *Immulate* ou *Advia Centaur*, seguindo para o *Kryptor*, *COBAS e601* e, consoante os parâmetros pedidos são posteriormente encaminhados para o *Atellica NEPH*, *IDS-iSYS*, *Viva-E* e/ou *Optilite*.

No Anexo 4 encontram-se indicados a tabela dos equipamentos e os parâmetros analisados no Setor de Imunologia/Hormonologia do SPC-IPOCFG.

A generalidade dos equipamentos automáticos, bem como as técnicas manuais realizadas neste setor, tem como princípio reações entre antigénio e anticorpo que são altamente sensíveis e específicas, de onde resulta a formação de imunocomplexos. Isto permite-nos a deteção de anticorpos ou de moléculas que se comportem como antigénios, como hormonas, marcadores de infeção ou marcadores tumorais (Koivunen e Krogsrud, 2006)

No laboratório, os Imunoensaios são essencialmente efetuados por dois métodos: não competitivos pelo método “*sandwich*” e competitivos.

I. Imunoensaios não competitivos ou “sandwich” e competitivos

Os imunoensaios não competitivos (Figura 19-A) possuem anticorpos primários, ou seja, anticorpos específicos fixados a uma determinada superfície, que vão estabelecer ligações com os antígenos-alvo presentes na amostra que, por sua vez se vão ligar aos anticorpos secundários marcados (Koivunen e Krogsrud, 2006). Quanto maior for a concentração do antígeno-alvo na amostra maior a intensidade do sinal obtido, sendo diretamente proporcionais

No imunoensaio competitivo (Figura 19-B) existe uma competição, para o local de ligação dos anticorpos fixados à matriz sólida, entre o antígeno-alvo e um antígeno análogo marcado (por um fluoróforo, radioisótopo ou outra molécula luminogénica) (Darwish, 2006). Quanto maior for a concentração de antígeno-alvo, menor será o sinal obtido e vice-versa, ou seja, obtém-se uma leitura inversamente proporcional.

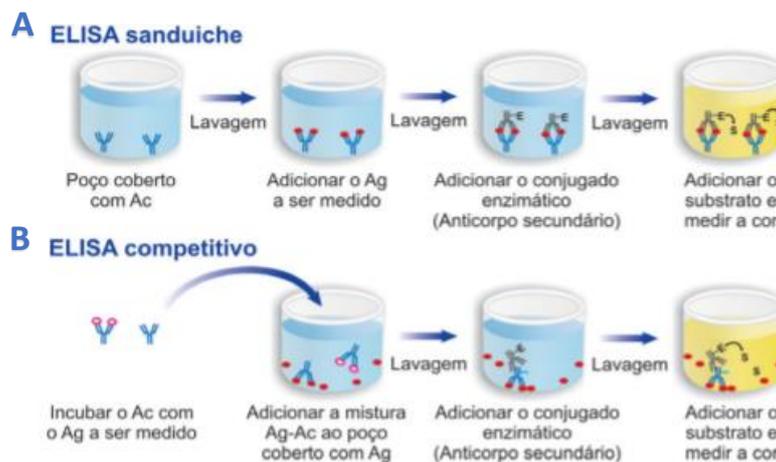


Figura 19- Imunoensaios (A) não competitivo ou "sandwich"; (B) competitivo (Adaptado de: Kurby Immunology)

2. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)

Este método é aplicado na análise de antibióticos, imunossuppressores, entre outros xenobióticos, que visam a monitorização e/ou ajuste da terapêutica. Nesta técnica dá-se uma competição entre o antígeno

da amostra (fármaco) e o antígeno análogo marcado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), para os locais de ligação do anticorpo presente na matriz (Figura 20).

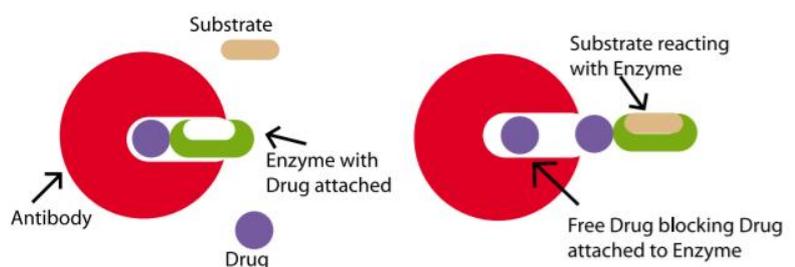


Figura 20- Imunoensaio EMIT (Adaptado de: Laboratory Medicine)

A enzima G6PD é apenas ativada na sua forma livre, ou seja, quando não há anticorpo ligado.

A reação enzimática origina a conversão de NAD a NADH, sendo assim possível o doseamento por leitura espectrofotométrica (a 340 nm.) (Darwish, 2006; Burtis e Bruns, 2014). Quanto maior a quantidade de fármaco, menor a atividade enzimática.

3. Nefelometria e Turbidimetria

A nefelometria (Figura 21-A) é um método espectrofotométrico que se caracteriza pela medição da dispersão da luz por partículas suspensas (imunocomplexos formados) determinando assim a sua concentração, medida por um detetor que se encontra num ângulo de 30-90° em relação à luz incidente. A intensidade do sinal de luz dispersa é proporcional à concentração do analito presente na amostra (Koivunen e Krogsrud, 2006; Wild, 2013).

A turbidimetria (Figura 21-B) é também um método espectrofotométrico no qual se determina a concentração dos imunocomplexos presentes na amostra através da medição da redução da intensidade do feixe de luz transmitido, que é lido num detetor a um ângulo de 180°, que quantifica a luz residual transmitida. Esta redução acontece devido aos fenómenos de dispersão, refletância e absorção da luz (Burtis e Bruns, 2014).

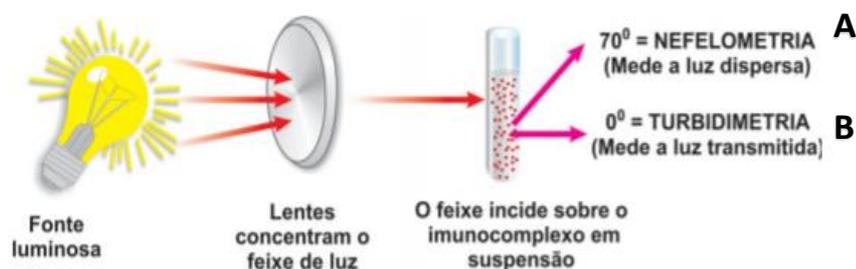


Figura 21- Imunoensaio de (A) Nefelometria e (B) Turbidimetria (Adaptado de: Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica, Capítulo 5)

4. Quimioluminescência

Neste método ocorre a excitação de um composto químico através de reações químicas, onde o composto que é excitado regressa ao seu estado fundamental e é aqui que decorre a emissão de luz (Burtis e Bruns, 2014). Nos Imunoensaios, há anticorpos que são marcados com uma enzima que, após a sua conjugação com o antígeno-alvo da amostra, hidrolisam o substrato luminogénico, provocando assim uma reação de quimioluminescência (Figura 22). No Setor de Imunologia são utilizados métodos de imunoquimioluminescência, devido à elevada sensibilidade dos métodos (Zhao, Sun e Chu, 2009).



*if not otherwise stated on instructions for use

Figura 22- Imunoensaio de Quimioluminescência (Adaptado de: A. Menarini Diagnostics, <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/autoimunidade/zenitra/caracteristicas/vantagens>)

5. Eletroquimioluminescência

Técnica semelhante à quimioluminescência, diferindo na necessidade de aplicar um estímulo elétrico através de uma corrente elétrica (Koivunen e Krogsrud, 2006).

A amostra do doente é incubada com dois anticorpos diferentes, um ligado a biotina e o outro ligado ao ruténio. Ambos os anticorpos são altamente específicos para os locais de ligação do antígeno que se quer identificar na amostra. De seguida são adicionadas esferas paramagnéticas de estreptavidina, que se ligam à biotina, formando-se assim um imunocomplexo. É então aplicado um campo elétrico e as esferas ligam-se à célula de medição. É adicionada uma solução que contém tripropilamina (TPA) que interage com o ruténio. Quando é aplicado um potencial elétrico na superfície do eletrodo dá-se a excitação do ruténio e a TPA faz com que este regresse ao seu estado fundamental através de reações *redox* entre ambos (Burtis e Bruns, 2014). A luz emitida pelo ruténio é detetada por um tubo fotomultiplicador e medida (Figura 23), permitindo a extrapolação da concentração através de uma curva de calibração, que é proporcional à concentração de analito presente na amostra.

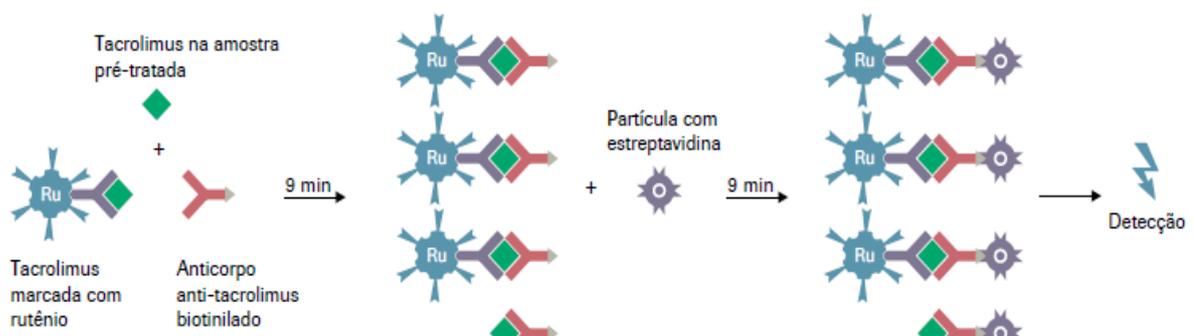


Figura 23- Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (Adaptado de: Roche diagnostics)

6. Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)

Método homogêneo que se baseia na transferência de energia não radiativa de um dador de energia, um lantanídeo designado por Criptato de Európio e um recetor de energia, uma ficobilinoproteína com origem nas algas vermelhas, a XL665 (Alpha-Bazin *et al.*, 2000). As sobreposições dos espectros, entre a emissão do dador e os espectros de absorção do recetor, por um lado, intensificam o sinal fluorescente do criptato e, por outro lado, estendem a vida útil do sinal

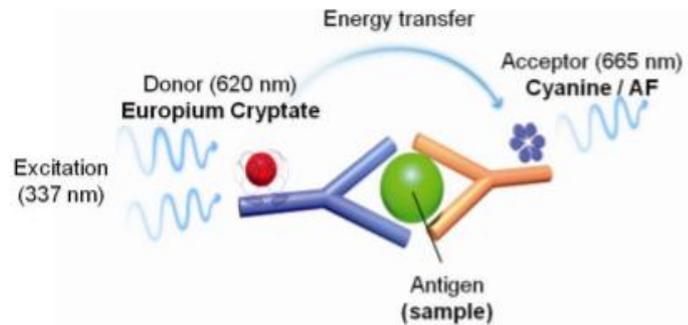


Figura 24- Imunoensaio TRACE (Adaptado de: Thermo Fisher Scientific)

recetor, permitindo a medição da fluorescência (Alpha-Bazin *et al.*, 2000). O antígeno liga-se ao anticorpo que está marcado com o criptato e ao anticorpo marcado com o fluoróforo, e pelo método em “sandwich” é formado o imunocomplexo. Isto gera uma transferência de energia, havendo excitação do fluoróforo e emissão do sinal fluorescente (Figura 24). Nesta técnica apenas os sinais de interesse são medidos, ou seja, as condições da amostra (cor, turvação, hemólise, entre outras), são assim desprezadas, o que torna esta técnica muito vantajosa (Burtis e Bruns, 2014).

7. Radioimmunoassay (RIA)

No radioimunoensaio, temos uma quantidade conhecida de antígeno de interesse que é marcado com um elemento radioativo (radioisótopo de iodo - I^{125}), que depois é adicionado ao seu anticorpo específico em fase sólida. De seguida este imunocomplexo é misturado e incubado com a amostra do doente, onde está presente o antígeno que pretendemos dosear. Existirá uma competição entre o antígeno da amostra e o antígeno marcado para os locais de ligação do anticorpo (Figura 25) (Cerdá-Kipper, Montiel e Hosseini, 2018; Wild, 2013). Após a remoção dos antígenos não ligados por lavagem, a radiação emitida é medida por um contador de radiações gama. A quantidade de antígeno marcado

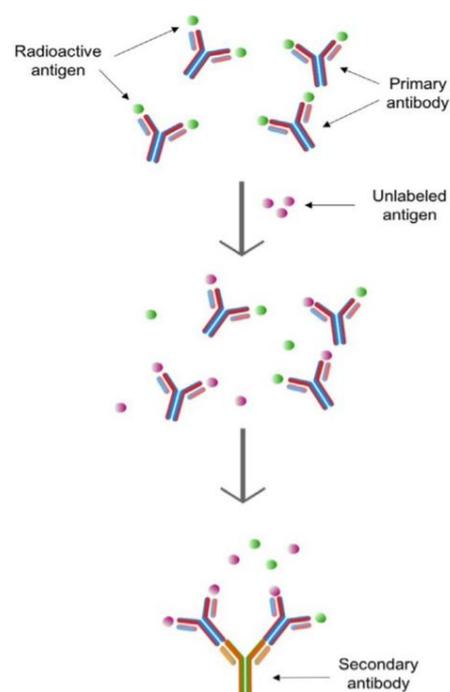


Figura 25- Radioimunoensaio (Adaptado de: Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

com o radioisótopo ligado ao anticorpo, é inversamente proporcional à concentração de antígeno alvo presente na amostra do doente (Burtis e Bruns, 2014).

Este método tem grande sensibilidade e precisão, e permite a quantificação de pequenas moléculas como hormonas e outros peptídeos em amostras biológicas (Kampff, 2021).

MARCADORES TUMORAIS

Os marcadores tumorais (Figura 26) são descritos como substâncias produzidas por células tumorais, ou em resposta a células tumorais, e são detetados na corrente sanguínea ou noutros fluidos corporais e/ou tecidos e utilizados na monitorização clínica de várias neoplasias (Molina e Filella, 2011). O termo é estendido a características de células ou tecidos, como marcadores citogenéticos, oncogenes ou proteínas expressas de forma anómala com várias funções biológicas (enzimas, hormonas, recetores, etc.), que ajudam a caracterizar o tipo de tumor e constituem alvos biológicos específicos para novas terapêuticas (Magdelénat, 1992; de Almeida *et al.*, 2007). No entanto, não existem marcadores tumorais ideais, visto que devem reunir características como, elevada especificidade para determinada neoplasia, possibilitar o diagnóstico precoce, serem sensíveis de modo a evitar falsos positivos e correlacionarem as suas concentrações com a massa tumoral, para serem verdadeiros marcadores tumorais (Sharma, 2009).

Os marcadores tumorais, apesar de estarem em fase de desenvolvimento, têm vindo a ser uma metodologia cada vez mais utilizada na clínica como uma fonte de ajuda para o combate contra o cancro (Nagpal *et al.*, 2016). Embora não apresentem elevada especificidade

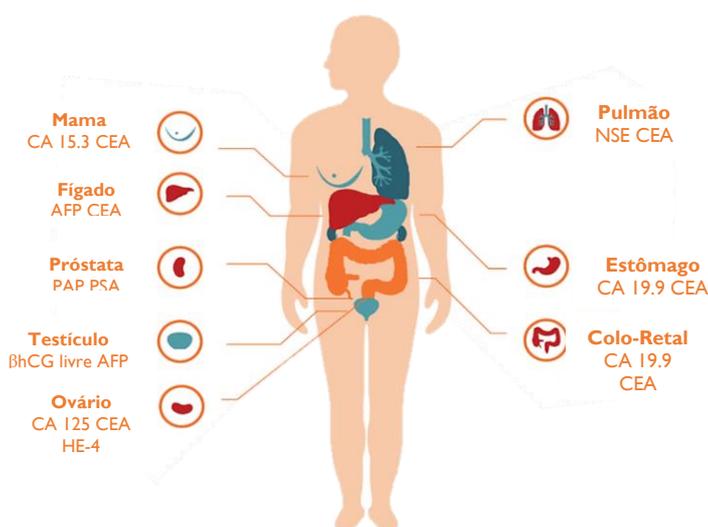


Figura 26- Alguns exemplos de Marcadores Tumorais que se podem determinar na clínica consoante o tipo de cancro (Adaptado de:

<https://clinilabibitinga.com.br/curiosidades/marcadores-tumorais/>)

para determinada neoplasia, os seus níveis na corrente sanguínea, aquando da descoberta do tumor, podem ser usados como via para a monitorização da resposta à terapêutica, da mesma forma que podem também refletir o estadiamento do tumor ajudando assim na determinação do prognóstico e/ou recidivas (Nagpal *et al.*, 2016).

Existem vários desafios no uso de marcadores tumorais. Um dos maiores desafios da utilização dos marcadores, encontra-se na sua baixa concentração sérica, aquando da fase inicial de um tumor. Existem ainda outros fatores negativos como a presença de marcadores tumorais em situações não neoplásicas; a falta de especificidade e sensibilidade singular dos marcadores tumorais para determinado tecido e/ou órgão e em alguns indivíduos pode haver a produção de baixas quantidades de marcadores tumorais, o que torna difícil o uso dos marcadores tumorais como meio de monitorização da doença (Nagpal *et al.*, 2016).

Posto isto e atendendo à sua importância clínica, a deteção e a análise destes marcadores tumorais acaba por ser um meio complementar no rastreio, diagnóstico diferencial, prognóstico, avaliação e monitorização do doente oncológico, para que se consiga proporcionar uma terapêutica mais eficaz (Sharma, 2009; Molina e Filella, 2011).

I. Antígenos Oncofetais

I.1. Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

É uma glicoproteína intracelular, produzido pelas células da mucosa gastrointestinal, durante os primeiros meses da vida do embrião e feto, e em situações normais é eliminado pelo intestino, mas este é também encontrado em concentrações pouco específicas no sangue de adultos saudáveis (Sharma, 2009).

Concentrações elevadas de CEA podem indicar a presença de cancro colorretal. Contudo este marcador tumoral não é específico, e pode ser excretado em concentrações elevadas noutros tipos de tumores, como por exemplo: cancro do pulmão, mama, gástrico, pancreático, ovário e uterino (Burtis e Bruns, 2014). Os aumentos de CEA também podem estar associados a em distúrbios benignos, tais como: tabagismo, insuficiência renal, doença de *Crohn*, doenças hepáticas, doenças intestinais, doença fibrocística da mama e bronquite (Sharma, 2009).

O interesse do uso deste marcador tumoral reside no prognóstico do doente, na avaliação da evolução clínica e na monitorização da terapêutica.

I.2. α-Fetoproteína (AFP)

É uma glicoproteína oncofetal que é sintetizada em grandes quantidades durante o desenvolvimento embrionário do saco vitelino e fígado fetal (Burtis e Bruns, 2014). A AFP está relacionada geneticamente e estruturalmente à albumina e tem uma extensa homologia na sequência de aminoácidos. Durante a gravidez, a síntese de albumina aumenta durante o desenvolvimento fetal e a concentração de AFP no soro fetal começam a diminuir até atingir

concentrações residuais 18 meses após o nascimento (Burtis e Bruns, 2014). No entanto, na presença de um tumor, os tecidos podem voltar a sintetizar a AFP.

A concentração deste marcador tumoral pode estar elevada em carcinomas hepatocelulares e tumores nas células germinativas do testículo e ovários. A concentração AFP é um bom indicador de monitorização terapêutica (Burtis e Bruns, 2016).

2. Antígenos Tumorais

2.1. Glicoproteína 15.3 (CA 15.3)

Glicoproteína mucínica de alto peso molecular produzida pelas células epiteliais glandulares mamárias, sendo também expressa noutra tipo de células comuns do corpo humano e em células cancerígenas (Burtis e Bruns, 2014). Este mucína apesar de ser o marcador de eleição no carcinoma da mama, não é suficientemente específico podendo apresentar concentrações elevadas noutra tipo de patologias malignas: cancro do pâncreas, pulmão, ovário, colorretal e fígado (Burtis e Bruns, 2014). É, no entanto, útil na monitorização da terapêutica, progressão da doença ou mesmo no diagnóstico precoce de recidiva.

2.2. Glicoproteína 125 (CA 125)

Glicoproteína expressa por tumores ováricos epiteliais, tecidos normais e tumores patológicos de origem nos ductos de Müller (trompa de Falópio, endocérnix e fundo vaginal) e mesotélios (pleura, pericárdio, peritoneu) (de Almeida *et al.*, 2007). O CA 125 é o marcador de eleição nos carcinomas do ovário, porém, pode apresentar concentrações elevadas nos carcinomas do endométrio e pulmão. A maior causa de falsos positivos são os derrames nas membranas serosas. Apesar sua utilidade maior residir no acompanhamento da resposta à terapêutica instituída, é também um marcador útil na diferenciação entre tumor maligno e benigno em pacientes com massas anexiais suspeitas (Burtis e Bruns, 2014).

2.3. Glicoproteína 19.9 (CA 19.9)

Glicoproteína presente na superfície celular, também conhecido como derivado siálico do antígeno do grupo sanguíneo Lewis-a. (de Almeida *et al.*, 2007). O CA 19.9 é produzido pelas células ductais pancreáticas, sistema biliar e pelas células epiteliais do estômago cólon, útero e glândulas salivares (Burtis e Bruns, 2014). Apesar da sua utilidade no estudo dos carcinomas gastrointestinais (colangiocarcinoma, carcinoma do esófago, gástrico e colorretal), a maior aplicabilidade dos doseamentos séricos do CA 19.9, prendem-se com a avaliação da

resposta à terapêutica, monitorização da progressão e prognóstico dos adenocarcinomas ductais pancreáticos (Magdelénat, 1992; de Almeida, *et al.*, 2007).

2.4. Glicoproteína 72.4 (CA 72.4)

O TAG-72 uma mucina de elevado peso molecular (>106 d), que apesar de ser um marcador tumoral apresenta uma elevada especificidade para cancro gástrico, mas apresenta uma baixa sensibilidade para tecidos específicos, sendo que também pode estar presente no cancro do ovário e cólon. (de Almeida *et al.*, 2007). Este marcador tumoral é utilizado no controlo de remissão e recidiva de carcinomas de trato gastrointestinal (gástrico, cólon, pâncreas e trato biliar) (de Almeida *et al.*, 2007). Quando associamos o CA 72.4 a outros marcadores como o CEA e o CA 19.9 (cancro gástrico) e CA 125 (cancro do ovário), observamos um aumento na sensibilidade diagnóstica e na monitorização da terapêutica (de Almeida *et al.*, 2007).

2.5. Proteína Epidídima Humana 4 (HE-4)

O HE-4 é a proteína precursora da proteína E4 secretada no epidídimo e pertence a uma família de inibidores de proteases envolvidos na imunidade inata (James, Chichester e Ribeiro, 2018). O HE-4 encontra-se em vários tecidos, mas está presente maioritariamente no trato genital feminino e no trato genital masculino. Apresenta-se em concentrações variadas no epitélio respiratório, nos túbulos distais renais e nas glândulas salivares (Molina e Filella, 2011). Esta proteína encontra-se sobreexpressa no carcinoma epitelial dos ovários.

A maior aplicabilidade do HE-4 observa-se na monitorização da progressão e prognóstico da terapêutica.

3. Citoqueratinas (CK)

As citoqueratinas são um grupo de proteínas que se polimerizam entre si, dando lugar a heterodímeros, e posteriormente a tetrâmeros, que se associam, formando um dos componentes dos filamentos intermédios que constituem o citoesqueleto das células epiteliais (Burtis e Bruns, 2014).

3.1. CYFRA 21.1

É um antigénio formado por um fragmento de citoqueratina 19 encontrado no soro e pode-se encontrar em concentrações elevadas em tumores que tenham um aumento de

expressão desta citoqueratina, como é o caso de tumores pulmonares (de Almeida *et al.*, 2007). Encontra-se também elevado em situações como carcinoma pulmonar de pequenas células, cancro de bexiga, de cérvix e de cabeça e pescoço (Burtis e Bruns, 2014).

As concentrações de CYFRA 21-1 são úteis no controlo do decorrer da doença e acompanhamento pós-cirúrgico (Burtis e Bruns, 2014).

4. Enzimas

4.1. Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA)

O SCCA é uma glicoproteína que pertence à família dos inibidores de serina protease inibitórios (serpinas), envolvidos na apoptose, migração celular e expansão celular. Este tem duas proteínas semelhantes, a SCCA-1 e SCCA-2, que apresentam homologia de sequência de aminoácidos, mas que codificam proteases diferentes (Chechlinska *et al.*, 2010).

Os níveis elevados de SCCA séricas são detetados em pacientes com doenças benignas de pele inflamatórias, como psoríase e dermatite atópica, bem como em pacientes com carcinomas de células escamosas, especialmente do colo do útero, cabeça e pescoço, pulmão, esôfago e vulva (Chechlinska *et al.*, 2010). Este marcador tumoral é útil na deteção de recorrência de recidivas, acompanhamento e monitorização da terapêutica (Burtis e Bruns, 2014).

4.2. Antigénio Específico da Próstata (PSA), total e livre

O PSA é uma protease serínica secretada no lúmen dos ductos prostáticos, está presente em grandes concentrações no líquido seminal, e é um marcador de eleição em todas as etapas do diagnóstico do adenocarcinoma prostático (de Almeida *et al.*, 2007). O PSA circula na corrente sanguínea complexado a duas proteínas inibidoras de proteases, a alfa-2-macroglobulina e a alfa-1-antiquimiotripsina ou sob a forma livre.

Fatores como: o aumento da idade como conseqüente hipertrofia benigna da próstata (HBP) e as prostatites levam a modificações no epitélio prostático o que provoca um aumento da libertação do PSA total para a circulação periférica. Estes fatores têm um impacto importante na especificidade deste marcador. No entanto, a sua utilização em combinação com o exame de toque retal e posterior ecografia vesico prostática com biópsia, se clinicamente necessária, permitem um diagnóstico precoce do cancro da próstata (de Almeida *et al.*, 2007).

Diversos estudos aconselham o doseamento da fração livre do PSA e a realização da razão, PSA livre/total, quando a concentração do PSA total se situa entre 4 e 10 ng/mL. Os

doentes com cancro da próstata possuem uma menor concentração de PSA na forma livre do que os doentes com HBP ou indivíduos sãos. Um quociente de 10% indicia um risco elevado de carcinoma da próstata, enquanto um valor >20% indicia uma probabilidade de cancro bastante inferior (Strittmatter *et al.*, 2011).

A quantificação do PSA total tem indicação na deteção precoce de recidiva tumoral, prognóstico e na monitorização terapêutica (Burtis e Bruns, 2014).

4.3. Enolase Neuro-específica (NSE)

A Enolase ou fosfopiruvato hidratase é uma enzima glicolítica intracelular que se encontra no tecido neuronal e em células do sistema neuroendócrino difuso. A NSE é excretada no sangue como resultado da lise celular em oposição à secreção (Burtis e Bruns, 2014). A hemólise é uma das principais causas de falsos positivos, devendo nestes casos, solicitar-se novas amostras. A NSE é encontrada em tumores com origem neuroendócrina como: carcinoma de pequenas células do pulmão, neuroblastoma, feocromocitoma, tumores carcinoides intestinais, carcinoma medular da tiróide, melanoma e tumor endócrino pancreático (Burtis e Bruns, 2014).

A concentração sérica de NSE tem utilidade na monitorização da progressão da doença quando correlacionada com o estadiamento da doença.

5. Proteínas

5.1. β 2-microglobulina (BMG)

Proteína representativa do complexo major de histocompatibilidade da classe I (MHC-I) que se localiza na superfície das células nucleadas, bem como em muitas células tumorais (Bethea e Forman, 1990). Esta proteína funciona como marcador tumoral nas doenças linfoproliferativas, como: mieloma múltiplo, linfomas e leucemias linfocíticas crónicas, onde a sua concentração sérica está diretamente relacionada com a massa tumoral (Dasgupta e Wahed, 2014). Podem-se observar aumentos da concentração desta proteína em doentes com hepatite, insuficiência renal, tuberculose, entre outros (Dasgupta e Wahed, 2014). A BMG é um bom indicador de prognóstico e monitorização do mieloma múltiplo, ao correlacionar-se com o aumento da massa tumoral, ou seja, quanto maior a concentração pior será o prognóstico (de Almeida *et al.*, 2007).

5.2. Peptídeo libertador de gastrina (ProGRP)

O GRP é um peptídeo com cerca de 27 aminoácidos, inicialmente isolado do estômago de suínos, e que está amplamente distribuído pelo sistema nervoso de mamíferos, bem como pelo trato gastrointestinal e pulmonar (Molina e Filella, 2011). Este peptídeo é secretado por carcinomas de pequenas células do pulmão, suscitados por um distúrbio neuroendócrino de diferenciação tecidual, mas apresenta grande instabilidade na corrente sanguínea impossibilitando assim a sua determinação no soro (Molina e Filella, 2011). Em contrapartida, o ProGRP apresenta-se como um precursor estável do GRP, tornando-se assim um marcador específico para os carcinomas de pequenas células do pulmão. Este peptídeo quando associado ao NSE apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico e monitorização da terapêutica (Molina, Filella e Augé, 2004).

5.3. Proteína S-100

Esta proteína faz parte de uma família de proteínas de baixo peso molecular, que se ligam ao cálcio. Esta proteína apresenta-se como um heterodímero composto por duas subunidades isoméricas α - e β -. A S-100 desempenha um papel importante em vários processos de diferenciação e proliferação celular (Jäckel *et al.*, 1999). Encontra-se no sistema nervoso central, células da glia, células de Schwann, células de Langerhans, músculo-esquelético, miocárdio, melanócitos e tecido renal (Molina e Filella 2011). O aumento dos níveis de S-100 β tem sido detetado no melanoma maligno, sendo considerado o marcador de eleição no diagnóstico, estadiamento, prognóstico e monitorização da terapêutica. Os aumentos dos níveis de S-100 estão associados a menores taxas de sobrevivência (Harpio e Einarsson, 2004).

6. Hormonas

6.1. Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)

A hCG é uma glicoproteína composta por duas subunidades, a α - e a β -, produzida pelas células sincitiotrofoblásticas da placenta, e também, mas em menores quantidades, pela hipófise, testículos, cólon, entre outros órgãos (Burtis e Bruns, 2014). A síntese de β -hCG inicia-se a partir do oitavo dia de ovulação e duplica a sua concentração a cada 2-4 dias até atingir o pico máximo entre as 12 e as 14 semanas de gestação. Podem-se observar concentrações elevadas de β -hCG e das variantes hiperglicosiladas da hCG, em tumores trofoblásticos e neoplasias de células germinativas dos ovários e dos testículos (Burtis e Bruns,

2014). Aumentos discretos da concentração sérica têm sido relacionados com condições benignas como: menopausa precoce, cirrose, úlcera duodenal e doença inflamatória intestinal.

Este marcador tumoral é muito utilizado no diagnóstico e prognóstico de pacientes com neoplasias germinativas (de Almeida *et al.*, 2007), bem como na monitorização e progressão da doença, uma vez que, as concentrações de β -hCG estão diretamente relacionadas com o volume do tumor (Burtis e Bruns, 2014).

6.2. Tiroglobulina (Tg)

Glicoproteína sintetizada exclusivamente pelos tirócitos e constitui a matriz proteica necessária para a síntese das hormonas tiroideias, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Burtis e Bruns, 2014). A Tg é usada como marcador tumoral dos carcinomas diferenciados da tireóide (CDT). A monitorização da concentração residual da Tg no pós-operatório é de extrema importância, porque alterações na concentração da Tg correlacionam-se com a massa tiroideia residual.

Deve-se quantificar simultaneamente a Tg e os anticorpos anti-tiroglobulina por causa da interferência no imunoensaio para o doseamento da Tg. Nestes casos os anticorpos anti-Tg podem servir como marcador de substituição para controlo da doença residual e/ou possíveis recidivas (Burtis e Bruns, 2014).

6.3. Calcitonina

Hormona polipeptídica secretada pelas células C parafoliculares da tireóide, que normalmente, é secretada em resposta ao aumento de cálcio no soro. Inibe a libertação de cálcio dos ossos e reduz a concentração do cálcio do soro (Burtis e Bruns, 2014). Têm como principal função fisiológica a de inibição da reabsorção óssea através da regulação dos níveis de cálcio, sendo assim antagonista da hormona paratiroideia (PTH) (Burtis e Bruns, 2014).

A concentração sérica de calcitonina também pode estar aumentada devido a outras doenças, como na insuficiência renal crónica, hipercalcémia, hiperparatireoidismo, doença de Paget, entre outros (Burtis e Bruns, 2014).

A calcitonina é o marcador tumoral de eleição no diagnóstico e monitorização terapêutica dos carcinomas medulares da tireóide (de Almeida *et al.*, 2007).

7. Outros Metabolitos

7.1. Metanefrinas e Normetanefrinas

Os feocromocitomas são tumores que produzem e secretam catecolaminas a partir da medula das glândulas suprarrenais. A metanefrina e a normetanefrina são metabolitos extra-adrenais resultantes da atividade metabólica da catecol-O-metil transferase (COMT) e a monoamina oxidase (MAO), nas catecolaminas epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina), respetivamente (Burtis e Bruns, 2014). A quantificação plasmática da metanefrina e normetanefrina tem utilidade no diagnóstico e na monitorização terapêutica de doentes com feocromocitomas ou paragangliomas. Contudo, outros tipos de tumores neuroendócrinos, podem originar grandes quantidades de catecolaminas, levando a um aumento significativo destas hormonas e dos seus metabolitos, quer na corrente sanguínea quer na urina.

7.2. Ácido Vanilmandélico (VMA)

É o principal produto final do metabolismo hepático da noradrenalina e da adrenalina (Burtis e Bruns, 2014). Este metabolito é excretado por via urinária, em grande quantidade. O seu estudo permite a deteção de tumores secretores de catecolaminas como os neuroblastomas e feocromocitomas, permitindo também a avaliação da função da medula adrenal (Burtis e Bruns, 2014).

7.3. Ácido 5-hidroxi-indolacético

É o principal metabolito da serotonina. A serotonina é convertida no fígado em ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) por ação da monoamina oxidase e é excretada na urina. O doseamento da 5-HIAA em urina de 24 horas é um biomarcador fundamental no estudo das síndromes carcinoides e das neoplasias neuroendócrinas produtoras de serotonina (Burtis e Bruns, 2014).

8. Eletroforese de Proteínas Séricas (Proteinograma) e Imunofixação

A eletroforese de proteínas séricas é um método laboratorial que permite separar proteínas séricas, em frações, de acordo com as suas cargas elétricas, peso molecular e estrutura, permitindo assim identificar quaisquer anomalias que possam existir no perfil eletroforético (Oliveira *et al.*, 2015). A amostra de soro, é aplicada num meio de suporte (um gel de agarose), a pH alcalino, onde em seguida se aplicada uma corrente elétrica, que origina a migração da amostra do cátodo (pólo negativo) para o ânodo (pólo positivo). Podemos separar as proteínas séricas em diferentes frações, consoante a sua mobilidade eletroforética no gel de agarose (Figura 27), formando-se bandas que são designadas como: albumina, alfa-1-globulinas; alfa-2-globulinas; beta-1- globulinas, beta-2-globulinas e gamaglobulinas (Silva, Lopes e Faria, 2008). As proteínas separadas são então coradas com negro de amido e fixadas, sendo depois avaliadas por densitometria, resultando um gráfico da corrida eletroforética, que nos permite quantificar as proteínas. Este gráfico apresenta-se sob a forma de espectro eletroforético (Figura 28), onde estão representadas a

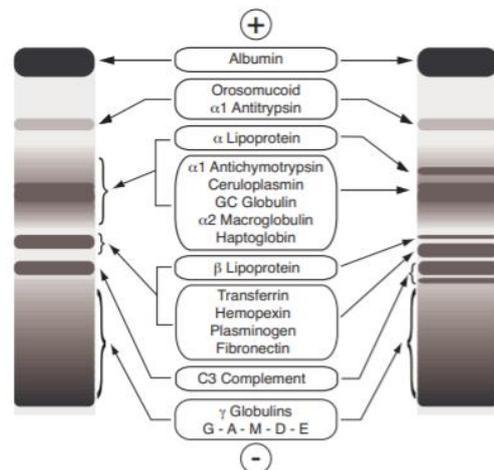


Figura 27- Mobilidade eletroforética no gel de agarose das proteínas séricas (Adaptado de: *Hydragel 61-62*)

percentagem do pico que permite calcular a concentração de cada fração através do valor da concentração total (Oliveira *et al.*, 2015).

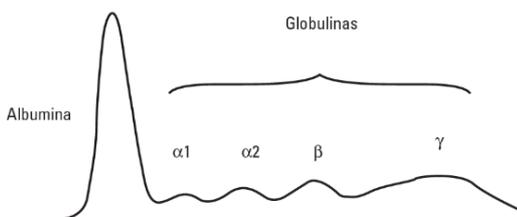


Figura 28- Espectro do Perfil Eletroforético das Globulinas (Adaptado de: *Serica proteins electrophoresis: clinical interpretation and Correlation*)

Este gráfico apresenta-se sob a forma de espectro eletroforético (Figura 28), onde estão representadas a

percentagem do pico que permite calcular a concentração de cada fração através do valor da concentração total (Oliveira *et al.*, 2015).

A eletroforese torna-se assim um método vantajoso na caracterização de algumas patologias, nomeadamente, nos processos inflamatórios agudo ou crónicos, presença de gamapatias monoclonais, entre outras, tendo em conta os principais

componentes de cada padrão eletroforético formado, auxiliando assim o estudo clínico. (Oliveira *et al.*, 2015).

A imunofixação é realizada após a deteção de um pico monoclonal no proteinograma. Esta técnica é utilizada para identificação de proteína monoclonal e a caracterização do tipo cadeias envolvidas (Silva, Lopes e Faria, 2008). Após a eletroforese da amostra para separação das proteínas, as cadeias pesadas (IgM, IgG e IgA) e leves (kappa e lambda) das imunoglobulinas

são imunoprecipitadas com diferentes antissoros específicos, o que permite a identificação das bandas monoclonais no proteinograma. Os antissoros utilizados são dirigidos às cadeias pesadas gama (IgG), alfa (IgA) e miu (IgM), cadeias leves livres kappa (K) e lambda (L) (Figura 29) (Burtis e Bruns, 2014). Na presença de um

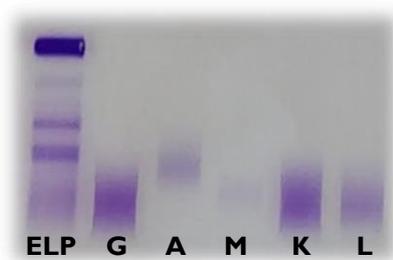


Figura 29- Imunofixação (Fonte: Setor de Imunologia/Hormonologia do SPC-IPOCFG)

componente monoclonal as bandas com padrão de migração semelhante ao perfil eletroforético da amostra (ELP) são classificadas como pertencentes à classe das cadeias pesadas IgG, IgA e IgM, e a banda, relacionada com as cadeias leves (kappa ou lambda) (Keren, 2003).

No Setor de Imunologia/Hormonologia são utilizados kits HYDRAGEL da firma SEBIA, para realizar os proteinogramas, imunofixações, separação de hemoglobinas, pesquisa da proteína de Bence Jones em urina de 24 horas, identificação e quantificação das isoenzimas da fosfatase alcalina. Para isto é utilizado o sistema semi-automático HYDRASYS, que se destina à separação eletroforética, através de géis de agarose, onde se faz a aplicação da amostra, migração eletroforética, secagem, aplicação de corantes (negro de amido ou violeta ácido), descoloração, fixação e secagem final, obtendo-se assim o gel para caracterização e interpretação por densitometria. Os produtos biológicos mais utilizados são o soro e a urina (24 horas).

Durante a minha passagem no setor pude participar na elaboração de toda a rotina de trabalho, desde receção de amostras, ao seu processamento nos equipamentos. Pude também participar na elaboração das técnicas manuais, como proteinogramas e imunofixações.

Conclusão

O estágio curricular desde cedo revelou-se ser desafiante. Com o aparecimento da pandemia Sars-Cov-2, e do estado de emergência aplicado a todo o país, vi o início da realização do mesmo ser adiada, mas com muita paciência e perseverança fui ultrapassando todas as adversidades.

Depois de superados todos os desafios impostos durante o estágio, que teve períodos de altos e baixos, reconheço que a experiência foi bastante positiva e enriquecedora, tanto a nível pessoal como profissional, permitindo desenvolver a minha autonomia, sentido crítico e confiança nos conhecimentos adquiridos.

Com a realização do estágio curricular, pude colocar em prática todos os conhecimentos obtidos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas e também evoluir profissionalmente com a supervisão da equipa multidisciplinar do SPC do IPOCFG.

Ao longo da rotina de trabalho no SPC, evidenciei que num laboratório de Análises Clínicas é necessário a realização de um trabalho cuidadoso e rigoroso, principalmente no manuseamento e processamento das amostras biológicas, porque apesar de não contactarmos diretamente com o doente oncológico, estamos a manusear parte de si, nunca esquecendo de que devido ao seu estado muito debilitado, necessita de resultados clínicos precisos e rápidos, para obter o seu diagnóstico atempado e um planeamento terapêutico personalizado, com vista à obtenção de cuidados que melhoram substancialmente a sua qualidade de vida.

Referências Bibliográficas

ABBAS, Abul e LINCHTMAN, Andrew - **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System**, 5ª Edição. Missouri: Elsevier Inc (2016) ISBN 978-0-323-39082-8.

ALPHA-BAZIN, B., *et al.* (2000) - **Europium cryptate-tethered ribonucleotide for the labeling of RNA and its detection by time-resolved amplification of cryptate emission**. *Analytical biochemistry*, 286(1), 17-25.

AROSA, Fernando; CARDOSO, Elsa e PACHECO, Francisco - **Fundamentos de Imunologia**, 2ª Edição. Porto: Lindel Lda, 2012 ISBN 978-972-757-856-6.

ASHAKIRAN, S., SUMATI, M. E., e MURTHY, N. K. (2011) - **A study of pre-analytical variables in clinical biochemistry laboratory**. *Clinical biochemistry*, 44(10-11), 944-945.

ATAY, A., *et al.* (2014) - **Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors**. *Biochemia medica*, 24(3), 376-382.

BARON, E. J., *et al.* (2013) - **A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)**. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(4), e221-e121.

BERLITZ, F. D. A. (2010) - **Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46, 353-363.

BETHEA, M. e FORMAN, D. T. (1990) - **Beta 2-microglobulin: its significance and clinical usefulness**. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 20(3), 163-168.

BEVERIDGE, T. J. (2001) - **Use of the Gram stain in microbiology**. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.

BONNET, M., *et al.* (2020) - **Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology**. *New microbes and new infections*, 34, 100622.

BURTIS, Carl. e BRUNS, David - **Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics**, 7ª Edição. Missouri: Elsevier Inc (2014) ISBN 978-1-4557-4165-6.

CAPPUCCINO, James e WELSH, Chad - **Microbiology, A Laboratory Manual**, 11^a Edição. Inglaterra: Pearson Education Limited (2017) ISBN: 978-1-292-17578-2.

CATTOIR, V., e BICÊTRE, F. (2008) - **Les Nouvelles bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)**. Pathologie infectieuse en réanimation, 204-209.

CERDA-KIPPER, A. S.; MONTIEL, B. E. e HOSSEINI, S. (2018) - **Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.

CHAVES, C. D. (2010) - **Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas**.

CHECHLINSKA, M., et al. (2010) - **Squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 expression in cultured normal peripheral blood mononuclear cells and in vulvar squamous cell carcinoma**. Tumor Biology, the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 31(6), 559-567.

CHEN, D. S. e MELLMAN, I. (2013) - **Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle**. Immunity, 39(1), 1-10.

COELHO, I. C., et al. (2015) - **Assessment of the susceptibility of Klebsiella pneumoniae to beta-lactams**. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, 5(2), 79-83.

COICO, R. (2006) - **Gram staining**. Current protocols in microbiology, 00: A.3C.1-A.3C.2.

da COSTA, R. R., SILVA, M. R., e GONÇALVES, I. C. (2018) - **Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura**. Rev Med Minas Gerais, 28(Supl 5), S280525.

DARWISH, I. A. (2006) - **Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances**. International journal of biomedical science: IJBS, 2(3), 217-235.

DASGUPTA, A., e WAHED, A. (2014) - **Tumor Markers**. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control, Capítulo 13, páginas 229-247.

de ALMEIDA, J. R. C., et al. (2007) - **Marcadores tumorais: revisão de literatura**. Revista Brasileira de Cancerologia, 53(3), 305-316.

de LIMA, T. M., et al. (2017) - **Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 8(2), 65-76.

DOERN, C. D. (2021) - **Review of AmpC Beta-Lactamases in the Enterobacterales-Answers to Common Questions**. Clinical Microbiology Newsletter, 43(10), 8%86.

FINN, O. J. (2008) - **Cancer immunology**. New England Journal of Medicine, 358(25), 2704-2715.

FONSECA, Ana *et al.* - **Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção (2004).

GOMES, M., *et al.* (2010) - **Patologia oncológica num Hospital Central no século XXI: Novos casos nos HUC**. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, 17(2), 79-84.

GUIMARÃES, A. C., *et al.* (2011) - **O laboratório clínico e os erros pré-analíticos**. Revista HCPA. Vol. 31, n. 1 (2011), p. 66-72.

HARPIO, R. e EINARSSON, R. (2004) - **SI00 proteins as cancer biomarkers with focus on SI00B in malignant melanoma**. Clinical Biochemistry, 37(7), 512!518.

IPO COIMBRA – **Serviço Nacional de Saúde. História do IPO de Coimbra** [Acedido a 27 de abril de 2021]. Disponível na Internet: <http://www.ipocoimbra.min-saude.pt/category/institucional/caracterizacao-institucional/>.

JÄCKEL, A., *et al.* (1999) - **S-100 β -Protein im Serum als Tumormarker beim malignen Melanom Aktueller Kenntnisstand und klinische Erfahrungen**. Der Hautarzt, 50(4), 250-256.

JAMES, N. E., CHICHESTER, C., e RIBEIRO, J. R. (2018) - **Beyond the biomarker: understanding the diverse roles of human epididymis protein 4 in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer**. Frontiers in oncology, 8, 124.

JORGENSEN, James; CARROLL, Karen e FUNKE, Guido - **Manual of Clinical Microbiology**, 11^a edição. Washington,D.C: ASS Press (2015) ISBN: 978-1-55581-737-4.

KAMPPF, A. J. C. (2021) - **Percursos de inovação pedagógica: ensaios investigativos da prática docente**. Capítulo 5. EDIPUCRS.

KEREN, David- **Protein electrophoresis in clinical diagnosis**. 1^a Edição. Grã Bretanha: Hodder Arnold (2003) ISBN 978-0-340-81213-6.

KHAN, Hassan Ahmed; BAIG, Fatima Kanwal e MEHBOOB, Riffat - **Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance**. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol. 7, 5 (2017) 478–482. ISSN 2221-1691.

KOIVUNEN, M. E. e KROGSRUD, R. L. (2006) - **Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories**. Laboratory Medicine, Volume 37, Issue 8, Agosto 2006, Pages 490!497.

LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO - **Sobre o cancro. Fatores de risco** [Acedido a 15 de maio de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ligacontracancro.pt/factores-de-risco/>.

LIMA, A. A. N., *et al.* (2006) - **Aplicação do controle estatístico de processo na indústria farmacêutica**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 27(3).

MAGDELÉNAT, H. (1992) - **Tumour markers in oncology: past, present and future**. Journal of immunological methods, 150(1-2), 133-143.

MAGNETTE, A., *et al.* (2016) - **Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories**. Thrombosis journal, 14, 49.

MAHON, Connie R. e LEHMAN, Donald C. - **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6ª Edição. Missouri: Elsevier Inc (2018) ISBN 978-0-323-48218-9.

MARQUES-GARCIA, F., *et al.* (2015) - **Importance of implementing an analytical quality control system in a core laboratory**. Revista de calidad asistencial : organo de la Sociedad Espanola de Calidad Asistencial, 30(6), 302!309.

MARTELLI, A. (2011) - **Gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas**. Journal of Health Sciences.

MEINI, S., *et al.* (2019) - **AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriales: what a clinician should know**. Infection, 47(3), 363-375.

MOLINA, R., FILELLA, X., e AUGÉ, J. M. (2004) - **ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer**. Clinical biochemistry, 37(7), 505-511.

MOLINA, Rafael e FILELLA, Xavier (2011) - **Marcadores tumorales, Estado actual y perspectivas de futuroII**. Roche Diagnostics.

MONTEIRO, J. A. - **Infeções nosocomiais. Alguns aspectos**. Acta Médica Portuguesa. Vol. 6 (1993) 135!140.

MURRAY, Patrick. R.; ROSENTHAL, Ken. S. e PFALLER, Michael. A. - **Medical Microbiology**, 8ª Edição. Filadélfia: Elsevier Inc (2015) ISBN 978-0-323-29956-5.

NAGPAL, M., *et al.* (2016) - **Tumor markers: A diagnostic tool**. National journal of maxillofacial surgery, 7(1), 17-20.

NESTER, Eugene; ANDERSON, Denise e ROBERTS, Evans Jr - **Microbiology: A Human Perspective**. 7ª Edição. New York: McGraw-Hill (2011) ISBN 978-0-07-337531-1.

NODARI, C. S., e BARTH, A. L. (2016) - **Resistência a antimicrobianos em enterobactérias: foco em carbapenemases**. Journal of Infection Control, 5(1).

OLIVEIRA, E. D., *et al.* (2015) - **Eletroforese: conceitos e aplicações**.

OWEN, Judith A., *et al* - **Kuby immunology** 8ª Edição. New York: W.H. Freeman & Company (2019) ISBN 978-1-319-26722-3.

PITOUT, Henry C.- **Fundamentals of Oncology**. 4ª Edição. New York: Marcel Dekker, Inc. (2002.) ISBN 0-8247-0650-1.

PITOUT, J. D., NORDMANN, P., e POIREL, L. (2015) - **Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae, a key pathogen set for global nosocomial dominance**. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(10), 5873-5884.

SHARMA, S. (2009) - **Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines**. Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology, 30(1), 1-8.

SILVA, R. O. D. P., LOPES, A. D. F., e FARIA, R. M. D. D. (2008) - **Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica**.

SIMÕES, M. S. (2016) - **O cancro**. Fundação Francisco Manuel dos Santos.

STEIN, C. J. e COLDITZ, G. A. (2004) - **Modifiable risk factors for cancer**. British journal of cancer, 90(2), 299-303.

STEPHENS, Frederick O. e AIGNER, Karl Reinhard - **Basics of oncology**, 2ª Edição Londres: Springer (2016) ISBN 978-3-319-23367-3.

STRITTMATTER, F., *et al.* (2011) - **Detection of prostate cancer with complexed PSA and complexed/total PSA ratio- is there any advantage?** European journal of medical research, 16(10), 445-450.

SUTARIA, D. S., *et al.* (2018) - **First penicillin-binding protein occupancy patterns of -Lactams and -lactamase inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e00282-18.

SYDNOR, E. R. e PERL, T. M. (2011) - **Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings.** *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 141-173.

THOMSON, K. S. (2010) - **Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues.** *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1019-1025.

TILLE, Patricia M. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.** 14^a Edição. Missouri: Elsevier Inc (2016) ISBN 978-0-323-35482-0.

WILD, David, *et al* (2013) - **Chapter 7.1 - Introduction to Immunoassay Product Technology in Clinical Diagnostic Testing.** *The Immunoassay Handbook.* Oxford: Elsevier (2013) ISBN 978-0-08-097037-0, p.509-515.

ZHAO, L., SUN, L., & CHU, X. (2009) - **Chemiluminescence immunoassay.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), 404-415.

Anexos

Anexos

ANEXO I

Tabela IX- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

Equipamento	Tipo de Amostras	Função	Parâmetros
DxH 900 Analyzer da Beckman Coulter® (2)	Sangue total (tubo de EDTA)	Autoanalisador para Hemogramas e contagem de reticulócitos	Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Basófilos, Eritrócitos, Hemoglobina, Plaquetas, Reticulócitos, Hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), <i>Red Cell Distribution Width</i> (RDW)
Teste I BCL da ALI FAX® (2)	Sangue total	Velocidade de Sedimentação Globular	Velocidade de Sedimentação (VS)
Aerospray® 7150 HematologyPro da WESCOR®	Sangue total Aspirados de medula óssea	Coloração de Esfregaços	
ACL TOP® CTS 350 da Instrumentation Laboratory	Plasma (tubo de citrato de sódio)	Estudos da Hemóstase	Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativado (TTPa), Tempo de Protrombina (TP), <i>International Normalized Ratio</i> (INR), Tempo de Trombina (TT), Fibrinogênio, D-Dímeros, Fatores da Coagulação
Cytomics™ FC 500 da Beckman Coulter®	Sangue total, Aspirados de Medula óssea, Biópsias de gânglios linfáticos	Estudos de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	
GeneXpert® da Cepheid	Sangue total (tubo de EDTA)	Estudos genéticos por reação de PCR em tempo real	Pesquisa e quantificação do gene BCR-ABL
Microscópio Ótico de Fluorescência da Nikon	Observação das técnicas de FISH		

ANEXO 2

Tabela X- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.

Equipamento	Função	Método de Análise	Parâmetros	
Atellica CH Analyzer Siemens	Auto-Analisador para determinação dos parâmetros bioquímicos	Espetrofotometria e Potenciometria indireta (Ionograma)	Ácido Úrico, Albumina, Amilase, Amônia, Alanina aminotransferase(ALT), Aspartato aminotransferase(AST), Bilirrubina direta, Bilirrubina total, Cálcio total, Capacidade Total de Ligação ao Ferro (TIBC), Colesterol HDL, Colesterol LDL, Colesterol Total, Creatina quinase (CK), Creatinina, Ferro, Fosfatase Ácida Total, Fosfatase Alcalina (ALP), Fósforo	Gama-Glutamil transferase (GGT), Glicose, Hemoglobina Glicada A1C, Lactato desidrogenase (LDH), Magnésio, Microalbumina Pré-Albumina Proteínas totais Triglicerídeos Ureia Ionograma: Cloro Potássio Sódio
ABL 800 FLEX Radiometer Copenhagen	Analisador semi-automático para determinação de cálcio ionizado e gasometrias	Potenciometria e Amperometria	Equilíbrio Ácido-Base pH pCO2 pO2 Oximetria Hemoglobina Saturação de O2 Frações de Hemoglobina	Eletrólitos Sódio Potássio Cloro Cálcio Metabolitos: Lactato Glucose
Rapidlab 1265 Siemens	Confirmação de resultados de ionograma	Potenciometria direta	Sódio, Potássio e Cloro	
Reflotron Roche Diagnostics	Confirmação dos resultados obtidos no <i>Atellica</i> por química seca	Refratometria	Análise dos parâmetros necessários de confirmar	
Outros equipamentos	Centrifugas, frigoríficos, vortéx, agitador			

ANEXO 3

Tabela XI- Equipamentos do Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG

Equipamento	Funções	
Aerospray® Gram Series 2 Aerospray® TB Series 2	Colorações de Gram e <i>Kinyoun</i> , respectivamente	
BD Bactec™ 9120 Blood Culture System	Sistema automatizado para incubação de hemoculturas e detecção por fluorescência do crescimento microbiano	
Vitek®2 Compact I5 (bioMérieux)	Identificação de microrganismos e teste de suscetibilidade a antibióticos	
Acceletare Pheno® System	Identificação e Testes de suscetibilidade a antimicrobianos a partir de hemoculturas positivas	
GeneXpert® da Cepheid	Sistema automatizado para análise por RT-PCR de detecção de micobactérias	
UVIttec BTS 20 L	Equipamento de emissão de luz UV utilizado para a leitura das galerias <i>Crystal™</i>	
Câmara de fluxo laminar Forma Scientific	Manipulação das amostras biológicas em ambiente estéril e seguro	
Estufas	25°C para fungos superficiais	Local de incubação de microrganismos em temperaturas adequadas
	30°C para fungos filamentosos	
	37°C com CO ₂ para amostras mais variadas	
	37°C sem CO ₂ para micobactérias	
	42°C para <i>Campylobacter</i> e fungos termófilos	
Frigoríficos	Sem congelamento onde são armazenados meios de cultura líquidos e sólidos, amostras e ID/ATB	Local de armazenamento de amostras, reagentes e meios de cultura
	Com congelamento onde são armazenados os <i>E-test</i> e amostras para conservar	
Outros equipamentos	Microscópios óticos e centrífuga	

ANEXO 4

Tabela XII- Equipamentos e parâmetros analisados no Setor de Imunologia/Hormonologia do SPC-IPOCFG

Equipamento	Método	Parâmetros Analisados
Immunelite2000®XPi da Siemens	Imunoensaio de Quimioluminescência (CLIA)	α -fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionário (CEA), β 2-microglobulina (BMG), <i>Insulin-Like Growth factor I</i> (IGF), hormona do crescimento humana (GRH) antígeno específico da próstata (PSA), gonadotrofina coriônica humana (HCG), Imunoglobulina estimuladora da tireóide (TSI)
Advia Centaur XPT® da Siemens	Imunoensaio de Quimioluminescência (CLIA)	Estradiol, hormona folículo-estimulante (FSH), Prolactina, Ferritina, hormona luteinizante (LH), Progesterona, 25-hidroxivitamina D total, hormona estimuladora da tireóide (TSH) e IgE total
Cobas e601 Analyzer® da Roche Diagnosis	Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (ECLIA)	Hormona adrenocorticotrófica (ACTH), ATG, Tiroglobulina de 2ª geração, Cortisol, Calcitonina, Vitamina B12, Triiodotironina livre (FT3), Tiroxina livre (FT4), Triiodotironina(T3), Tiroxina(T4), Ácido Fólico, Testosterona total, Osteocalcina, Proteína S100, Peptídeo C (PEP-C), Insulina, Proteína do epidídimo humano 4 (HE-4), peptídeo libertador de progastrina (ProGRP), Glicoproteína 125/ 19.9/ 72.4, Cyfra 21.1
IDS-iSYS da Immunodiagnostic systems	Imunoensaio de Quimioluminescência	Renina e aldosterona plasmática, anti-rubéola, anti-Toxoplasma gondii e anti-vírus herpes simplex (anti-HSV) 1 e 2 (IgG e IgM), anti-vírus Epstein-Barr (anti-EBV) (VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG e VCA IgM)
Atellicca NEPH 630® da Siemens	Nefelometria	Fatores do complemento C3 e C4, (TRF) Transferrina, IgA, (sTfR) recetor solúvel de transferrina, IgM, α -I antitripsina (AAT), IgG, homocisteína, haptoglobina, ceruloplasmina, Proteína C Reativa de alta sensibilidade (hsPCR)
KryptorGold® da Thermo™	Imunoensaio de fluorescência por 'Time-Resolved Amplified Cryptate Emission' (TRACE)	Glicoproteína 15.3, enolase neuro-específica (NSE), Procalcitonina (PCT) e antígeno carcinoma de células escamosas (SCCA)
Viva-E® da Siemens	Imunoensaio por 'Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique' (EMIT)	Ácido Valpróico, Gentamicina, Vancomicina, entre outros fármacos

Optilite® da Binding Site	Turbidimetria	Cadeias leves livres Kappa e Lambda, IgG4 e IgD
Phadia™ 200 Thermo™	Imunoensaio de fluorescência enzimática (FEIA)	Anti-dsDNA, anti-Cardiolipina e anti-β2-Glicoproteína I IgG e IgM, anti-CCP2
Hydrasys 2® Scan Focusing da Sebia	Eletroforese e Imunofixação	
EUROIMMUN Analyzer I-2P	Imunoensaio de ELISA automático	
LKB Wallac 1272 CliniGamma Counter	Contador gama para técnicas manuais com radioisótopos	
Outros equipamentos	Centrifuga, agitadores, banho de incubação	

ANEXO 5

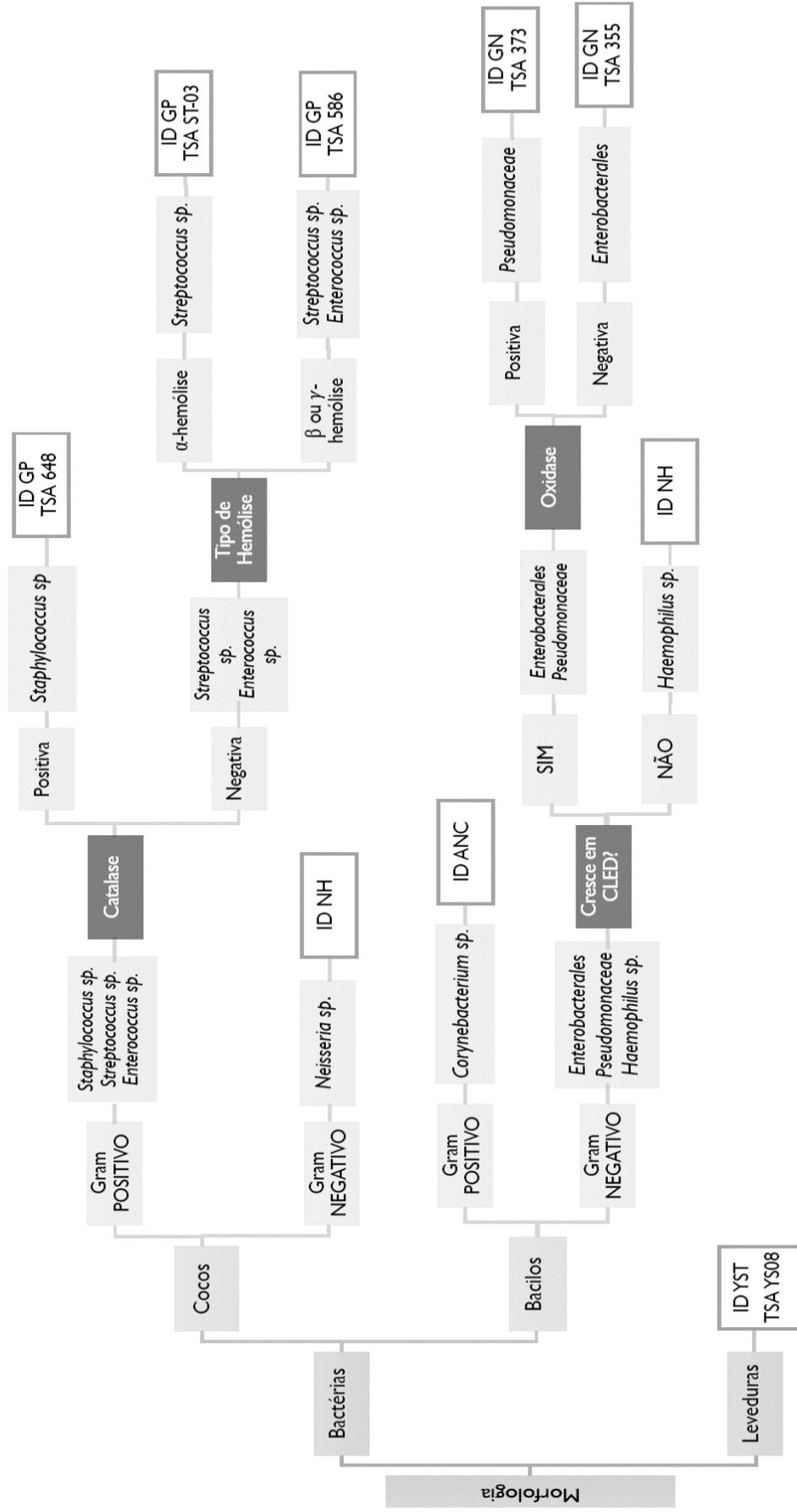


Figura 1 | - Esquema utilizado no Setor como guia para o processamento da identificação de bactérias. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG).