



Ana Filipa de Freitas Lopes

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Relatório de Estágio

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

2014/2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Relatório de estágio realizado por: Ana Filipa de Freitas Lopes

Orientador externo: Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido

Orientador interno: Prof. Dra. Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva

Local de estágio: Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

Período de estágio: Novembro de 2014 a Junho de 2015

Duração: 600 horas

Áreas: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia

## **Declaração**

Eu, Ana Filipa de Freitas Lopes, estudante do Mestrado em Análises Clínicas com o nº 2013115316, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projecto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de Setembro 2015.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO</b> .....	2
2.1 - SETOR DE HEMATOLOGIA .....	3
2.2 - SETOR DE MICROBIOLOGIA .....	4
2.3 - SETOR DE QUÍMICA CLÍNICA.....	5
2.4 - SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA.....	6
<b>3 - CONTROLO DE QUALIDADE</b> .....	8
3.1 - CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO.....	8
3.2 - CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO.....	9
<b>4 - SETOR DE MICROBIOLOGIA</b> .....	10
4.1 - COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS .....	11
4.2 - EXAME DIRETO.....	11
4.2.1 - COLORAÇÕES E CONTRASTANTES .....	12
4.3 - MEIOS DE CULTURA.....	13
4.4 - CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO .....	15
4.5 - PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO .....	16
4.5.1 - SANGUE .....	16
4.5.2 - URINA .....	18
4.5.3 - FEZES .....	20
4.5.4 - EXPETORAÇÃO.....	23
4.5.5 - EXSUDADO VAGINAL .....	27
4.5.6 - LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR).....	29
4.5.7 - BIÓPSIAS GÁSTRICAS .....	31
4.5.8 - CATETER VASCULAR .....	31
4.5.9 - FÂNEROS .....	32

4.6 - IDENTIFICAÇÃO E ANTIBIOGRAMAS.....	35
4.6.1 - PROVAS CLÁSSICAS.....	35
4.6.2 - SISTEMA VITEK® 2 COMPACT 15.....	36
4.6.3 - GALERIAS ATB™.....	37
4.6.4 - MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO.....	37
<b>5 - SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA – MARCADORES TUMORAIS.....</b>	<b>39</b>
5.1- IMUNOENSAIOS EM IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA.....	39
5.1.1 - RADIO IMMUNO ASSAY (RIA) E IMMUNO RADIOMETRIC ASSAY (IRMA) ..	41
5.1.2 - CHEMILUMINESCENT IMMUNO ASSAY (CLIA).....	41
5.1.3 - ELECTROCHEMILUMINESCENT IMMUNO ASSAY (ECLIA).....	42
5.1.4 - TIME RESOLVED AMPLIFIED CRYPTATE EMISSION (TRACE).....	42
5.1.5 - ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE (EMIT).....	43
5.1.6 - FLUORESCENCE ENZYME IMMUNOASSAY (FEIA).....	44
5.1.7 - NEFELOMETRIA.....	44
5.2 - MARCADORES TUMORAIS E UTILIDADE CLÍNICA.....	45
5.2.1 - COLHEITA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	46
5.2.2 - ANTIGÉNIOS ONCOFETAIS.....	46
5.2.2.1 - Alfa-Fetoproteína.....	46
5.2.2.2 - Antígeno Carcinoembrionário.....	47
5.2.3 - ANTIGÉNIOS ONCOPLACENTARES.....	48
5.2.3.1 - Gonadotrofina Coriônica Humana.....	48
5.2.4 - ANTIGÉNIOS MUCÍNICOS.....	49
5.2.4.1 - Antígeno Carbohidrato 15.3.....	49
5.2.4.2 - Antígeno Carbohidrato 125.....	49
5.2.4.3 - Antígeno Carbohidrato 19.9.....	50
5.2.4.4 - Antígeno Carbohidrato 72.4.....	50
5.2.5 - ANTIGÉNIOS TECIDULARES.....	51
5.2.5.1 - Antígeno de Carcinoma das Células Escamosas.....	51
5.2.6 - HORMONAS.....	51
5.2.6.1 - Calcitonina.....	51
5.2.7 - ENZIMAS.....	52
5.2.7.1 - Antígeno Específico da Próstata.....	52
5.2.7.2 - Enolase Neuro Específica.....	54

5.2.8 - FRAGMENTOS DE CITOQUERATINAS.....	54
5.2.8.1 - Cyfra 21.1 .....	54
5.2.9 - OUTROS MARCADORES TUMORAIS.....	55
5.2.9.1 - Tiroglobulina .....	55
5.2.9.2 - Proteína Epidídima Humana 4.....	56
5.2.9.3 - Cromogranina A .....	57
5.2.9.4 - Proteína S100B .....	57
5.2.9.5 - $\beta$ 2 Microglobulina .....	58
<b>6 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>xi</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>xv</b>



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em especial à Prof. Dra. Leonor Almeida.

Aos meus orientadores Dr. Frederico Valido e Prof. Dra. Teresa Dinis.

Aos meus co-orientadores Dr. Paula Gama, Dr. Nuno Cunha e Dr. Jorge Reis.

Aos meus amigos e colegas de mestrado.

À minha família.

Ao meu namorado.





## ABREVIATURAS

ACTH - Hormona Adrenocorticotrófica, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*

AES™ - *Advanced Expert System™*

AFP - Alfa-Fetoproteína

AINES - Anti-Inflamatórios Não Esteróides

ALP - Fosfatase Alcalina

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

ATCC - *American Type Culture Collection*

B.A.A.R. - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BHI - *Brain Heart Infusion*

BMG -  $\beta$ 2 Microglobulina

CA 125 - Antígeno Carbohidrato 125, do inglês *Carbohydrate Antigen 125*

CA 15.3 - Antígeno Carbohidrato 15.3, do inglês *Carbohydrate Antigen 15.3*

CA 19.9 - Antígeno Carbohidrato 19.9, do inglês *Carbohydrate Antigen 19.9*

CA 72.4 - Antígeno Carbohidrato 72.4, do inglês *Carbohydrate Antigen 72.4*

CAL - Calcitonina

CAM - Gelose *Campylosel*

CEA - Antígeno Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

CgA - Cromogranina A

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CLED - Gelose *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*

CLIA - *Chemiluminescent Immuno Assay*

CMI - Concentrações Mínimas Inibitórias

CNA - Gelose Columbia ANC + 5% de sangue carneiro

COS - Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

ECLIA - *Electrochemiluminescent Immuno Assay*

EMIT - *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEIA - *Fluorescence Enzyme Immunoassay*

FSH - Hormona Folículo Estimulante, do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*

G6PDH - Glucose-6-Fosfato-Desidrogenase, do inglês *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*

GDH - Glutamato Desidrogenase

GGT - Gama Glutamyltransferase

hCG - Gonadotrofina Coriónica Humana, do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*  
HDL - *High Density Lipoproteins*  
HE-4 - Proteína Epidídimal Humana 4, do inglês *Human Epididymis Protein 4*  
INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
IPOCFG - Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil  
IRMA - *Immuno Radiometric Assay*  
LCR - Líquido Cefalorraquídeo  
LDH - Lactato Desidrogenase  
LDL - *Low Density Lipoproteins*  
LH - Hormona Luteinizante, do inglês *Luteinizing Hormone*  
LJ-T - Meio Löwenstein-Jensen  
NAD - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*  
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto  
NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*  
NSE - Enolase Neuro Específica, do inglês *Neuron Specific Enolase*  
PSA - Antígeno Específico da Próstata, do inglês *Prostatic Specific Antigen*  
PTH - Hormona da Paratiroide, do inglês *Parathyroid Hormone*  
PVX - Gelose Chocolate *PolyViteX*  
RIA - *Radio Immuno Assay*  
RIQAS EQA - *Randox International Quality Assessment Scheme, External Quality Assessment*  
RLUs - Unidades Relativas de Luz, do inglês *Relative Light Unit*  
ROMA - *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*  
SCC - Antígeno de Carcinoma das Células Escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinoma*  
SCS - Gelose Schaedler + 5% de sangue de carneiro  
SGC - Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SPC - Serviço de Patologia Clínica  
T<sub>3</sub> - Triiodotironina  
T<sub>4</sub> - Tiroxina  
TG - Tioglobulina  
TRAbs - Anticorpos Anti-Recetor da TSH, do inglês *Thyrotropin Receptor Antibodies*  
TRACE - *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*  
TSH - Hormona Estimulante da Tiróide, do inglês *Thyroid-Stimulating Hormone*  
UFC/mL - Unidades Formadoras de Colónias por mililitro

## **RESUMO**

O estágio profissional no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) e envolveu diversas áreas laboratoriais: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia, no período de Novembro de 2014 a Junho de 2015. Neste relatório, primeiro são apresentadas as características do local onde decorreu o estágio e dos diferentes setores, bem como as estratégias utilizadas e a importância do controlo de qualidade no laboratório de Análises Clínicas. De seguida, são aprofundadas as áreas da Microbiologia e da Imunologia e Hormonologia, onde é feita uma descrição detalhada das atividades desenvolvidas durante o estágio.

## **ABSTRACT**

The professional internship within the Master's degree in Clinical Analysis in the "Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra" took place at the Clinical Pathology Department of the "Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG)" and it involved several laboratory areas such as Haematology, Microbiology, Clinical Chemistry and Immunology and Hormonology, from November 2014 to June 2015. In this report, the characteristics of the place where the internship took place and the different sectors are presented first, as well as the strategies used and the importance of quality control in the laboratory of Clinical Analysis. Then, the areas of Microbiology and Immunology and Hormonology are thoroughly presented, containing a detailed description of the activities developed during the internship.



# I - INTRODUÇÃO

Nas Análises Clínicas, os exames laboratoriais são imprescindíveis para complementar os dados clínicos, contribuindo na prevenção, rastreio, diagnóstico e monitorização da doença, bem como na definição e auxílio do tratamento. O meu elevado interesse e entusiasmo por esta área, levaram-me a concorrer ao Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O plano curricular do mestrado inclui a realização de um estágio profissional em Análises Clínicas e respetivo relatório final para a conclusão do 2º ciclo de estudos, tendo-me sido dada a oportunidade de realizar esse estágio no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (SPC-IPOCFG). Foi designado para meu orientador externo o Dr. Frederico Valido e para minha orientadora interna a Prof. Dra. Teresa Dinis.

O estágio teve início em meados de Novembro de 2014 e incluiu 600 horas (num período de 7 meses) de formação em contexto real de trabalho, divididas por 4 áreas: Hematologia (6 semanas), Microbiologia (6 semanas + 4 semanas), Química Clínica (4 semanas) e Imunologia e Hormonologia (4 semanas + 4 semanas). No presente relatório decidi apresentar as áreas da Microbiologia e da Imunologia e Hormonologia, por isso a maior permanência nestas duas áreas laboratoriais e dada a diversidade de análises realizadas nesta última área resolvi focar-me nos Marcadores Tumorais.

Ao longo do estágio foi possível consolidar e aprofundar conhecimentos teóricos, melhorar consideravelmente a componente prática laboratorial através da execução de várias técnicas, aprender como se faz a manutenção, calibração e controlo dos equipamentos, e ainda aprender a avaliar e validar os resultados obtidos no contexto clínico. Além disso, também tive a oportunidade de seguir de perto e de participar no controlo de qualidade interno e externo dos vários setores. Fundamental para a minha formação como Técnica Superior em Análises Clínicas foi, desde o início, a total integração e atribuição de um papel ativo e autónomo na rotina diária de cada setor, mas sempre devidamente tutelada; estando envolvida em todo o processo analítico, desde a receção da amostra até à validação do resultado obtido.

## 2 - CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

“O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde, tendo responsabilidades de topo no diagnóstico e tratamento da doença oncológica na Região Centro, com uma população estimada de dois milhões e meio de habitantes<sup>1</sup>.”

Foi no Serviço de Patologia Clínica (SPC) desta grande Instituição que realizei o meu estágio curricular integrado no Mestrado de Análises Clínicas, para a obtenção do grau de Mestre. Este serviço encontra-se sob a coordenação do Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos. Os recursos humanos são compostos por pessoal competente e qualificado, incluindo Médicos Especialistas Clínicos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Técnicos e Administrativos e Assistentes Operacionais e Auxiliares.

No SPC do IPOCFG realiza-se o estudo dos parâmetros analíticos solicitados pelos diferentes serviços clínicos do hospital. Caso não se efetue um determinado parâmetro no SPC, procede-se ao envio adequado da amostra para outra Instituição, como por exemplo o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). As análises de rotina e de urgência são asseguradas nos dias úteis das 8 às 17 horas, aos Sábados das 9 às 17 horas, aos Domingos das 9 às 13 horas e nos Feriados das 8 às 16 horas. Nos dias úteis após as 17 horas, de modo a assegurar análises de urgência, fica um Técnico de Diagnóstico e Terapêutica em regime de presença física até as 23 horas e um Médico do serviço em regime de chamada até as 8 horas do dia seguinte. Nos restantes dias, fora do horário de funcionamento fica apenas um Médico do serviço em regime de chamada.

O serviço fica localizado no Piso 0 do Edifício da Oncologia Médica e Laboratórios, é constituído por 4 setores fisicamente separados: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia; e por várias áreas comuns: secretaria, sala de espera, sala de preparação do material de colheitas, sala de colheitas, sala de esterilização e lavagem de material, sala de arrumos, gabinete médico, gabinete da direção do serviço e sala polivalente. Esta última funciona essencialmente como sala de refeições e de apresentação de sessões clínicas.

Não posso deixar de mencionar que as colheitas de sangue são da exclusiva responsabilidade dos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica do SPC, tanto na sala de colheitas do laboratório como nas enfermarias. Nos doentes em regime de internamento também pode ser necessária a colheita de outro tipo de produtos biológicos. Neste caso, as

colheitas são realizadas pelo médico assistente, pelo enfermeiro ou pelo próprio doente e transportados até ao serviço pelos Assistentes Operacionais e Auxiliares. Tendo tudo isto em conta, o Serviço de Patologia Clínica possui uma média de 300 amostras diárias. O registo informático dos pedidos de análises é feito na secretaria, onde é atribuído a cada utente um número interno do serviço. Após a colheita ou receção dos produtos, estes são distribuídos o mais rapidamente possível pelos respetivos setores. Cada setor encontra-se equipado com os mais diversos recursos humanos e tecnológicos.

## 2.1 - SETOR DE HEMATOLOGIA

O Setor de Hematologia está sob a coordenação da Dr.<sup>a</sup> Isabel Joana Benedito Ferreira Lopes Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos. A equipa de profissionais do setor é constituída por 2 Médicos, 1 Técnico Superior de Saúde e 3 Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica.

Neste setor são realizadas diversas análises na área da Hematologia com recurso a diferentes equipamentos (Tabela 1). Além disso, também pode ser efetuada a pesquisa de *Plasmodium* spp. através da observação microscópica de esfregaços de sangue periférico e de gota espessa, corados pelo método de Giemsa. No setor de Hematologia podem ser analisadas as seguintes amostras: sangue total, plasma, aspirados de medula óssea, urina e líquidos orgânicos.

Tabela 1 - Equipamentos disponíveis no setor de Hematologia.

<b>Equipamento e fornecedor</b>	<b>Testes executados</b>
LH750 Analyzer da Beckman Coulter® (2 equipamentos)	Realização de hemogramas, contagem diferencial de leucócitos e contagem de reticulócitos.
TEST 1 <sub>BCL</sub> da Alifax® (2 equipamentos)	Determinação da Velocidade de Sedimentação Globular.
ACL TOP® CTS <sub>500</sub> da Instrumentation Laboratory (2 equipamentos)	Estudos da coagulação.
Cytomics™ FC 500 e TQ Prep™ Workstation da Beckman Coulter®	Estudo de imunofenotipagem por citometria de fluxo.
GeneXpert® da Instrumentation Laboratory	Estudo genético por sistema integrado de reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real.
Aerospray 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge da WESCOR®	Coloração de esfregaços de sangue periférico e de aspirados de medula óssea.

Outros equipamentos disponíveis: 2 centrífugas, 1 vortéx, 1 agitador, 1 microscópio ótico e 2 frigoríficos.



## 2.2 - SETOR DE MICROBIOLOGIA

O Setor de Microbiologia está sob a coordenação da Dr.<sup>a</sup> Paula Cristina Justino Gama, Assistente Hospitalar, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos. A equipa de profissionais do setor é constituída por 1 Médico, 1 Técnico Superior de Saúde e 3 Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica.

Aqui, é efetuado o estudo bioquímico da urina e o estudo microbiológico de diferentes tipos de amostras, nomeadamente: sangue, urina, fezes, expetoração, exsudados, líquido cefalorraquídeo, biópsias gástricas, cateteres vasculares e fâneros. O estudo bioquímico da urina abrange a sumária de urina e a observação do sedimento urinário que, por motivos logísticos do SPC, é feito no setor de Microbiologia. Neste setor existem alguns equipamentos automáticos e semi-automáticos que permitem agilizar e facilitar o trabalho do quotidiano (Tabela 2).

Tabela 2 - Equipamentos disponíveis no setor de Microbiologia.

<b>Equipamento e fornecedor</b>	<b>Testes executados</b>
<i>BD Bactec™ 9050 Blood Culture System</i>	Incubação e monitorização do crescimento de microrganismos em hemoculturas.
<i>ATB Expression® da bioMérieux™</i>	Leitura de antibiogramas.
<i>Vitek®2 Compact 15 da bioMérieux™</i>	Identificação de microrganismos e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.
<i>Cobas u 411 da Roche® Diagnostics</i>	Análise sumária de urina.
<i>GeneXpert® da Instrumentation Laboratory</i>	Pesquisa da toxina de <i>Clostridium difficile</i> por PCR em tempo real.
<i>Câmara de fluxo de ar laminar da Forma Scientific, Modelo I 169, Classe II tipo 2B</i>	Manuseamento de amostras.

Outros equipamentos disponíveis: 1 centrífuga, 1 vortéx, 2 densitómetros, 3 microscópios óticos, 3 estufas com temperatura regulada (25°C, 37°C e 42°C), 1 balança de precisão e 2 frigoríficos.

## 2.3 - SETOR DE QUÍMICA CLÍNICA

O Setor de Química Clínica está sob a coordenação do Dr. Luís do Espírito Santo Nina, Assistente Hospitalar Graduado, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos. A equipa de profissionais do setor é constituída por 1 Médico, 1 Técnico Superior de Saúde e 3 Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica.

Neste setor é realizada a quantificação de uma grande variedade de parâmetros bioquímicos em amostras de soro, sangue total, sangue arterial, urina ou líquidos orgânicos; por técnicas automatizadas, semi-automatizadas e/ou manuais (Tabela 3).

Exemplo de alguns parâmetros aqui determinados são o colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicerídeos (metabolismo dos lípidos); glucose e hemoglobina glicada (metabolismo dos hidratos de carbono); creatinina, ureia, sódio e potássio (avaliação da função renal e equilíbrio hidro-eletrolítico); pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> e lactatos (avaliação do equilíbrio ácido-base); AST, ALT, GGT, ALP, LDH, bilirrubina total, bilirrubina direta, amilase e lipase (avaliação da função hepato-biliar e pancreática); entre outros.

Tabela 3 - Equipamentos disponíveis no setor de Química Clínica.

<b>Equipamento e fornecedor</b>	<b>Testes executados</b>
<i>Cobas® 6000 Analyser Series HITACHI</i> (autoanalisador com 2 módulos c501 em cadeia) e <i>Cobas® c311 da Roche® Diagnostics</i> (autoanalisador de apoio)	Avaliação de vários parâmetros bioquímicos.
<i>Reflotron® Plus da Roche® Diagnostics</i> (analisador de química seca)	Utilizado apenas para confirmação de resultados obtidos no <i>Cobas® 6000 Analyser Series HITACHI</i> ou <i>Cobas® c311 da Roche® Diagnostics</i> .
<i>Rapidlab® 1265 da Siemens™</i>	Gasometria.
<i>ABL 800 FLEX da Radiometer® Copenhagen</i> (2 equipamentos)	Quantificação do cálcio ionizado e gasometria.
<i>RapidChem™ 744 da Bayer®</i>	Ionograma, utilizado apenas para confirmação de resultados.
<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</i>	Ensaio espectrofotométricos (técnicas manuais).

Outros equipamentos disponíveis: 2 centrífugas, 1 vortéx, 1 agitador, 1 banho térmico e 3 frigoríficos.

## 2.4 - SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA

O Setor de Imunologia e Hormonologia está sob a coordenação do Dr. Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha, Técnico Superior de Saúde, Especialista do Ramo de Laboratório. A equipa de profissionais do setor é constituída por 4 Técnicos Superiores de Saúde e 2 Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica.

A maioria das amostras analisadas neste setor consistem em soro, para a determinação de hormonas, marcadores tumorais, marcadores de inflamação e infeção, marcadores da lesão do miocárdio, fármacos e pesquisa de autoanticorpos. Além disso, também podem ser realizadas análises em amostras de plasma (ACTH, metanefrinas e renina), urina 24h (cortisol, iodo, ácido vanilmandélico, ácido 5-hidroxiindolacético, metanefrinas, proteína de Bence-Jones) e saliva (cortisol).

Neste setor também se realiza o estudo eletroforético de proteínas, a imunofixação de proteínas séricas e urinárias, assim como técnicas manuais com recurso a radioisótopos (exemplo: testosterona livre, 17-hidroxiprogesterona, aldosterona, cromogranina A e metanefrinas plasmáticas) e cromatografia em colunas de troca iónica (exemplo: ácido vanilmandélico e ácido 5-hidroxiindolacético). De todos os setores do SPC, o setor de Imunologia e Hormonologia é um dos mais automatizados (Tabela 4).

Tabela 4 - Equipamentos disponíveis no setor de Imunologia e Hormonologia.

<b>Equipamento e fornecedor</b>	<b>Testes executados</b>
<i>Immolute® 2000 XPI da Siemens™</i>	Imunoensaios de quimioluminescência (CLIA).
<i>ADVIA® Centaur™ da Siemens™</i>	Imunoensaios de quimioluminescência (CLIA).
<i>Liaison® da DiaSorin™</i>	Imunoensaios de quimioluminescência (CLIA).
<i>Cobas e601 Analyser® da Roche® Diagnostics</i>	Imunoensaios de eletroquimioluminescência (ECLIA).
<i>Kryptor® da B·R·A·H·M·S™</i>	Imunoensaios de fluorescência por <i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission</i> (TRACE).
<i>Viva-E Syva Onboard® da Siemens™</i>	Imunoensaios por <i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i> (EMIT).
<i>UniCAP® da Phadia</i>	Imunoensaios de fluorescência enzimática (FEIA).
<i>BN ProSpec® da Siemens™</i>	Imunoensaios por nefelometria.
<i>Hydrasys® da Sebia®</i>	Ensaio eletroforético (proteínas séricas e hemoglobina) e de imunofixação (proteínas séricas e urinárias) em gel de agarose.
<i>Scanner EPSON® e software Phoresis</i>	Quantificação das bandas obtidas por eletroforese.

Tabela 4 (cont.) - Equipamentos disponíveis no setor de Imunologia e Hormonologia.

LKB Wallac 1272 CliniGamma Counter	Técnicas manuais com recurso a radioisótopos (RIA e IRMA).
DPC Milenia™ Kinetic Analyzer	Imunoensaios de ELISA.

Outros equipamentos disponíveis: 1 microscópio de fluorescência, 1 centrífuga refrigerada, 1 ultracentrífuga, 1 *hotte*, 1 medidor de pH, 1 balança eletrónica, 1 máquina de gelo, 1 banho térmico, 2 arcas (-70°C e -20°C) e 4 frigoríficos.

### 3 - CONTROLO DE QUALIDADE

Dada a importância dos exames laboratoriais na decisão clínica, o Laboratório tem de garantir que os resultados analíticos dos utentes correspondem a valores fidedignos que traduzem, de facto, as condições fisiopatológicas que se pretendem avaliar. Para além disso, é cada vez maior a automatização a nível laboratorial, o que obriga a um programa de controlo apertado. É aqui que entra o controlo de qualidade, um processo estatístico utilizado para monitorizar e avaliar os métodos analíticos através de ensaios com produtos de controlo de qualidade.

O controlo de qualidade interno e o controlo de qualidade externo são ferramentas essenciais e regularmente utilizadas em todos os setores do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

#### 3.1 - CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

O controlo de qualidade interno permite avaliar a precisão dos métodos utilizados. Nos setores de Hematologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia realizam-se diariamente ensaios de controlo de qualidade interno recorrendo a amostras comerciais, para assegurar que os parâmetros analíticos se encontram dentro dos valores de referência definidos. Estes ensaios são efetuados no início do dia de trabalho, isto é, antes do processamento das amostras dos utentes, permitindo sempre que necessário aplicar medidas corretivas atempadamente. A aceitação dos controlos depende da análise cuidada das cartas de controlo de *Levey-Jennings* com base nas regras de *Westgard*. Considera-se que o método está sob controlo quando os valores obtidos se distribuem aleatoriamente em torno da linha média central, dentro dos limites de confiança ( $\pm 2$  desvios padrão). O controlo de qualidade interno também pode ser repetido ao longo do dia de trabalho e sempre que se revele necessário, como por exemplo no caso da mudança de lote de um reagente.

No setor de Microbiologia, é realizado diariamente o controlo da temperatura dos frigoríficos e estufas. O controlo de esterilidade da solução salina, dos corantes e dos meios de cultura é feito semanalmente, quando há mudança de lotes e sempre que surjam intercorrências que o justifiquem. Por fim, é realizado mensalmente o controlo do equipamento automático *Vitek®2 Compact 15* da *bioMérieux™* através da utilização de estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*), cuja identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos são previamente conhecidos.

### 3.2 - CONTROLO DE QUALIDADE EXTERNO

O principal objetivo do controlo de qualidade externo é avaliar a exatidão dos métodos em relação ao(s) laboratório(s) de referência e comparar o desempenho dos métodos utilizados no nosso laboratório com os utilizados noutros laboratórios. Para isso, o grupo de laboratórios inscritos no programa de avaliação externa da qualidade analisa a mesma amostra de controlo de qualidade e os resultados obtidos são tratados estatisticamente por uma entidade externa e independente.

Os setores de Hematologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia do SPC participam em dois programas de avaliação externa da qualidade, o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e o *Randox International Quality Assessement Scheme, External Quality Assessement (RIQAS EQA)* da RANDOX Laboratories. Porém, no setor de Hematologia para a citometria de fluxo é utilizado o *United Kingdom National External Quality Assessement Service (NEQAS)*. Cada controlo externo tem uma programação anual, que pode variar para os diferentes parâmetros efetuados.

O setor de Microbiologia também participa num programa de avaliação externa da qualidade nacional e internacional. Para os ensaios de parasitologia (3 ensaios anuais) é aplicado o programa nacional do INSA, enquanto que para os ensaios de bacteriologia geral e micologia (4 ensaios anuais) é aplicado o programa internacional da *External Quality Assessement Programmes, Lab Quality SFS Certified Quality System, Finland*.

## 4 - SETOR DE MICROBIOLOGIA

Em Análises Clínicas, o laboratório de Microbiologia Clínica é sem dúvida insubstituível, uma vez que, é neste, que se faz o diagnóstico de doenças infecciosas e a determinação da suscetibilidade do(s) respetivo(s) agente(s) patogénico(s) aos antimicrobianos. Na Tabela 5 referem-se os diversos produtos biológicos e respetivos exames habitualmente requisitados no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

Tabela 5 - Tipo de produto analisado e respetivo exame efetuado.

<b>Produto</b>	<b>Exame bacteriológico</b>	<b>Exame micológico</b>	<b>Exame parasitológico</b>
Sangue	X	X	
Urina	X	X	
Fezes	X		X
Expetoração	X	X	
Exsudado vaginal	X	X	X
Líquido Cefalorraquídeo (LCR)	X	X	
Biópsias gástricas	X		
Cateter vascular	X	X	
Fâneros		X	

A partir do momento em que há uma suspeita, por parte da equipa médica, de que o doente possui um quadro clínico de doença infecciosa, existe uma certa ordem de procedimentos que devem ser executados. Em primeiro lugar, é colhida uma amostra representativa do local de infeção que, posteriormente, deve ser devidamente identificada e transportada ao laboratório, o mais rápido possível, de modo a impedir a morte do(s) microrganismo(s) patogénico(s) ou o desenvolvimento da flora comensal. Já no laboratório, é realizado um exame direto da amostra, que inclui uma análise desta a nível macroscópico e microscópico, sendo observadas lâminas coradas pelo método de Gram e/ou por Kinyoun (dependendo do pedido efetuado pelo médico). De seguida, efetua-se o exame cultural semeando a amostra nos meios de cultura considerados mais adequados ao crescimento microbiológico. Após a obtenção de uma cultura pura, procede-se então à identificação definitiva dos microrganismos e determinação da sua suscetibilidade/resistência aos antimicrobianos. Por fim, o resultado é comunicado ao clínico de modo a que o tratamento mais apropriado seja iniciado ou ajustado.

## 4.1 - COLHEITA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

A seleção do local anatómico da colheita, o próprio ato da colheita e o transporte do produto biológico até ao laboratório são dos procedimentos mais críticos e importantes do estudo microbiológico. Para haver um diagnóstico e tratamento correto de uma doença infecciosa, a amostra colhida deve ter boa qualidade e a viabilidade dos microrganismos patogénicos não deve ser comprometida. Além disso, é fundamental que o técnico microbiologista seja capaz de rejeitar amostras de má qualidade<sup>2,3</sup>.

O produto deve ser recolhido, sempre que possível, durante a fase aguda da infeção e previamente à administração dos agentes antimicrobianos. Também deve ser feita em condições de assepsia, com material adequado esterilizado e evitando ao máximo a contaminação do produto com a flora colonizadora do local. Cada amostra deve estar devidamente identificada com o nome do doente, número do processo e o local da colheita. Caso se suspeite que a infeção está a ser provocada por um organismo fastidioso (exemplo: *Neisseria gonorrhoeae*, bactérias anaeróbias) ou que não seja possível efetuar o processamento dentro de um certo período de tempo, deve colocar-se o produto biológico num meio de transporte adequado<sup>2,3</sup>.

Geralmente as colheitas são realizadas por um profissional de saúde, de modo a recolher-se uma amostra de boa qualidade e sem causar danos ao doente. No entanto, a colheita de fezes, urina e expectoração pode ser efetuada pelo próprio doente, se este estiver em condições para isso. Neste caso, cabe aos profissionais de saúde fornecer de forma simples, clara e pormenorizada todas as informações necessárias sobre a colheita do produto biológico<sup>2</sup>.

É essencial que o transporte da amostra até ao laboratório de Microbiologia seja tão rápido quanto possível (idealmente até um máximo de 2h), tal como o seu respetivo processamento, o que acontece de facto no IPOCFG, uma vez que as amostras são processadas assim que chegam ao laboratório.

## 4.2 - EXAME DIRETO

O exame direto macroscópico do produto biológico é o primeiro procedimento da fase analítica. Esta análise pode ser bastante vantajosa, uma vez que permite avaliar várias características da amostra como: a presença de sangue ou muco, o odor, o volume, a cor, a turvação, a consistência e a existência de estruturas invulgares.

O exame direto microscópico pode ser um exame a fresco ou após coloração. No exame direto microscópico a fresco o produto é observado microscopicamente tal e qual como é recebido (sem corante ou contrastante). Assim sendo, é possível observar a



morfologia dos microrganismos e em alguns casos a quantidade de células presentes (leucócitos, eritrócitos e células epiteliais). Este exame permite-nos ainda determinar se os organismos em estudo possuem mobilidade flagelar, uma vez que quando é observada a preparação estes ainda se encontram vivos.

#### 4.2.1 - COLORAÇÕES E CONTRASTANTES

Através do exame direto microscópico após coloração, tanto o microbiologista como o médico, conseguem obter informações valiosas e céleres sobre o organismo que está a causar infeção. O uso de corantes e contrastantes tem como principal vantagem o aumento do contraste de algumas estruturas celulares, como por exemplo da parede celular. Na prática este exame pode ajudar a avaliar a qualidade da amostra colhida, dar uma identificação presuntiva do agente patogénico, orientar a observação macroscópica das colónias em cultura e determinar se são ou não precisos testes complementares<sup>2</sup>.

##### Coloração de Gram

Esta é considerada a coloração mais importante e mais utilizada nos laboratórios de Microbiologia. A coloração de Gram é diferencial, logo permite repartir a grande maioria das bactérias em dois grupos, consoante o corante que retém: as que coram de azul/roxo são Gram-positivo e as que coram de rosa/vermelho são Gram-negativo. As diferenças na composição da parede celular bacteriana são o fator responsável pela diferente reação à coloração de Gram. Existem certas bactérias que são Gram-variável, como por exemplo o *Clostridium* spp., o *Fusobacterium* spp. e a *Gardnerella* spp.. Mas, também existem microrganismos que simplesmente não coram com este tipo de coloração, como acontece quando eles são exclusivamente intracelulares (ex.: *Chlamydia trachomatis*), quando possuem diferentes componentes na parede celular (ex.: *Mycobacterium* spp.) ou quando não possuem parede celular (ex.: *Mycoplasma* spp.)<sup>2,4</sup>.

Além disso, a coloração de Gram também permite fazer uma distinção morfológica das bactérias (cocos ou bacilos) e ajuda-nos a visualizar a presença de leveduras, leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, inclusões intracelulares e outras estruturas presentes na amostra<sup>4</sup>.

##### Coloração de Kinyoun

É uma das técnicas utilizadas na visualização de bacilos ácido-álcool resistentes (B.A.A.R.), como é o caso do *Mycobacterium* spp.. Este microrganismo possui uma parede celular peculiar, rica em lípidos, sendo o mais abundante o ácido micólico, razão pela qual a

parede é pouco permeável às soluções utilizadas na coloração de Gram e resistente à descoloração com ácido-álcool. A coloração de Kinyoun é muito idêntica à coloração de Ziehl-Neelson, contudo a primeira é mais vantajosa porque dispensa a utilização de calor e, conseqüentemente, evita a emissão de vapores tóxicos. Se na amostra biológica houver B.A.A.R. estes coram de vermelho, enquanto as outras bactérias (não ácido-álcool resistentes) e o fundo coram de azul-esverdeado. Também se utiliza esta coloração para observação de parasitas fecais, como o *Cryptosporidium* spp., a *Cystoisospora belli* e a *Cyclospora cayetanensis*<sup>2,4</sup>.

#### Coloração de Giemsa

Este tipo de coloração é tipicamente utilizada no laboratório de Hematologia e serve para corar esfregaços de sangue periférico, utilizando um corante ácido, a eosina, e um corante básico, a tiazina, que se ligam aos componentes celulares de carga oposta. Mas a coloração de Giemsa também é utilizada no laboratório de Microbiologia, uma vez que pode ajudar na observação de vários microrganismos, como por exemplo: trofozoítos, esquizontes e gametócitos de *Plasmodium* spp. (em sangue periférico ou gota espessa), trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* (em exsudados vaginais) e trofozoítos de *Giardia lamblia* (em amostras de fezes)<sup>2</sup>.

#### Azul de algodão lactofenol

Este é um meio de montagem que auxilia na identificação microscópica de fungos patogênicos após cultura. O azul de algodão lactofenol adere às estruturas que possuam quitina, como é o caso da parede celular fúngica, conferindo-lhes uma cor azul<sup>2</sup>.

### **4.3 - MEIOS DE CULTURA**

Os meios de cultura podem ser líquidos ou sólidos e podem ser classificados em<sup>2</sup>:

- Não seletivos – possibilitam o crescimento de grande parte dos microrganismos;
- Seletivos – contêm pequenas quantidades de antibióticos ou de outros inibidores que impedem o desenvolvimento de algumas bactérias ou fungos;
- Diferenciais – possuem na sua composição um ou mais componentes, como por exemplo diferentes açúcares, que permitem a identificação presuntiva das bactérias. Os meios diferenciais tanto podem ser seletivos como não seletivos;
- Enriquecidos – possuem fatores que favorecem o crescimento de determinado tipo de organismos.

Na Tabela 6 referem-se os diversos meios de cultura utilizados habitualmente no laboratório de Microbiologia do IPOCFG, e em anexo encontra-se uma descrição mais detalhada dos mesmos<sup>2</sup>.

Tabela 6 - Meios de cultura utilizados no laboratório de Microbiologia do IPOCFG.

Meio de Cultura	Classificação	Objetivo
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Meio não seletivo e enriquecido	Promover o crescimento de uma grande variedade de bactérias, tanto aeróbias como anaeróbias.
Gelose Chocolate <i>PolyViteX</i> (PVX)	Meio não seletivo e enriquecido	Meio que se destina a auxiliar o desenvolvimento de microrganismos fastidiosos, como o <i>Haemophilus</i> spp., a <i>Neisseria</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Gelose <i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i> (CLED)	Meio não seletivo e diferencial	Meio que se utiliza sobretudo para a cultura de amostras de urina.
Gelose Columbia ANC + 5% de sangue carneiro (CNA)	Meio seletivo e diferencial	Cultura de bactérias Gram-positivo, uma vez que a adição dos antibióticos inibe o crescimento da flora Gram-negativo.
Gelose <i>Schaedler</i> + 5% de sangue de carneiro (SCS)	Meio enriquecido	Favorecer o isolamento e cultura de bactérias anaeróbias, obrigatórias e facultativas.
<i>Hektoen Enteric Agar</i> (Hektoen)	Meio seletivo e diferencial	Meio utilizado na deteção de microrganismos patogénicos presentes em amostras fecais, nomeadamente no isolamento da <i>Salmonella</i> spp. e da <i>Shigella</i> spp..
Gelose <i>Campyloset</i> (CAM)	Meio seletivo e enriquecido	Meio destinado à pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de amostras fecais.
Meio <i>Löwenstein-Jensen</i> (LJ-T)	Meio não seletivo e enriquecido	Promover o crescimento de <i>Mycobacterium</i> spp..
Frascos de hemocultura Bactec™	Meio não seletivo	Permite o crescimento de bactérias (aeróbias e anaeróbias) e leveduras presentes no sangue.
Caldo <i>Schaedler</i> + Vitamina K3 (Schaedler)	Caldo de enriquecimento	Caldo recomendado para promover o crescimento de bactérias anaeróbias.
Caldo Selenito	Caldo de enriquecimento seletivo	Selecionar o crescimento da <i>Salmonella</i> spp. e da <i>Shigella</i> (só algumas espécies), até às 12h após a inoculação do caldo com as fezes.
Caldo <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	Caldo de enriquecimento	Promover o crescimento de microrganismos não-fastidiosos e fastidiosos.

Tabela 6 (cont.) - Meios de cultura utilizados no laboratório de Microbiologia do IPOCFG.

Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC)	Meio seletivo	Meio que se destina à cultura de fungos leveduriformes ou filamentosos.
<i>Mycoline</i>	Meio 1: não seletivo e Meio 2: seletivo	Meio 1: cultura de fungos leveduriformes, dermatófitos e outro tipo de fungos. Meio 2: promove, essencialmente, o crescimento de fungos dermatófitos.
Gelose <i>Mueller Hinton E</i> (MHE) - E para Etest® & EUCAST®	Meio não seletivo	Testar a sensibilidade ou resistência de bactérias não-fastidiosas aos antimicrobianos.
Gelose <i>Mueller Hinton</i> + 5% sangue de cavalo + 20mg/L $\beta$ -NAD (MHF)	Meio não seletivo e enriquecido	Testar a sensibilidade ou resistência de bactérias fastidiosas aos antimicrobianos.

#### 4.4 - CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Após a inoculação dos meios de cultura, deve-se determinar quais as condições de incubação (temperatura, atmosfera e humidade) mais apropriadas para a amostra em questão.

A temperatura ótima de crescimento para a grande maioria dos microrganismos patogénicos ronda os 35-37°C, com tempos de incubação entre as 18 e as 24 horas. Contudo, existem bactérias que são capazes de se desenvolver a temperaturas mais baixas ou mais elevadas, como por exemplo o *Campylobacter* spp. cuja temperatura de incubação é de 42°C<sup>2,5</sup>.

No caso dos fungos, a velocidade de crescimento depende do tipo de fungo que está a causar a infeção, ou seja, se for uma levedura demora cerca de 24 a 48 horas a crescer, enquanto se for um fungo filamentosos pode demorar entre sete dias (crescimento rápido) a um mês (crescimento lento). A temperatura ótima de crescimento varia entre os 25 e os 27°C, contudo pode haver a necessidade de utilizar temperaturas de incubação de 37°C, se houver suspeita de uma infeção sanguínea<sup>2</sup>.

Consoante a atmosfera em que as bactérias se desenvolvem, estas são classificadas em aeróbias (crescem na presença de oxigénio), anaeróbias (crescem na ausência de oxigénio), capnofílicas (necessitam de maiores concentrações de dióxido de carbono) ou microaerofílicas (necessitam de menores concentrações de oxigénio). No IPOCFG, todas estas atmosferas (exceto a aeróbia) são conseguidas através da utilização de um saco hermético e transparente, onde é colocado o respetivo gerador de atmosfera e a(s) placa(s)

inoculada(s). Posteriormente, o conjunto é colocado na estufa a 37° ou a 42°C. Cada gerador oferece as condições ideais de desenvolvimento para estas bactérias, porque aprovencionam a percentagem correta dos gases que elas necessitam.

É fulcral que durante o tempo de incubação os meios de cultura se mantenham hidratados. Além disso, a estufa deve possuir uma atmosfera com uma humidade de pelo menos 70%, de modo a permitir o crescimento microbiológico<sup>5</sup>.

#### **4.5 - PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO**

Quando a amostra chega ao laboratório de Microbiologia tem que vir acompanhada da respetiva requisição, pelo que o técnico deve sempre confirmar se os dados que estão na etiqueta da amostra são concordantes com os que estão na requisição. Além do nome do doente, número do processo e local anatómico da colheita, a requisição deve incluir idade, sexo, morada, data e hora da colheita, serviço, cama do doente, nome do médico requisitante e informação clínica pertinente.

Antes do processamento, a amostra é identificada com um código de barras do setor e é preenchida a folha de trabalho. Posteriormente, esta é processada consoante a(s) análise(s) solicitada(s) pelo médico.

##### **4.5.1 - SANGUE**

Em regra o sangue é um produto biológico estéril, que quando é invadido por um microrganismo é uma ameaça constante para todos os órgãos do corpo humano. As infeções da corrente sanguínea são graves e podem dar origem a septicémias. A bacteriémia ou fungémia corresponde, respetivamente, à presença de bactérias ou fungos na corrente sanguínea. Esta pode ser transitória, intermitente ou contínua. Por outro lado, a septicémia é considerada uma infeção sanguínea que resulta não só da presença do microrganismo patogénico no sangue, como da sua multiplicação intensa<sup>4</sup>. Tanto as bacteriémias como as septicémias são particularmente alarmantes em doentes imunocomprometidos, uma vez que podem ser fatais. Tratando-se o IPOCFG de um hospital oncológico, o pedido de hemocultura é bastante frequente.

Os microrganismos que causam mais frequentemente este tipo de infeções são: bacilos Gram negativo, como a *Escherichia coli*, a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Klebsiella pneumoniae* e o *Proteus* spp.; cocos Gram positivo, como o *Staphylococcus aureus*, os *Staphylococcus* coagulase negativa e o *Enterococcus* spp.; e leveduras, como a *Candida albicans*<sup>4</sup>.

### Colheita

Antes da punção venosa, recomenda-se desinfetar o local da colheita com álcool a 70% e posteriormente com outro antisséptico/desinfetante (como por exemplo a iodopovidona), de modo a impedir a contaminação da amostra com os agentes colonizadores da pele. Além disso, também se deve desinfetar, com álcool, a tampa do frasco da hemocultura. A colheita de sangue é feita por punção venosa de uma veia periférica, de dois locais diferentes, ou seja, devem ser inoculados pelo menos dois frascos de hemocultura, cada um com aproximadamente 8 a 10mL de amostra (se for uma criança o volume recomendado é de 1 a 5mL)<sup>5</sup>. No IPOCFG, é utilizado um sistema de cultura de sangue automático, o Bactec™, onde é feita a incubação a 37°C com agitação contínua e leitura periódica dos frascos de hemocultura.

### Processamento da amostra

Cada frasco de hemocultura possui um sensor químico que permite alertar o analista para a presença de uma amostra positiva. A detecção do crescimento do agente patogénico é efetuada automaticamente, a cada 10 minutos, através de medições da intensidade de fluorescência, que correspondem à quantidade de CO<sub>2</sub> gerada pelo microrganismo<sup>2</sup>.

Para cada amostra positiva deve ser feito, a partir do frasco de hemocultura, um esfregaço para corar pelo método de Gram e uma subcultura em meio COS, incubando a 37°C por um período de 24 a 48 horas e em atmosfera de aerobiose ou anaerobiose. A observação microscópica do esfregaço poderá ditar a necessidade de se realizarem repicagens em outros meios de cultura mais apropriados. Após a análise macroscópica das colónias, deve-se proceder à sua identificação definitiva e determinação da suscetibilidade antimicrobiana.

### Interpretação dos resultados

Cabe ao microbiologista clínico determinar o significado clínico do microrganismo isolado, uma vez que o equipamento apenas deteta se há crescimento ou não. Sendo o sangue um líquido estéril, a presença de mais de duas espécies bacterianas diferentes na cultura pode indicar contaminação da amostra, pelo que deve ser feita nova colheita.

No fim do período de incubação, sete dias para as bactérias e catorze dias para os fungos, se não houver sinais de crescimento microbiológico, as hemoculturas são dadas como negativas.

#### 4.5.2 - URINA

As infecções bacterianas mais frequentes no Homem, quer sejam adquiridas na comunidade ou a nível nosocomial, são as infecções do trato urinário. Estas podem ser classificadas em infecções do trato urinário inferior (uretite ou cistite) ou superior (ureterite ou pielonefrite). Numa pessoa saudável a urina é um líquido estéril até à sua passagem pela uretra, pois esta possui uma flora comensal. As infecções urinárias são adquiridas mais frequentemente por indivíduos do sexo feminino, devido ao pequeno tamanho da uretra e à proximidade desta com a região perianal<sup>4</sup>. A via de acesso mais comum dos microrganismos ao trato urinário é a via ascendente, em que bactérias colonizadoras do intestino conseguem alcançar a bexiga através da uretra<sup>2,5</sup>.

A bactéria mais associada às infecções urinárias não complicadas na população em geral é, sem dúvida, a *Escherichia coli*. Contudo, outras bactérias como a *Klebsiella* spp., os *Staphylococcus saprophyticus* e os *Enterococcus* spp. também são frequentemente isoladas. Por outro lado, em indivíduos hospitalizados cateterizados, imunodeprimidos ou com patologia do trato urinário este tipo de infecções é, por norma, mais complicada e envolve agentes etiológicos como a *Escherichia coli*, o *Proteus* spp., a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Staphylococcus* spp., o *Enterococcus* spp. e a *Candida* spp.<sup>4</sup>.

#### Colheita

A colheita de urina pode ser efetuada de diferentes modos, sendo que a mais utilizada em ambulatório é a colheita do jato médio, porque a amostra é colhida pelo próprio indivíduo. Em primeiro lugar deve-se começar por lavar as mãos e limpar toda a zona genital externa, com uma toalha limpa embebida em sabão azul e água. Posteriormente, deve-se recolher para um recipiente estéril de boca larga o jato médio da primeira urina da manhã, descartando a primeira e última porção de urina. Normalmente, uma amostra de urina de 10mL é suficiente para o processamento laboratorial<sup>2</sup>. Durante a micção é essencial evitar a contaminação da amostra com a flora comensal da região uretral, vaginal e perianal, porque depois essa flora vai crescer nos meios de cultura e dificultar a interpretação dos resultados, podendo mesmo induzir o microbiologista em erro<sup>4,5</sup>. Existem casos em que a colheita de urina tem de ser feita por pessoal especializado, isto é, por um médico ou enfermeiro, como explicitado na Tabela 7<sup>2,4</sup>.

Tabela 7 - Outros tipos de colheita de amostras de urina.

Tipo de doente	Colheita	Notas
Crianças de fralda	Saco coletor: Limpar a zona genital da criança com compressas embebidas em água destilada estéril e sabão. Colocar o saco autocolante estéril e retirá-lo assim que o bebé urinar.	Se o bebé demorar mais de 30 minutos para urinar, o saco deve ser substituído.
Cateterizados (catéter de <i>Foley</i> )	Punção de catéter urinário: Após clampagem da algália, desinfetar o orifício do catéter com algodão embebido em álcool. Com agulha e seringa colher cerca de 5 a 10mL de urina.	Não recolher urina do saco da algália.
Crianças, doentes hospitalizados ou doentes em que as uroculturas são de difícil interpretação	Punção suprapúbica: Fazer a assepsia da pele do local de colheita e com ajuda da agulha e seringa puncionar através da parede abdominal quando o doente tiver a bexiga cheia.	Único tipo de colheita em que não existe o risco de contaminação da amostra com a flora comensal da uretra e que serve para cultura de anaeróbios.

#### Processamento da amostra

A urocultura engloba o exame cultural para a quantificação dos microrganismos presentes na urina e a análise sumária de urina, que por sua vez inclui a avaliação de vários parâmetros bioquímicos e a observação do sedimento urinário.

Exame cultural - Usando uma ansa esterilizada e calibrada de 10µL semeia-se, em dois planos cruzados, um meio CLED e um meio CNA. Também se pode semear um meio SGC, caso o médico peça um exame micológico ou sejam observadas leveduras no sedimento urinário. Incuba-se em atmosfera aeróbia a 37°C, por um período de 18 a 24 horas. Contudo, se a colheita for feita por punção suprapúbica colocam-se as placas em atmosfera de anaerobiose. Quando são isolados até três microrganismos patogénicos que se julgam clinicamente relevantes, deve proceder-se à sua identificação e determinação do antibiograma.

Análise sumária de urina – Em primeiro lugar, deve-se colocar 10mL de amostra num tubo e, sem centrifugar a urina, mergulhar uma tira Combur<sup>10</sup>Test<sup>®</sup> da Roche<sup>®</sup> Diagnostics e colocar no equipamento Cobas u 411 da Roche<sup>®</sup> Diagnostics. Esta tira possui vários reagentes impregnados, o que nos permite avaliar de forma semi-quantitativa alguns parâmetros bioquímicos como: densidade, valor de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e eritrócitos. Em segundo lugar, os 10mL de urina



devem ser centrifugados durante 10 minutos a 1500 rpm. De seguida, o sobrenadante é descartado e colocada uma gota do sedimento urinário entre lâmina e lamela. A observação microscópica do sedimento é feita com a objetiva de 40x e contando no mínimo 10 campos. Posteriormente, calcula-se a média dos elementos observados nesses 10 campos. Os componentes que podem ser observados a partir do sedimento urinário incluem eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, células do trato urinário superior, cilindros, cristais, bactérias, parasitas e fungos.

#### Interpretação dos resultados

Consideram-se positivas as amostras de urina de jato médio com crescimento igual ou superior a  $10^5$  unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL)<sup>6</sup>. Como os meios são inoculados com uma ansa calibrada de 10 $\mu$ L, a amostra é valorizada quando existe uma contagem superior a mil colónias na placa CLED. Contudo, a interpretação das uroculturas depende não só da contagem de colónias mas também da observação microscópica do sedimento urinário, do método de colheita e do número de espécies isoladas nas placas de cultura. Isto significa que se houver o crescimento de mais do que três microrganismos patogénicos distintos, existe uma elevada probabilidade de o produto biológico estar contaminado (pedir nova colheita). No caso das colheitas por punção suprapúbica, as amostras são consideradas positivas quando há o isolamento de um ou dois microrganismos, independentemente da contagem de colónias (exceto quando há contaminação da amostra com flora comensal da pele)<sup>2</sup>. A partir da observação macroscópica das colónias em meio CLED e CNA podemos obter uma informação valiosa sobre que tipo de bactéria é que está a causar a infeção urinária, uma vez que as bactérias Gram-negativo e Gram-positivo são capazes de crescer no meio CLED mas apenas as Gram-positivo crescem no meio CNA.

#### 4.5.3 - FEZES

As infeções gastrointestinais apresentam uma elevada incidência em todo o mundo e podem ocorrer em qualquer faixa etária, atingindo sobretudo idosos e crianças com menos de cinco anos de idade. A diarreia é definida como um “*transtorno do movimento intestinal que é caracterizada por um aumento do teor de água, volume e frequência das dejeções*”<sup>2</sup>, sendo que podem ser vários os agentes patogénicos (bactérias, parasitas ou vírus) envolvidos. Na maioria das vezes estes microrganismos são transmitidos pela via fecal-oral, isto é, através da ingestão de bebidas ou produtos alimentares contaminados<sup>2,4</sup>.

Quando existe um pedido de coprocultura, por rotina, é feita a pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp.. Contudo, no SPC do IPOCFG, quando

solicitado explicitamente pelo médico ainda é possível fazer-se a deteção das toxinas do *Clostridium difficile* e a pesquisa de parasitas.

### Colheita

Geralmente as colheitas de fezes são feitas para um recipiente de boca larga esterilizado, descartável e estanque. Para o exame bacteriológico é necessário recolher três amostras de dias sucessivos (sem as misturar) e deve-se evitar o uso de conservantes e a refrigeração. Por outro lado, para o exame parasitológico são precisas três amostras de dias alternados num período máximo de 10 dias (sem as misturar), uma vez que os parasitas ou as estruturas parasitárias são excretadas nas fezes de forma intermitente. Neste caso, se necessário, pode-se usar a formalina como conservante (numa proporção de 3:1) e refrigerar as amostras a 4°C. Para a pesquisa de toxina de *Clostridium difficile* a colheita de uma amostra é suficiente, todavia esta só deve ser processada se as fezes forem de facto diarreicas<sup>2,4</sup>.

### Processamento da amostra

As amostras de fezes assim que chegam ao laboratório devem ser rapidamente inoculadas em meio *Hektoen*, que é um meio de cultura sólido seletivo para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.. Incuba-se a 37°C, por um período de 18 a 24 horas e em atmosfera de aerobiose. Normalmente, estas bactérias encontram-se em quantidades muito reduzidas na amostra, daí que também seja necessário semear um caldo de enriquecimento, como o Selenito, para promover o seu crescimento. Note-se que por volta das 12 horas de incubação, o caldo de Selenito deve ser repicado para um meio *Hektoen*.

Um outro meio sólido que deve ser inoculado é o CAM, um meio apropriado para o isolamento de *Campylobacter* spp.. Este é incubado a 42°C, durante 72 horas e em atmosfera microaerófila. Além do exame cultural também é realizado um teste simples e rápido designado de *RIDA® QUICK Campylobacter*, um teste imunocromatográfico que nos permite fazer um rastreio de todas as amostras de fezes para *Campylobacter* (*jejuni* e *coli*), através da deteção de antígenos específicos.

### Interpretação dos resultados

Findo o tempo de incubação das placas, as colónias características de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. no meio *Hektoen*, são detetadas pela presença de colónias de cor verde ou azul-esverdeada pois estas bactérias não fermentam a lactose presente no meio. Adicionalmente, as colónias de *Salmonella* spp. possuem um centro negro devido à produção

de sulfeto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S). Procedem-se à identificação das colónias suspeitas através de uma carta de identificação de bacilos Gram-negativo e efetuam-se testes de suscetibilidade. Caso a amostra seja positiva, os isolados são enviados para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) para identificação serológica<sup>5</sup>.

A membrana do teste *RIDA*<sup>®</sup>*QUICK Campylobacter* possui uma zona impregnada com anticorpos específicos, que quando reagem com os antígenos do *Campylobacter* spp. presentes na amostra formam uma banda vermelho-violeta (teste positivo). Aquando da observação das placas de CAM deve-se procurar colónias sugestivas de *Campylobacter* spp., ou seja, procurar por colónias cinzentas, pequenas, planas ou em “chama de vela” e não hemolíticas. De modo a certificarmos-nos que estamos na presença destas bactérias, deve efetuar-se uma preparação a fresco e uma coloração de Gram das colónias suspeitas. O *Campylobacter* spp. é um bacilo Gram-negativo móvel, que se pode apresentar de várias formas: espiral, curvo ou em “asa de gaivota”. Ainda se pode realizar o teste da oxidase e o teste da catalase, pois trata-se de um bacilo oxidase e catalase positivo<sup>2</sup>.

#### Pesquisa de *Clostridium difficile*

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*), bacilo anaeróbio Gram-positivo, é o principal responsável pela diarreia e colite pseudomembranosa de origem medicamentosa em indivíduos hospitalizados. A administração de antibióticos leva à redução e alteração da flora comensal do intestino, que por sua vez permite a proliferação desta bactéria (infecção oportunista). A patogénese do *C. difficile* está relacionada com a sua capacidade de formar esporos e de libertar a toxina A (enterotoxina) e a toxina B (citotoxina)<sup>2,7</sup>. Existe ainda uma terceira toxina, a toxina binária, que é produzida por uma nova estirpe epidémica e hipervirulenta de *C. difficile* (BI/NAPI/027). Esta estirpe também é capaz de gerar cerca de 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B, pelo que está associada a um aumento da morbidade e mortalidade dos infetados<sup>7</sup>.

No IPOCFG utiliza-se um algoritmo a dois passos para o diagnóstico de infeção por *C. difficile*. Primeiro é preciso demonstrar a presença da bactéria nas amostras fecais, através da pesquisa da glutamato desidrogenase (GDH) por um teste imunocromatográfico. Este teste é bastante rápido e económico, mas não nos permite distinguir as estirpes de *C. difficile* produtoras de toxinas (patogénicas) das não produtoras (não patogénicas). Assim sendo, nas amostras positivas para a GDH, também é feita a pesquisa das toxinas por PCR em tempo real no equipamento *GeneXpert*<sup>®</sup> da *Instrumentation Laboratory*. Apesar de ser um teste rápido, sensível e específico, apresenta custos elevados. Quando um doente é diagnosticado com uma infeção por *C. difficile*, este deve ser imediatamente isolado dos outros doentes.

### Exame parasitológico de fezes

Os parasitas também podem ser os agentes etiológicos das infecções gastrointestinais. A pesquisa de quistos, trofozoítos, ovos ou larvas compreende o exame macroscópico e microscópico (direto e após concentração) das fezes.

Deve-se começar pelo exame macroscópico do produto, que abrange a observação e descrição da cor e consistência (fezes diarreicas, pastosas ou moldadas). Também é possível ver se há ou não a presença de sangue e muco (típico da *Entamoeba histolytica*), de gordura (típico da *Giardia lamblia*) ou de estruturas parasitárias macroscópicas (seres adultos, larvas ou proglótis de *Taenia* spp.). Para o exame microscópico a fresco são feitas 2 preparações de fezes entre lâmina e lamela: uma diretamente do produto com soro fisiológico ou lugol, e a outra a partir do sedimento obtido após concentração. As larvas, ovos e quistos presentes na amostra podem ser separados dos detritos fecais e concentrados num pequeno volume pelo método de Ritchie (método bifásico). A observação microscópica implica a análise total e cuidada das preparações, primeiro com a objetiva de 10x e depois com a objetiva de 40x<sup>3</sup>.

Os parasitas são identificados maioritariamente com base na sua morfologia, isto é com base no tamanho, forma, cor, refringência, características nucleares, inclusões citoplasmáticas e na presença de outras estruturas e características. Para uma identificação correta também é necessário saber diferenciar as estruturas parasitárias de artefactos. Estes podem ser células sanguíneas, células epiteliais, cristais de *Charcot-Leyden*, corante precipitado, elementos vegetais, grãos de pólen e pêlos<sup>3</sup>.

### 4.5.4 - EXPETORAÇÃO

O trato respiratório encontra-se dividido em duas partes: trato respiratório inferior (traqueia, brônquios e pulmões), que não possui flora endógena; e trato respiratório superior (fossas nasais, faringe e laringe), que possui uma flora bacteriana muito rica e diversificada, formada normalmente por *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* e *parainfluenzae*, *Bacteroides* spp., *Neisseria meningitidis* e Enterobactérias. Existem vários fatores que podem provocar um desequilíbrio desta flora, conseqüentemente, isso leva a que um dos agentes colonizadores do trato respiratório superior se possa tornar num agente patogénico (patogéneos oportunistas). Por outro lado, existem bactérias que não fazem parte da flora endógena e que causam infecções respiratórias (verdadeiros patogéneos), como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis* e da *Legionella pneumophila*<sup>2,5</sup>.

A expetoração é um produto oriundo do trato respiratório inferior, que é frequentemente utilizado no diagnóstico da tuberculose pulmonar e da pneumonia bacteriana.

### Colheita

A expetoração pode ser obtida pelo próprio doente, desde que este seja devidamente instruído a colher uma amostra de qualidade, ou seja, sem saliva. Antes da colheita, proceder à lavagem da cavidade oral e gargarejar com água abundante. Recolher, de preferência, a expetoração da manhã após tosse profunda, para um recipiente de boca larga esterilizado e com tampa de rosca. Se o doente for incapaz de obter um volume de amostra razoável, entre 5 e 10mL, pode induzir-se a expetoração através da inalação de aerossóis de uma solução salina. Este tipo de colheita já requer a ajuda de profissionais de saúde. Para pesquisa de fungos ou de *Mycobacterium* spp. recolhem-se amostras de expetoração de três dias consecutivos, de modo a aumentarmos a probabilidade de detetar estes organismos<sup>2</sup>.

### Processamento da amostra

Começa-se por escolher uma zona purulenta da expetoração para preparar a lâmina que vai ser corada pelo método de Gram. A análise microscópica da coloração de Gram serve para avaliar a qualidade da amostra colhida (objetiva de 10x) e observar a predominância e o tipo de bactérias presentes (objetiva de 40x)<sup>2,5</sup>. Amostras com menos de 25 leucócitos e mais de 10 células epiteliais por campo, não devem ser processadas porque se considera que houve contaminação das mesmas com flora endógena do trato respiratório superior<sup>8,9</sup>. Se a amostra for aceitável pelos critérios de Murray e Washington (Tabela 8), utiliza-se uma ansa estéril para recolher um pedaço purulento da expetoração e semeiam-se três meios de cultura: COS, PVX e SGC. Incubam-se as culturas a 37°C, durante 18 a 24 horas numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A valorização das colónias em cultura é feita consoante o predomínio observado no Gram. Após isolamento das colónias com significado clínico efetua-se a identificação e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

O primeiro passo para a deteção de bacilos ácido-álcool resistentes (B.A.A.R.) é a preparação de um esfregaço sem tratamento prévio para corar pelo método de Kinyoun. Todas as amostras de expetorações devem ser sujeitas a um tratamento especial antes de serem semeadas, uma vez que podem conter flora bacteriana contaminante da orofaringe. Este tratamento inclui a homogeneização/liquefação e descontaminação com NaOH a 3% (que possui atividade mucolítica, proteolítica e antibacteriana) e concentração do sedimento por centrifugação a 3000 rpm (para juntar o maior número de micobactérias no menor

volume possível)<sup>4</sup>. O sedimento obtido é utilizado para preparar um esfregaço para corar pelo método de Kinyoun (Kinyoun após homogeneização) e para semear 3 ou 4 gotas em meio LJ-T. Incuba-se em atmosfera de aerobiose a 37°C durante 6 semanas, com observação semanal.

#### Interpretação de resultados

O exame macroscópico da expetoração é bastante útil porque nos pode dar indicação do agente etiológico que está a causar a infeção. Esta análise inclui o registo da consistência, do odor e da cor. Por exemplo, se a amostra tiver um aspeto hialino e claro provavelmente serão os vírus os responsáveis pela infeção mas se esta tiver um aspeto purulento serão as bactérias; um odor fétido pode sugerir uma infeção por bactérias anaeróbias; e, uma expetoração purulenta de cor esbranquiçada, amarelada ou esverdeada pode indicar, respetivamente, a presença de Enterobactérias, de *Staphylococcus* spp. ou de *Pseudomonas* spp. nas vias aéreas.

O produto biológico mais difícil de recolher corretamente é a expetoração, porque esta, ao passar pelo trato respiratório superior, fica facilmente contaminada com a flora endógena do local. Assim sendo, recomenda-se que antes de inocular os meios de cultura todas as amostras sofram um processo de seleção segundo os critérios de Murray e Washington (Tabela 8) que, avaliam através de uma coloração de Gram, a proporção de leucócitos e de células epiteliais por campo<sup>2,5,9</sup>.

Tabela 8 - Sistema de classificação de qualidade das amostras, segundo os critérios de Murray e Washington.

	<b>Células epiteliais por campo (objetiva 10x)</b>	<b>Leucócitos por campo (objetiva 10x)</b>	<b>Considerações</b>
<b>Grupo 1</b>	25	10	Amostra rejeitada
<b>Grupo 2</b>	25	10-25	
<b>Grupo 3</b>	25	25	
<b>Grupo 4</b>	10-25	25	Amostra processada
<b>Grupo 5</b>	< 10	25	

As amostras dos grupos 4 e 5 como apresentam boa qualidade (expetorações bem colhidas), são aceites e processadas normalmente (Figura 1A). Por outro lado, as amostras dos grupos 1, 2 e 3 estão contaminadas com a flora endógena da orofaringe (não são representativas do local de infeção), pelo que devem ser rejeitadas e pedida nova colheita

(Figura 1B). Este sistema de classificação não é aplicado, por exemplo quando solicitada a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* na expetoração<sup>5</sup>.

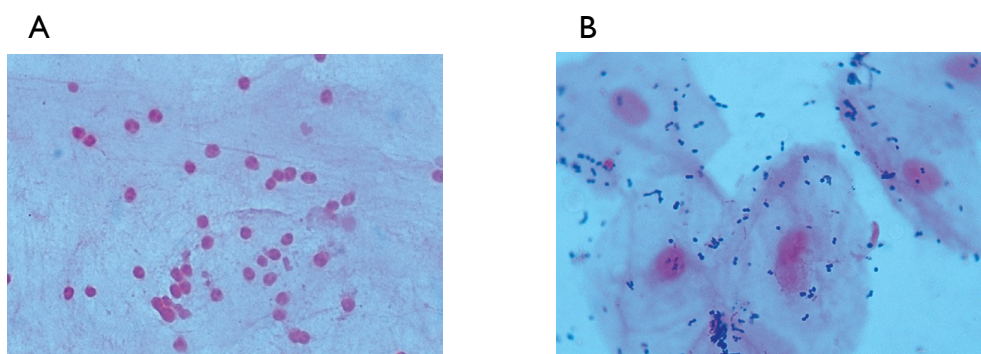


Figura 1 - Comparação de duas amostras de expetoração coradas pelo método de Gram. A – Amostra aceitável: contém um número elevado de leucócitos e ausência de células epiteliais; B – Amostra não aceitável: contém raros leucócitos e um número elevado de células epiteliais.

A flora endógena do trato respiratório superior pode crescer nos meios de cultura, o que vai dificultar a interpretação dos resultados e o isolamento do agente etiológico. Por isso é que deve ser feita uma análise crítica do conjunto de dados obtidos com a coloração de Gram e o exame cultural<sup>2</sup>.

A quantidade de B.A.A.R. existentes na amostra pode ser relativamente baixa logo deve ser feita uma análise microscópica minuciosa, com a objetiva de 100x, dos 2 esfregaços corados pelo método de Kinyoun (Kinyoun antes e após homogeneização). Esta análise é bastante útil, porque a observação de B.A.A.R. numa amostra de expetoração permite fazer o diagnóstico presuntivo de tuberculose pulmonar por *Mycobacterium* spp.. O relatório a enviar ao médico deve fornecer vários dados, como o método de coloração utilizada, o número de B.A.A.R observados por campo e a respetiva interpretação do resultado, como apresentado na Tabela 9<sup>4</sup>.

Tabela 9 - Interpretação de resultados de um esfregaço corado pelo método de Kinyoun.

<b>Número de B.A.A.R observados por campo (objetiva 100x)</b>	<b>Interpretação do resultado</b>
0	Não foram observados B.A.A.R
1-2/300 campos	Duvidoso, pedir nova colheita
1-9/100 campos	+1 (raros)
1-9/10 campos	+2 (alguns)
1-9/campo	+3 (frequentes)
> 9/campo	+4 (numerosos)

Qualquer resultado positivo deve ser imediatamente comunicado ao médico, uma vez que a tuberculose pulmonar é considerada um problema de saúde pública que implica o isolamento do doente. Os esfregaços só podem ser dados como negativos após observação de, pelo menos, 300 campos. No entanto, um exame microscópico negativo não implica que o indivíduo não esteja infetado, pelo que é sempre necessário confirmar o resultado através de um exame cultural. As colónias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio LJ-T são brancas ou amarelas com aspeto rugoso e geralmente assemelham-se a uma “couve-flor”. Se não houver crescimento de colónias típicas até às 6 semanas de incubação, o exame cultural é considerado negativo<sup>2</sup>. Todas as culturas positivas são expedidas para o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para se proceder à respetiva identificação e eventual antibiograma.

#### 4.5.5 - EXSUDADO VAGINAL

A mulher em idade fértil possui uma flora endógena vaginal abundante, constituída sobretudo por *Lactobacillus* spp.. Estes bacilos Gram-positivo, delgados e compridos são capazes de decompor o glicogénio em ácido láctico, o que torna o pH vaginal relativamente baixo (entre 3,8 e 4,5). São estes valores de pH que impedem a proliferação de outros microrganismos da flora, que, quando em maior quantidade, provocam infeção<sup>2</sup>.

De um modo geral, as infeções do aparelho genital feminino são adquiridas por via sexual (via exógena), mas também podem estar relacionadas com a substituição da flora vaginal normal por outros microrganismos comensais presentes em menor quantidade (via endógena)<sup>2</sup>. No IPOCFG, a análise do exsudado vaginal normalmente implica a pesquisa dos microrganismos mais frequentemente associados às vaginoses bacterianas (*Gardenerella vaginalis*, entre outros) e às vaginites (*Trichomonas vaginalis* e *Candida* spp.).

##### Colheita

Após remoção do muco, o exsudado vaginal é obtido através da introdução de uma zaragatoa até ao fundo da vagina. Ao fim de 30 segundos a rodar suavemente pelas paredes da vagina, remover a zaragatoa e coloca-la em meio de transporte Stuart<sup>4</sup>.

##### Processamento laboratorial

São sempre preparadas duas lâminas, uma destinada ao exame direto a fresco e outra para corar pelo método de Gram. Ainda pode ser feita uma terceira lâmina para corar pelo método de Giemsa. O exsudado é semeado em três meios diferentes: COS, PVX e SGC;



que são incubados a 37°C durante 48 horas com observação, às 24 e 48 horas. É importante referir que o meio SGC só é dado como negativo ao fim de uma semana de incubação.

Os microrganismos patogénicos são valorizados de acordo com a informação clínica fornecida, a observação microscópica das lâminas e o predomínio desenvolvido nas culturas. Se necessário, realizar a identificação e os testes de suscetibilidade em colónias clinicamente relevantes.

### Interpretação dos resultados

O diagnóstico laboratorial de uma vaginose bacteriana é bastante simples, pois basta observar microscopicamente o esfregaço corado pelo método de Gram para nos certificarmos que houve uma alteração no equilíbrio da flora endógena normal e para pesquisa das “clue cells” (Figura 2). Estas são células epiteliais que se encontram cobertas por *clusters* de cocobacilos Gram-variável. Na presença de uma vaginose, 20% das células epiteliais observadas são “clue cells”. O aumento do pH vaginal é detetado através da utilização de tiras indicadoras pH e da adição de uma solução de KOH a 10% ao produto biológico, que vai exacerbar o seu odor a “peixe podre” (teste de *Whiff*)<sup>2</sup>.

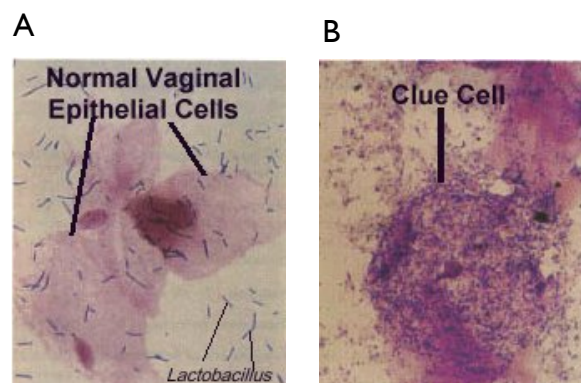


Figura 2 - Comparação entre uma célula epitelial normal e uma “clue cells”. A - Célula epitelial normal; B - “Clue cells”.

No caso da vaginite por *Trichomonas vaginalis*, é o exame direto a fresco do exsudado vaginal, diluído em solução salina a 0.9%, que permite a observação e identificação da *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado que possui uma mobilidade muito característica. Além disso, as *Trichomonas* spp. são microrganismos sensíveis que quando se encontram fora do seu ambiente natural morrem com facilidade, ficando imóveis e do tamanho de um leucócito. Pelo que quando se demora demasiado tempo até realizar o exame direto a fresco, também se deve corar um esfregaço do exsudado vaginal pelo método de Giemsa para que se consiga distinguir as *Trichomonas* spp. (coram de azul) dos leucócitos (coram de rosa)<sup>2</sup>.

A abordagem laboratorial de uma vaginite por *Candida* spp. inclui o exame direto a fresco e após coloração de Gram, cultura em meio SGC e identificação e antibiograma de colônias isoladas no equipamento Vitek® 2 da bioMérieux (apresentado na secção 4.6 – IDENTIFICAÇÃO E ANTIBIOGRAMA). As leveduras distinguem-se das bactérias por serem maiores, ovais e por poderem estar em gemulação; todas estas características podem ser observadas através do exame direto a fresco ou após coloração de Gram. Esta coloração também nos permite determinar quais os microrganismos da flora vaginal que se encontram em predominância, no caso de uma vaginite por *Candida* spp. são as leveduras e os bacilos Gram-positivo numa proporção de 1:1<sup>2</sup>. O agente etiológico da grande maioria das candidíases vaginais é a *Candida albicans*, que em meio SGC apresenta colônias brancas, lisas e brilhantes. O diagnóstico diferencial de vaginose e vaginites apresenta-se esquematizado na Tabela 10.

Tabela 10 - Diagnóstico diferencial de vaginose e vaginites.

	<b>Fisiológico</b>	<b>Vaginose bacteriana</b>	<b>Vaginite por Trichomonas</b>	<b>Vaginite por Candida</b>
<b>Odor</b>	“Suis generis”	Peixe podre	Fétido	Pão fresco
<b>Consistência</b>	Flocular	Homogéneo	Espumoso	Grumoso
<b>Cor</b>	Branco	Branco ou acinzentado	Branco, amarelo ou verde	Branco
<b>pH</b>	< 4.5	> 4.5	5.0 – 6.0	< 4.5
<b>Leucócitos</b>	-	-	+	+
<b>Células epiteliais</b>	Normais	“Clue cells”	Normais	Normais
<b>Microrganismos predominantes</b>	Bacilos Gram +	Cocobacilos Gram variável	Bacilos Gram + e parasitas	Bacilos Gram + e leveduras

#### 4.5.6 - LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

As infeções do Sistema Nervoso Central (SNC) são pouco frequentes mas de extrema importância clínica pois são consideradas uma emergência médica. Se não forem detetadas e tratadas atempadamente podem ser letais ou deixarem graves sequelas<sup>2,4</sup>.

Dentro das patologias do SNC, a meningite (inflamação das meninges) é a mais frequente. Sendo esta uma situação crítica, deve-se dar sempre prioridade ao transporte e processamento laboratorial da amostra de LCR para que a identificação e antibiograma do microrganismo patogénico sejam feitos o mais rapidamente possível. Os agentes etiológicos da meningite são sobretudo bactérias aeróbias (*Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*,

*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* e bacilos de Gram-negativo) ou fungos (*Cryptococcus neoformans*). Por outro lado, quando se trata de um abscesso cerebral as bactérias anaeróbias são dos agentes mais frequentemente isolados (*Fusobacterium* spp. e *Bacteroides* spp.)<sup>2</sup>.

### Colheita

A recolha deste produto biológico é da exclusiva responsabilidade do médico. O procedimento adequado consiste na desinfeção cuidadosa da pele do local de colheita, seguida de colheita do LCR, por punção lombar, diretamente para um contentor estéril, transparente e com encerramento hermético. Também devem ser obtidas amostras de sangue para hemocultura, de modo a corroborar a identificação do agente etiológico. Caso o indivíduo possua um abscesso cerebral, em vez do LCR, a amostra colhida deve ser um aspirado ou uma biópsia do tecido necrosado e inflamado, que por sua vez deve ser remetida para o laboratório em meio de transporte anaeróbio<sup>2,4,5</sup>.

### Processamento da amostra

Assim que o produto biológico chega ao laboratório deve ser preparada uma lâmina para corar pelo método de Gram. Após a observação microscópica da coloração de Gram é de extrema importância informar o médico de qual a morfologia bacteriana observada (diagnóstico presuntivo), para que este possa direcionar de imediato a terapêutica antimicrobiana<sup>2</sup>.

De seguida semeiam-se por inundação os três meios de cultura sólidos mais utilizados no quotidiano - COS, PVX e SGC - e inocula-se um meio de cultura líquido enriquecido – o caldo BHI. Passadas 24 horas de incubação, repica-se o caldo BHI para o meio COS. Todos os meios são colocados na estufa a 37°C, numa atmosfera com cerca de 5% de CO<sub>2</sub> até perfazer as 72 horas de incubação, mas as placas devem ser observadas todos os dias. Deve-se prosseguir com os testes de identificação e de suscetibilidade em colónias puras e isoladas.

Adicionalmente, no setor de Hematologia é feita uma contagem diferencial de células na câmara de Neubauer e no setor de Química Clínica é feita a quantificação das proteínas totais e da glucose, adicionando mais dados que aumentam a acuidade diagnóstica.

### Interpretação de resultados

Por norma, num indivíduo saudável o LCR é um fluido biológico estéril, transparente e translúcido. Logo, qualquer microrganismo observado no exame direto após coloração de Gram e isolado em cultura pura é considerado o possível agente causador da infeção. A presença de mais do que duas espécies bacterianas distintas no meio de cultura pode indicar contaminação da amostra.

#### 4.5.7 - BIÓPSIAS GÁSTRICAS

O *Helicobacter pylori* é das únicas bactérias que conseguem sobreviver ao pH ácido do estômago e crescer nas células gástricas, daí que este seja considerado o agente etiológico de gastrites no ser humano. Além disso, também se encontra associado a úlceras gástricas e duodenais, ao adenocarcinoma gástrico e ao linfoma tipo MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*). O *H. pylori* é um bacilo Gram-negativo curvo e flagelado, que necessita de uma atmosfera de microaerofília para crescer. Este possui outras características como catalase, oxidase e urease positivas, que auxiliam na sua identificação<sup>3</sup>.

### Colheita e Resultados

A colheita é realizada exclusivamente por um médico gastroenterologista. Esta é feita através de uma endoscopia digestiva alta, onde é introduzido um endoscópio até ao estômago do doente e, posteriormente, são biopsadas as mucosas do corpo e do antro gástricos. Cada biópsia é colocada num recipiente individual, que contém meio de transporte específico (Port-Pyl), e enviada de imediato ao INSA. Cerca de 2 semanas depois, o INSA envia ao IPOCFG um relatório em envelope fechado, onde é dado o resultado com a eventual identificação definitiva do microrganismo e o respetivo antibiograma.

#### 4.5.8 - CATETER VASCULAR

Em doentes oncológicos é crucial que haja um acesso permanente à corrente sanguínea para que possam ser administrados agentes quimioterapêuticos, anticoagulantes ou antimicrobianos. Esse acesso é garantido através da implantação de um cateter intravascular, central ou periférico. Apesar dos vários benefícios, também pode haver graves complicações associadas à inserção de um cateter como hemorragias, trombozes e infeções<sup>10</sup>.

As infeções da corrente sanguínea nos doentes imunocomprometidos podem ser potencialmente fatais, logo quando há uma forte suspeita de que o cateter é a possível fonte da infeção, este pode ser removido e enviado ao laboratório de Microbiologia<sup>10,11</sup>.

### Colheita

Após assepsia da entrada do cateter e da pele à sua volta, o cateter é removido na sua totalidade. A partir da ponta terminal, corta-se um segmento com cerca de 4 centímetros (crucial para a valorização do número de colónias) e coloca-se num recipiente seco. Simultaneamente, deve ser colhido sangue de uma veia periférica diferente daquela em que estava o cateter, para frasco de hemocultura<sup>5</sup>.

### Processamento laboratorial

Com uma pinça esterilizada retira-se o cateter do recipiente e faz-se rolar na superfície de um meio COS para, após incubação, contar o número de colónias segundo o método semi-quantitativo de Maki<sup>12</sup>. De seguida, coloca-se todo o segmento num meio líquido enriquecido, como o caldo Schaedler. Incubam-se ambos os meios a 37°C por um período de 18 a 24 horas. Terminado o tempo de incubação, repica-se o caldo Schaedler para o meio COS e incuba-se por mais 24 horas. Os frascos de hemocultura são processados de acordo com o que foi descrito anteriormente.

### Interpretação dos resultados

No meio COS onde se rolou diretamente o segmento terminal do cateter, o aparecimento de menos de 15 colónias sugere contaminação. Por outro lado, o aparecimento de 15 ou mais colónias com a mesma morfologia indica infeção na corrente sanguínea com origem no cateter<sup>12</sup>. A confirmação deste tipo de infeção requer o isolamento e a identificação do mesmo microrganismo, a partir da hemocultura e do cateter<sup>5,11</sup>.

Através da comparação dos 2 meios de COS é possível saber qual a face do cateter que se encontra colonizada. No meio onde se rolou o cateter, são isolados os microrganismos que se encontram na face externa do mesmo; no meio sólido para o qual se repicou umas gotas do caldo Schaedler, são isolados os microrganismos que se encontram na face externa e/ou interna do cateter.

### 4.5.9 - FÂNEROS

As micoses são infeções ligeiras ou graves provocadas por fungos leveduriformes (unicelulares) ou filamentosos (pluricelulares). Consoante o local do corpo afetado, as micoses podem ser classificadas em superficiais, cutâneas, subcutâneas ou sistémicas. Cabelos quebradiços, descamação do couro cabeludo ou da pele, lesões com ou sem

resposta inflamatória, lesões do tipo *ringworm* ou unhas distróficas e anormalmente pigmentadas são alguns dos sinais das micoses cutâneas<sup>2,4</sup>.

Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados dos tecidos queratinosos (cabelo, pele e unhas) são os dermatófitos; um grupo de fungos ao qual pertencem os gêneros: *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp<sup>2,4</sup>.

### Colheita

A colheita é feita pelo médico requisitante ou por um profissional de saúde do SPC. No caso dos cabelos começa-se por detetar os cabelos infetados com o auxílio de uma lâmpada de Wood e utiliza-se uma pinça esterilizada para colher cerca de 12 cabelos fluorescentes (certos dermatófitos fluorescem sob luz ultravioleta). A colheita de pele ou unhas requer a desinfecção prévia do local com álcool a 70%. Com um bisturi esterilizado, procede-se à raspagem das escamas de pele que se encontram na periferia da lesão. As amostras de unha obtêm-se através do corte ou da raspagem da zona visivelmente infetada e caso haja perioníquia recolhe-se o pus com zaragatoa. O transporte deste tipo de amostras é feito em caixas de Petri estéreis ou entre duas lâminas de vidro envolvidas em papel<sup>2,4</sup>.

### Processamento da amostra

Primeiro é realizado o exame direto a fresco. Para isso basta juntar a uma parte da amostra uma gota de KOH a 10%. A solução de KOH é capaz de destruir tecido queratinizado, o que permite a observação das estruturas fúngicas presentes. De seguida, deve-se semear a restante amostra na superfície de ambos os meios de cultura contidos no tubo Mycoline. Incuba-se na estufa a 25°C entre 2 dias a 1 mês, com observação regular (tempo de incubação varia com a velocidade de crescimento do fungo). Se forem observadas leveduras no exame direto deve semear-se a amostra diretamente num meio SCG. Quando há crescimento de colónias de fungos filamentosos, deve-se repicar uma porção periférica da colónia para um meio SCG (para que se possa visualizar melhor a sua morfologia) e preparar uma lâmina segundo a técnica da fita-cola com azul de algodão lactofenol.

### Interpretação de resultados

Se o exame direto a fresco for positivo, transmitir o resultado ao médico, para que o doente inicie de imediato a terapêutica antifúngica. Um exame direto positivo com exame cultural negativo deve ser valorizado caso o doente já se encontre sob terapia antifúngica<sup>2</sup>.

Em indivíduos imunocomprometidos a maioria dos fungos isolados devem ser valorizados, porque quando o sistema imunológico é afetado os fungos saprófitas ou

comensais podem tornar-se oportunistas e comportarem-se como patogénicos<sup>2</sup>. Como a grande maioria dos doentes do IPOCFG são indivíduos imunocomprometidos, o Mycoline é sempre o primeiro meio a ser semeado, uma vez que este meio permite-nos avaliar qual o tipo de fungo que está a causar a infeção. Se crescerem colónias no meio com e sem actidiona o agente etiológico é muito provavelmente um fungo dermatófitos; por outro lado se só crescerem colónias no meio sem actidiona o agente etiológico é muito provavelmente um fungo saprófita ou leveduriforme.

A identificação dos fungos é feita com base nas características morfológicas macroscópicas (cor frente e verso, tamanho, aspeto/textura, forma e presença de um pigmento difusível ou não) e microscópicas (observação das estruturas fúngicas) da colónia. No caso dos fungos leveduriformes também é necessário recorrer a outros testes - prova da blastese, pesquisa da cápsula com tinta-da-china, prova da urease e/ou utilização de uma carta de identificação de leveduras – para se fazer a sua identificação<sup>4</sup>.

As leveduras, no meio SCG, crescem em cerca de 24 a 48 horas e apresentam colónias pequenas, normalmente de cor branca ou bege (exceção *Rhodotorula* spp. que é cor salmão), com várias texturas: lisas ou rugosas, brilhantes ou baças e mucoides ou secas. Na análise microscópica pode-se observar elementos unicelulares, redondos ou ovais, em gemulação. Se a levedura apresenta pseudohifas, é sugestivo do género *Candida* spp..

Por outro lado, é fácil reconhecer quando um fungo filamentososo está a crescer em meio SCG, uma vez que as suas colónias são relativamente grandes, de crescimento lento e possuem uma textura algodoada, lanosa, granulosa ou pulverosa devido à formação do micélio aéreo. A identificação dos fungos dermatófitos é feita sobretudo através da observação da morfologia microscópica; estes possuem hifas hialinas septadas e podem produzir macroconídios, microconídios ou ambos. Os detalhes das estruturas reprodutoras (tamanho, forma, septação, características da parede e tipo de organização dos conídios), a morfologia das hifas (hifas em raqueta, em mastro de veado, em espiral e/ou pectinadas) e a presença de outras estruturas (clamidósporos terminais e/ou clamidósporos intercalares) podem ajudar na identificação da espécie.

## 4.6 - IDENTIFICAÇÃO E ANTIBIOGRAMAS

### 4.6.1 - PROVAS CLÁSSICAS

Existem várias provas clássicas, no entanto, as realizadas no IPOCFG são fundamentalmente testes bioquímicos que se baseiam na pesquisa de uma enzima específica em colônias puras e isoladas. Estas provas são muitas vezes utilizadas na identificação presuntiva do género e/ou da espécie. Além disso, podem ajudar a decidir o passo seguinte, i.e., o que fazer para se chegar à identificação definitiva, como por exemplo a seleção da carta de identificação mais adequada<sup>2,4</sup>.

#### Teste da catalase

A catalase é a enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigénio ( $O_2$ ), com consequente libertação do oxigénio (efervescência). A presença desta enzima nas bactérias é testada a partir de uma colónia em cultura, que é transferida com uma ansa de plástico para uma lâmina de vidro e à qual é aplicada uma ou duas gotas de uma solução de peróxido de hidrogénio a 3%. Se houver uma imediata efervescência no local da mistura, a catalase é considerada positiva. Este teste é bastante útil, porque dentro do grupo das bactérias Gram-positivo permite-nos distinguir os *Staphylococcus* spp. e os *Micrococcus* spp., que são catalase positiva, dos *Streptococcus* spp. e dos *Enterococcus*, que são catalase negativa. Podem ocorrer falsos positivos se a colónia em estudo for retirada de uma gelose que possua sangue, uma vez que os glóbulos vermelhos contêm catalase<sup>2,4</sup>.

#### Teste da oxidase

O citocromo-c oxidase é uma das enzimas pertencentes ao complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, e a sua função é promover a transferência dos eletrões para o oxigénio, reduzindo-o a água. Neste teste é utilizado um reagente, o tetrametil-p-fenilenodiamina, que atua como o aceitador final de eletrões (substituindo o  $O_2$ ). A pesquisa da citocromo-c oxidase é feita sob uma lâmina de vidro onde se coloca um disco impregnado com o reagente. Posteriormente, com uma ansa de plástico (nunca de metal) retira-se uma colónia da cultura e fricciona-se no disco, sendo que o teste deve ser lido até um máximo de 60 segundos. Se houver uma mudança de cor do disco para roxo significa que as bactérias possuem esta enzima (teste positivo). Se em vez de uma ansa de plástico for usada uma ansa de metal pode ocorrer um falso positivo, uma vez que ao aquecer a ansa de metal esta pode oxidar<sup>4</sup>. Esta prova é utilizada na diferenciação de bacilos Gram-negativo,



como é o caso das *Enterobacteriaceae* spp. e do *Acinetobacter* spp., que são oxidase negativa, e, das *Pseudomonas* spp. e do *Campylobacter* spp., que são oxidase positiva. Também contribui para a identificação do género *Neisseria*, que são cocos Gram-negativo e oxidase positiva<sup>2,4</sup>.

#### Teste da urease

A urease é a enzima que hidroliza a ureia em dióxido de carbono e amónia. O objetivo deste teste é determinar se o microrganismo em estudo tem atividade urease ou não. Assim sendo, num tubo que contenha um caldo com ureia e vermelho de fenol (indicador de pH) inocula-se uma colónia da cultura e incuba-se durante 4 horas e a 37°C. Se o organismo tiver esta enzima, a ureia é degradada e forma-se a amónia, que provoca um aumento do pH (alcalinização), com consequente alteração da cor do meio para rosa. O teste da urease permite fazer o rastreio de bactérias como o *Proteus* spp., a *Klebsiella* spp., a *Yersinia enterocolitica* e o *Helicobacter pylori*; e, de fungos como o *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp.<sup>2,4</sup>.

#### Teste da coagulase

Quando se tem uma forte suspeita de que estamos perante uma cultura de *Staphylococcus* spp. deve realizar-se o teste da coagulase, uma vez que este permite diferenciar as espécies produtoras de coagulase (*S. aureus*) das não produtoras (estafilococos coagulase-negativa, exemplo: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*). As estirpes de *S. aureus* podem produzir dois tipos desta enzima, a coagulase livre e a coagulase conjugada (“Clumping Factor”). No IPOCFG, habitualmente testa-se a coagulase livre. O teste é feito em tubo e consiste na mistura de plasma de coelho com as colónias bacterianas em estudo, incuba-se a 37°C e lê-se após 4 horas de incubação. Terminado esse período, se houver a produção de um coágulo o teste é considerado positivo<sup>2,4</sup>.

#### 4.6.2 - SISTEMA VITEK® 2 COMPACT 15

O equipamento Vitek® 2 da *bioMérieux* é uma mais-valia em qualquer laboratório de Microbiologia Clínica, pois é um sistema automatizado que nos proporciona identificações rápidas de microrganismos patogénicos (bactérias e leveduras) e realiza testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. O IPOCFG possui o sistema Vitek® 2 Compact 15, um equipamento mais compacto e menos dispendioso, que processa até 15 cartas em simultâneo. Estas cartas são constituídas por múltiplos micropoços de crescimento, que possuem no seu interior substratos bioquímicos (cartas de identificação) ou antibióticos em várias concentrações (cartas de antibiograma)<sup>2,13</sup>. As cartas de identificação e de

antibiograma disponíveis neste laboratório encontram-se em anexo na Tabela 11 e Tabela 12, respetivamente.

Na câmara de enchimento as cartas são inoculadas automaticamente por vácuo, com uma suspensão de bactérias ou de leveduras padronizada. De seguida, são transferidas para outra câmara onde é feita a selagem, incubação e leituras óticas periódicas, nomeadamente por espectrofotometria e turbidimetria, para monitorizar o crescimento microbiológico. O equipamento possui uma base de dados atualizada, que permite a identificação definitiva de várias espécies clinicamente relevantes, e o programa *Advanced Expert System™* (AES™), que através de uma análise algorítmica determina os valores das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI). Este programa também atribui a classificação de sensível, intermédio ou resistente segundo as regras da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e valida automaticamente o antibiograma<sup>2,13</sup>.

#### 4.6.3 - GALERIAS ATB™

As galerias ATB™ permitem a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana a *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.* e *Moraxella catarrhalis* (ATB™ Haemo) e a bactérias anaeróbias estritas (ATB™ ANA). Estas galerias são compostas por vários pares de cúpulas que contêm no seu interior uma seleção de antibióticos liofilizados em duas concentrações. Contudo, o primeiro par de cúpulas não tem nenhum antibiótico porque serve como controlo positivo do crescimento bacteriano. Cada cúpula é inoculada com uma suspensão bacteriana e a galeria incubada a 37°C por um período de 24 a 48 horas em atmosfera de aerobiose ou anaerobiose. Terminado o tempo de incubação, a galeria pode ser lida visualmente e/ou automaticamente no equipamento *ATB Expression®* da *bioMérieux*. A interpretação dos resultados é feita de forma qualitativa: se não houver crescimento em ambas as cúpulas do par, meio límpido, a bactéria é sensível ao antibiótico; se houver crescimento em ambas as cúpulas do par, meio turvo, a bactéria é resistente ao antibiótico; por fim, se houver crescimento apenas na cúpula de menor concentração considera-se que a bactéria possui suscetibilidade intermédia ao antibiótico<sup>14</sup>.

#### 4.6.4 - MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

Quando é necessário testar a suscetibilidade de uma bactéria a antibióticos que não fazem parte das cartas *Vitek®* ou das galerias ATB™, pode-se recorrer ao método manual de difusão em disco ou método de *Kirby-Bauer*. A partir de uma cultura pura é feita uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, que depois é inoculada em três planos sobre toda a superfície de uma gelose *Mueller-Hinton* (MHE ou

MHF). De seguida, são colocados os vários discos de papel de filtro impregnados com antibiótico de concentração conhecida, e incuba-se a placa a 37°C durante 16-20 horas. O antibiótico vai difundir na área em redor de cada disco e um halo de inibição pode torna-se visível, caso a estirpe seja sensível ao antibiótico utilizado. A medição do diâmetro de um halo perfeitamente limpo é que vai permitir classificar a bactéria como sensível, intermédia ou resistente em relação ao antibiótico em estudo. Consultando as tabelas de recomendações da EUCAST, é possível fazer corresponder um intervalo de diâmetros a uma CMI. É de notar que quanto maior for o diâmetro do halo de inibição menor será a CMI e vice-versa<sup>13,15</sup>.

## **5 - SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA - MARCADORES TUMORAIS**

No Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG, o setor de Imunologia e Hormonologia é imprescindível “*na excelência do bem cuidar o doente oncológico*”. Apesar de áreas tão distintas a Direção do Serviço entendeu juntá-las no mesmo espaço físico formando um único setor. Conseguiu-se desta forma otimizar equipamentos e recursos humanos, uma vez que os imunoensaios utilizados permitem quantificar diferentes parâmetros analíticos. Sendo o IPOCFG uma unidade hospitalar de oncologia, é perceptível que os marcadores tumorais sejam dos parâmetros analíticos mais requisitados pelos clínicos.

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas pelo mundo inteiro e não escolhe sexo, idade nem etnia. Ao aperceber-me que também afetava a minha família e pela sua relevância neste tipo de hospital, decidi abordar no presente relatório a utilidade clínica dos marcadores tumorais.

### **5.1- IMUNOENSAIOS EM IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA**

As técnicas de Imunoquímica, em particular os imunoensaios, possuem um papel cada vez mais relevante na área das Análises Clínicas. Os imunoensaios baseiam-se numa reação *in vitro* entre o antigénio e o anticorpo. Nestas técnicas, o elevado grau de especificidade e afinidade dos anticorpos para os antigénios tem levado ao desenvolvimento de uma enorme variedade de imunoensaios, que são utilizados na deteção e quantificação de antigénios (marcadores tumorais, hormonas, fármacos e proteínas plasmáticas) ou anticorpos (autoanticorpos e anticorpos produzidos contra agentes infecciosos), mesmo quando presentes em baixas concentrações no soro ou noutros fluídos biológicos<sup>16</sup>.

Na maioria dos casos, o método de deteção da formação do complexo antigénio-anticorpo é obtido através da utilização de um antigénio ou anticorpo marcado com um radioisótopo (RIA e IRMA) ou com um composto quimioluminescente (CLIA e ECLIA), fluorescente (TRACE e FEIA) ou enzimático (EMIT).

A reação entre o antigénio e o anticorpo pode ser do tipo competitivo (a) ou não competitivo (b), dependendo das características do antigénio que se pretende quantificar. O imunoensaio competitivo é mais utilizado quando o antigénio é uma molécula de baixo peso molecular e o não competitivo pelo contrário quando o antigénio é uma molécula de elevado peso molecular.

(a) Imunoensaio competitivo: o antígeno contido na amostra (em concentração desconhecida) e o antígeno análogo marcado (em concentração pré-estabelecida) competem pelos mesmos locais de ligação ao anticorpo, o qual se encontra imobilizado numa matriz sólida (Figura 3). A concentração de antígeno presente na amostra é inversamente proporcional ao sinal emitido. Desta maneira, quanto maior for a concentração de antígeno na amostra do doente, menor será a concentração de antígeno análogo marcado que se ligará ao anticorpo, e vice-versa<sup>16</sup>.

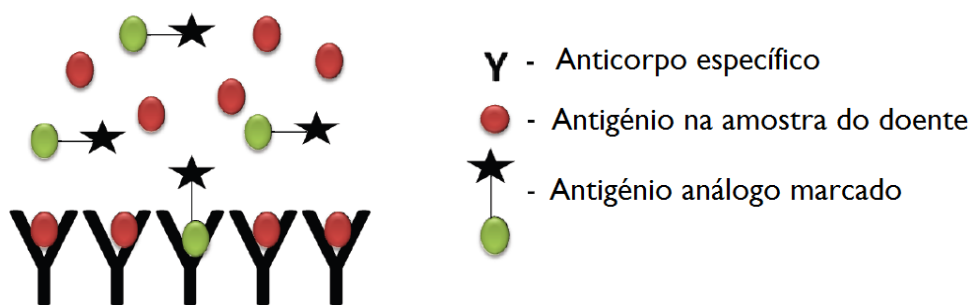
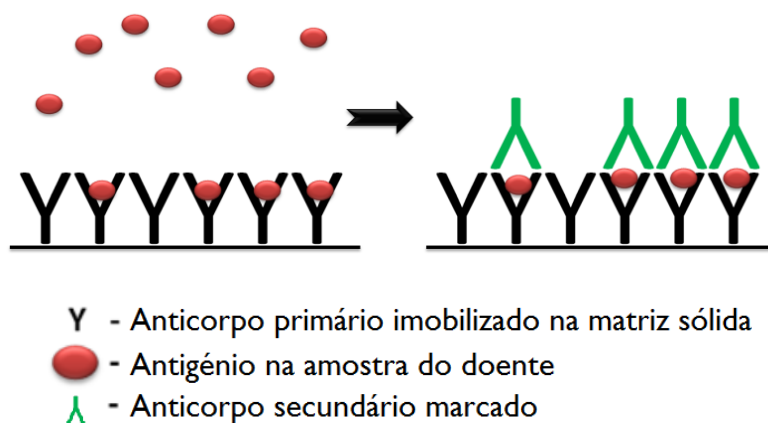


Figura 3 - Representação ilustrativa de um imunoensaio competitivo.

(b) Imunoensaio não competitivo ou imunoensaio do tipo “sandwich”: o antígeno contido na amostra (em concentração desconhecida) é capaz de se ligar através de epítopos diferentes ao anticorpo primário que se encontra imobilizado na matriz sólida e ao anticorpo secundário marcado (também designado de anticorpo conjugado). Assim sendo, é formado um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo conjugado (Figura 4). A concentração de antígeno na amostra é diretamente proporcional ao sinal emitido<sup>16</sup>.



- Y - Anticorpo primário imobilizado na matriz sólida
- - Antígeno na amostra do doente
- ∧ - Anticorpo secundário marcado

Figura 4 - Representação ilustrativa de um imunoensaio não competitivo ou do tipo “sandwich”.

Além disso, os imunoenaios também podem ser heterogêneos ou homogêneos, dependendo do método de detecção utilizado. Os imunoenaios heterogêneos incluem um passo de lavagem com tampão antes de o sinal ser medido, de modo a retirar todo o antígeno ou anticorpo marcado não ligado (exemplo: RIA, CLIA e ECLIA). Sem este passo de separação o sinal medido seria sempre o mesmo, independentemente da concentração do analito presente na amostra. Por outro lado, os imunoenaios homogêneos não requerem os passos de separação e lavagem para a medição do sinal (exemplo: TRACE e EMIT). A grande vantagem em relação aos imunoenaios heterogêneos é o menor número de passos necessários, o que resulta em maior simplicidade e rapidez<sup>16</sup>.

De seguida, descrevo os vários imunoenaios utilizados no setor de Imunologia e Hormonologia pois como Técnica Superior em Análises Clínicas considero importante conhecer o princípio básico de cada um deles.

#### 5.1.1 - RADIO IMMUNO ASSAY (RIA) E IMMUNO RADIOMETRIC ASSAY (IRMA)

Ambas são técnicas manuais que apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A técnica RIA é um ensaio competitivo que utiliza um antígeno análogo marcado, enquanto a técnica IRMA é um ensaio não competitivo que utiliza um anticorpo secundário marcado. O marcador é um isótopo radioativo, normalmente o Iodo<sup>125</sup>, que é detetado e quantificado num contador de radiação *gamma*. Utilizando soluções de concentração conhecida é construída uma curva de calibração, a partir da qual é possível determinar a concentração de antígeno na amostra do doente. Note-se que estas técnicas acarretam sempre um risco acrescido para o analista devido ao manuseamento de material radioativo<sup>16</sup>.

#### 5.1.2 - CHEMILUMINESCENT IMMUNO ASSAY (CLIA)

Os equipamentos *Immulite*<sup>®</sup> 2000 XPi da Siemens<sup>™</sup>, *ADVIA*<sup>®</sup> *Centaur*<sup>™</sup> da Siemens<sup>™</sup> e *Liaison*<sup>®</sup> da DiaSorin<sup>™</sup> executam imunoenaios de quimioluminescência (CLIA), que se baseiam na emissão de energia luminosa em consequência de uma reação química, que sinaliza a formação de complexos antígeno-anticorpo. Estes imunoenaios dependem do uso de compostos quimioluminescentes – fosfato de adamantil dioxetano no *Immulite*<sup>®</sup> 2000 XPi, éster de acridínio no *ADVIA*<sup>®</sup> *Centaur*<sup>™</sup> e um derivado do isoluminol no *Liaison*<sup>®</sup> – que ao reagirem com a fosfatase alcalina ou com um ácido e uma base, respetivamente, emitem luminescência. A luz produzida é medida pelo luminómetro em unidades relativas de luz (RLUs), que são posteriormente convertidas pelo sistema utilizando uma curva de calibração em concentração. Os ensaios realizados por estes equipamentos podem ser do tipo competitivo ou não competitivo, dependendo do analito que se pretende quantificar<sup>16</sup>.

### 5.1.3 - ELECTROCHEMILUMINESCENT IMMUNO ASSAY (ECLIA)

A tecnologia base do equipamento *Cobas e601 Analyser*<sup>®</sup> da *Roche*<sup>®</sup> *Diagnostics* é a eletroquimioluminescência (ECLIA). A ECLIA é um imunoenensaio semelhante à CLIA, contudo a emissão de energia luminosa não resulta de uma reação química direta mas sim de uma reação química despoletada por uma corrente elétrica. Assim sendo, após aplicação de uma determinada voltagem sobre a superfície de um eletrodo de platina, a tripropilamina (TPA) e o complexo de ruténio (marcador quimioluminescente ligado ao anticorpo ou antigénio) são eletricamente estimulados, levando a uma série de reações de oxidação e de redução. A produção de luz ocorre quando o complexo de ruténio, passa do estado excitado (nível energético superior) para o estado fundamental (nível energético inferior) (Figura 5). A luz produzida é medida pelo luminómetro em RLU, que são posteriormente convertidas pelo sistema utilizando uma curva de calibração em concentração. Os ensaios realizados por este equipamento também podem ser do tipo competitivo ou não competitivo<sup>16</sup>.

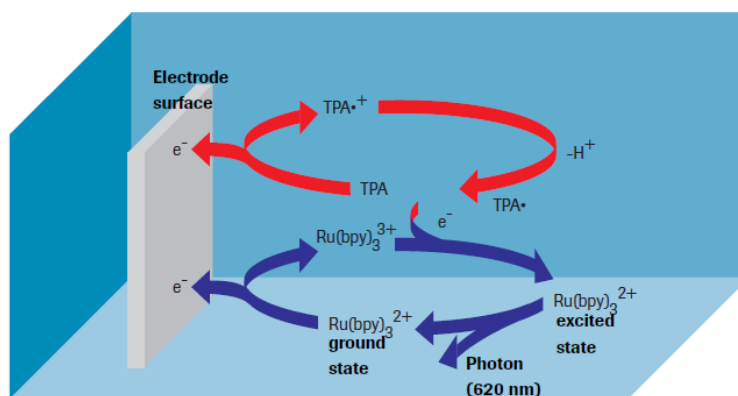


Figura 5 - Princípio de uma reação quimioluminescente gerada eletricamente.

### 5.1.4 - TIME RESOLVED AMPLIFIED CRYPTATE EMISSION (TRACE)

O *Kryptor*<sup>®</sup> da *B·R·A·H·M·S*<sup>TM</sup> é um sistema de análise automatizado com uma tecnologia distinta, designada de *Time Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE). Este sistema executa ensaios homogêneos não competitivos, em que o antigénio em estudo fica entre dois anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos diferentes, um dador (criptato de európio) e um aceitador (XL665). Apenas quando se forma o imunocomplexo, anticorpo dador-antigénio-anticorpo aceitador, existe proximidade suficiente entre os dois fluorocromos para que ocorra a transferência de energia do dador para o aceitador, com consequente amplificação do sinal de fluorescência (Figura 6). Quanto maior a intensidade de fluorescência medida pelo fotomultiplicador, maior a concentração de antigénio presente na amostra do doente<sup>17</sup>. Este equipamento possui várias vantagens em relação aos outros

analisadores automáticos, sendo uma delas a diluição inteligente. No início de cada reação é realizada uma estimativa da concentração final do analito, assim se houver uma amostra muito concentrada, esta é automaticamente diluída e analisada. Além disso, o *Kryptor*<sup>®</sup> possui uma reprodutibilidade excepcional e um tempo de incubação reduzido<sup>17,18</sup>.

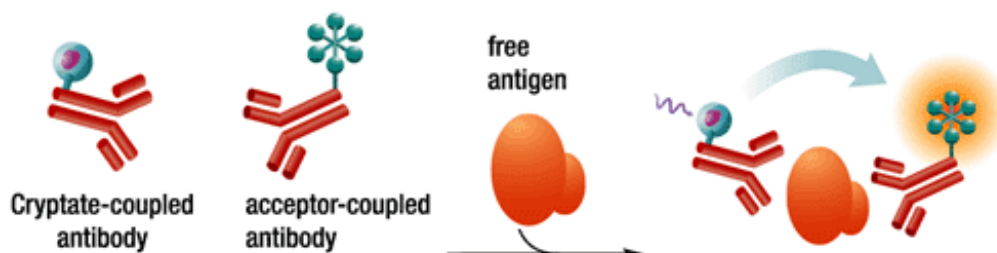


Figura 6 - Representação ilustrativa de um imunoenensaio por *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

### 5.1.5 - ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE (EMIT)

A tecnologia *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique* (EMIT) é um ensaio homogêneo competitivo normalmente utilizado na monitorização terapêutica de fármacos e é a base de funcionamento do analisador *Viva-E Syva Onboard*<sup>®</sup> da *Siemens*<sup>TM</sup>. O reagente possui um fármaco análogo que está marcado com uma enzima, sendo a mais usada a glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) de origem bacteriana. Se a quantidade de fármaco na amostra de soro for baixa, o anticorpo monoclonal liga-se ao fármaco análogo marcado, provocando uma alteração conformacional da enzima, com conseqüente redução da atividade enzimática (Figura 7A). Por outro lado, se a quantidade de fármaco na amostra de soro for elevada, este forma um imunocomplexo com o anticorpo, possibilitando que a enzima livre e ativa degrade o substrato e converta o NAD a NADH, que por sua vez pode ser medido espectrofotometricamente a 340nm (Figura 7B). A concentração de fármaco no soro tem uma relação direta com a quantidade de NADH formado<sup>16</sup>.

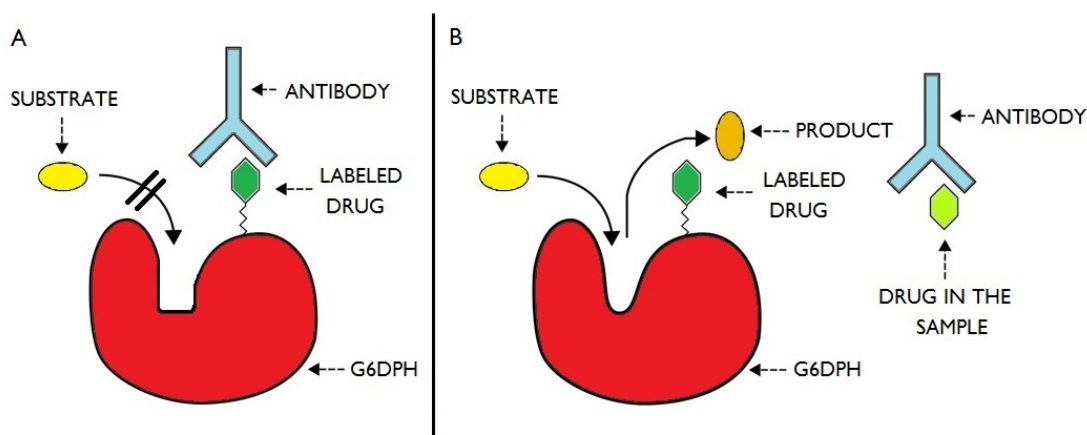


Figura 7 - Representação ilustrativa de um imunoenensaio por *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*. A – A alteração conformacional reduz a atividade enzimática. B – Enzima ativa.



### 5.1.6 - FLUORESCENCE ENZYME IMMUNOASSAY (FEIA)

O imunoensaio utilizado pelo equipamento automático *UniCAP®* da *Phadia* designa-se de *Fluorescence Enzyme ImmunoAssay* (FEIA). Este é um ensaio imunoenzimático heterogéneo não competitivo com leitura final em fluorescência para a deteção de autoanticorpos. Como se pretende pesquisar no soro do doente os anticorpos marcadores de determinada doença autoimune, cada poço encontra-se revestido com o respetivo antígeno. Após a formação do complexo antígeno-anticorpo, é adicionado o segundo anticorpo que está marcado com a enzima  $\alpha$ -Galactosidase. De seguida, ao adicionar-se o substrato 4-metilo-beliferilo- $\alpha$ -D-galactosido, este é hidrolisado pela enzima e ocorre a emissão de fluorescência, que é diretamente proporcional à concentração de anticorpo presente na amostra (Figura 8)<sup>19</sup>.

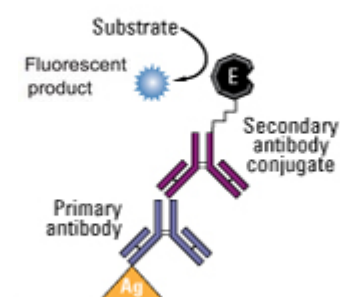


Figura 8 - Representação ilustrativa de um imunoensaio por *Fluorescence Enzyme ImmunoAssay*.

### 5.1.7 – NEFELOMETRIA

A nefelometria é a tecnologia utilizada pelo equipamento *BN ProSpec®* da *Siemens™* para a quantificação de várias proteínas plasmáticas. Esta técnica baseia-se na medição da intensidade de luz dispersa lateralmente, normalmente a um ângulo de 90°, devido aos agregados formados (imunocomplexos), entre o anticorpo específico não marcado (normalmente presente no reagente) e o antígeno (normalmente presente na amostra) (Figura 9). Todas as amostras são previamente diluídas pelo equipamento, de modo a que a medição ocorra na zona ascendente da curva de precipitação de *Heidelberger* (zona de excesso de anticorpo), onde a concentração de antígeno é proporcional à quantidade de imunocomplexos formados<sup>16,20</sup>.

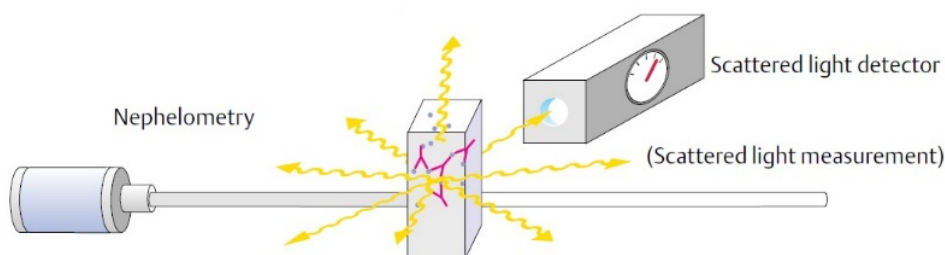


Figura 9 - Representação ilustrativa de um imunoensaio por nefelometria.

## 5.2 - MARCADORES TUMORAIS E UTILIDADE CLÍNICA

Os marcadores tumorais são moléculas, normalmente proteínas, produzidas pelas células neoplásicas e secretadas nos fluidos biológicos, que podem servir como indicador bioquímico do crescimento e/ou atividade tumoral. Na maioria dos casos, os marcadores tumorais são produzidos em pequenas concentrações pelas células normais, mas quando ocorre a proliferação anormal e descontrolada de um clone de células estes passam a ser produzidos em grandes concentrações. É por isso, de fulcral importância estipular valores de referência para cada marcador tumoral. Sempre que o valor de referência for ultrapassado, as possíveis causas para esse aumento devem ser investigadas<sup>16,21</sup>.

Existe uma variedade enorme de moléculas com diferentes funções fisiológicas que podem ser consideradas marcadores tumorais, como é o caso dos antígenos de superfície celular (oncofetais, oncoplacentares, mucínicos e tecidulares), hormonas, enzimas, fragmentos de citoqueratinas e outro tipo de moléculas resultantes do metabolismo das células tumorais<sup>21,22</sup>.

Atualmente, o interesse clínico dos marcadores tumorais assenta principalmente no acompanhamento de doentes em remissão, na avaliação da resposta terapêutica, no controlo pós-cirúrgico após a remoção do tumor e na deteção precoce de recidivas ou metastização. Nalguns casos, também podem ter utilidade na definição de um prognóstico, auxiliarem no diagnóstico diferencial, dar uma ideia aproximada do estágio clínico e da massa tumoral. De uma maneira geral, os marcadores tumorais são pouco sensíveis e específicos na fase inicial da doença, pelo que não é recomendada a sua determinação isolada como teste de rastreio ou de diagnóstico, contudo, podem ser usados como um exame de diagnóstico complementar. De facto, é muito difícil obter uma concentração sérica de um marcador tumoral que nos indique com total segurança a presença de um tumor maligno<sup>16,21</sup>. Assim, conclui-se que, o diagnóstico do cancro deve assentar na história clínica do doente e num conjunto de exames que ajudem a confirmar ou a descartar a suspeita clínica, como por exemplo: exames laboratoriais, exames imagiológicos (ecografia, TAC, ressonância magnética), exames clínicos e biópsia<sup>21</sup>.

Além do que já foi referido anteriormente, o marcador tumoral ideal será aquele que leve ao diagnóstico precoce do tumor mesmo na ausência de clínica, que seja apenas secretado nos fluidos biológicos após o início do processo maligno e que indique o órgão ou tecido de origem do tumor<sup>22</sup>. Mas este tipo de marcador ainda não foi descoberto. Como tal a utilidade clínica dos marcadores tumorais pode-se definir essencialmente por dois parâmetros: sensibilidade e especificidade<sup>21</sup>. A sensibilidade refere-se à percentagem de indivíduos doentes que são corretamente identificados por um resultado positivo

(verdadeiros positivos), ou seja, quanto menor a percentagem de falsos negativos maior a sensibilidade. A especificidade refere-se à percentagem de indivíduos saudáveis ou com patologias benignas que são corretamente identificados por um resultado negativo (verdadeiros negativos), ou seja, quanto menor a percentagem de falsos positivos maior a especificidade.

### 5.2.1 - COLHEITA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Os marcadores tumorais podem ser detetados e quantificados através de imunoensaios realizados em amostras do próprio tumor, de metástases, de sangue periférico ou doutros fluídos biológicos, como por exemplo urina, líquido cefalorraquidiano e derrames<sup>22</sup>.

Normalmente, no SPC do IPOCFG o tumor é estudado a nível periférico através de uma análise pouco invasiva, o que significa que uma colheita de sangue por punção venosa é suficiente para se proceder à avaliação sérica de vários marcadores tumorais. O tubo de colheita é um tubo adequado à obtenção de soro. Este possui um gel e esferas de poliestireno no fundo que durante a centrifugação, a 3000 rpm durante 10 minutos, sobem e formam uma barreira/camada entre os componentes celulares aprisionados no coágulo entretanto formado e o soro, o que permite a utilização do tubo primário nos diferentes equipamentos.

O doseamento dos marcadores tumorais encontra-se distribuído por vários equipamentos: *Immulite® 2000 XPi* da Siemens<sup>TM</sup>, *Liaison®* da DiaSorin<sup>TM</sup>, *Cobas e601 Analyser®* da Roche<sup>®</sup> Diagnostics e *Kryptor®* da B·R·A·H·M·S<sup>TM</sup>.

Tendo em conta a enorme variedade de imunoensaios existentes, é urgente a *standardização* destes testes internacionalmente, de modo a reduzir as diferenças nos valores de referência entre os diferentes equipamentos. Dado não existir no momento essa padronização, é de todo aconselhável que o seguimento dos doentes oncológicos seja efetuado sempre no mesmo equipamento.

### 5.2.2 - ANTIGÉNIOS ONCOFETAIS

#### 5.2.2.1 - Alfa-Fetoproteína

A Alfa-Fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína de 70 kDa com uma composição proteica muito semelhante à albumina. Trata-se de um componente fetal importante, que é sintetizado pelas células do saco vitelino e posteriormente pelo fígado fetal. O nível de AFP no soro do recém-nascido diminui durante os primeiros meses de vida até atingir o valor

fisiológico do adulto (inferior a 5,0 UI/mL). O seu papel biológico parece estar relacionado com o transporte de vários componentes plasmáticos, como ácidos gordos não esterificados, bilirrubina e hormonas esteróides<sup>21,23</sup>.

Em oncologia, a determinação da AFP é particularmente importante no diagnóstico e acompanhamento pós-terapêutico de carcinomas hepatocelulares primários e ainda de tumores germinativos do testículo ou do ovário. A AFP também pode ser útil na monitorização de possível metastização hepática com origem em neoplasias malignas de diferentes órgãos (mama, cólon, pulmão)<sup>23,24</sup>. Nalguns tumores gastrointestinais, sobretudo os gástricos, a presença da AFP indica mau prognóstico<sup>21</sup>.

Podem ocorrer aumentos moderados na ausência de tumor, nunca superiores a 50 UI/mL, no caso de gravidez e doenças hepatobiliares, como por exemplo: cirrose hepática, abscessos hepáticos, hepatite vírica e medicamentosa e atresia das vias biliares<sup>21,23</sup>.

#### 5.2.2.2 - Antígeno Carcinoembrionário

O Antígeno Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína de elevado peso molecular (aproximadamente 180 kDa), cuja função fisiológica ainda não se encontra bem definida. Esta proteína é produzida em grande quantidade pelas células da mucosa gastrointestinal do feto e em pequena quantidade pelas células da mucosa gastrointestinal do adulto. Os valores de referência são normalmente inferiores a 3,4 ng/mL, mas nos indivíduos fumadores podem observar-se pequenos aumentos na ordem dos 5,2 ng/mL<sup>21</sup>.

O principal interesse clínico do CEA é no campo do carcinoma colo-rectal, mas também é possível encontrá-lo noutro tipo de tumores – fígado, mama, ovário, pâncreas, estômago, pulmão e tiróide - e respetivas metástases<sup>22,25</sup>. Assim sendo, o CEA em associação com outros marcadores tumorais mais específicos (exemplo: CA 19.9, CA 15.3 e CAL) permite fazer o prognóstico, monitorizar a eficácia terapêutica e antever recidivas ou metastização<sup>25-27</sup>. A determinação pré-operatória da concentração do CEA fornece um valor base para interpretar concentrações subsequentes. Nos doentes com carcinoma do cólon, após terapêutica cirúrgica ou quimioterapia a persistência de concentrações elevadas de CEA é sugestivo de doença residual. Por outro lado, se o CEA normalizar após algumas semanas de tratamento, aumentos posteriores e repentinos habitualmente indicam recorrência ou metastização<sup>22</sup>.

O CEA possui baixa especificidade, que é demonstrada por quantidades aumentadas deste marcador em doenças benignas, como a insuficiência renal, cirrose hepática, colite ulcerosa, doença de Crohn, pancreatite, hipertiroidismo, quistos do ovário, doença pulmonar obstrutiva crónica e tuberculose<sup>21,22</sup>.

### 5.2.3 - ANTIGÉNIOS ONCOPLACENTARES

#### 5.2.3.1 - Gonadotrofina Coriônica Humana

A Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) é uma hormona de natureza glicoproteica produzida maioritariamente pelas células sinciotrofoblásticas da placenta. Pode também ser sintetizada, em menor concentração, pelo tecido mamário, prostático, testicular, uterino e renal. Na fase inicial da gravidez, a hCG tem como função impedir a degeneração do corpo lúteo e manter a síntese de progesterona. Esta hormona é constituída por duas subunidades ligadas de forma não covalente, a subunidade  $\alpha$  (similar à subunidade  $\alpha$  das hormonas TSH, LH e FSH) e a subunidade  $\beta$  (sequência de aminoácidos única), que possuem um peso molecular de 15 kDa e 22 kDa, respetivamente<sup>21,24</sup>. A subunidade  $\beta$  possui atividade biológica e especificidade imunológica, pelo que pode ser quantificada sem haver reação cruzada com outras hormonas. O imunoensaio utilizado no IPOCFG quantifica tanto a hCG total como a fração livre  $\beta$ , porque os tumores podem produzir diferentes variantes da hCG (hiperglicosilada, clivada, ausência do terminal C da fração  $\beta$ , etc)<sup>21</sup>.

A hCG total e a fração  $\beta$  encontram-se em pequenas concentrações no soro de indivíduos do sexo masculino e de mulheres não grávidas, aumentando exponencialmente a partir do 8º dia após a ovulação e atingindo o pico máximo entre a 10ª e a 12ª semana de gravidez, pelo que a quantificação sérica desta hormona pode ser utilizada no diagnóstico precoce da gravidez. Durante o resto da gravidez, o nível de hCG vai diminuindo progressivamente, até que volta a apresentar um valor reduzido após o parto (inferior a 5,0 mUI/L)<sup>21,22</sup>.

Um aumento da concentração de hCG na ausência de gravidez deve ser considerado patológico. A hCG é utilizada como marcador tumoral no diagnóstico complementar, avaliação do estágio da doença, monitorização da resposta terapêutica e acompanhamento de tumores germinativos do testículo e de tumores trofoblásticos de origem placentar (mola hidatiforme e coriocarcinoma)<sup>24</sup>. Nos tumores pancreáticos, pulmonares, renais, mamários, gastrointestinais e hepáticos está descrita a possibilidade de pequenos aumentos deste marcador<sup>21</sup>. A fração livre da  $\beta$ -hCG é utilizada no rastreio de anomalias fetais no primeiro trimestre de gestação, tais como a trissomia 21 (taxa de deteção 93-96%) e a trissomia 13 e 18 (taxa de deteção 75%). Neste caso, a determinação da hormona deve ser sempre associada a outros dados: exames imagiológicos, concentração sérica da proteína A plasmática associada à gravidez (PAPP-A) e idade materna<sup>28</sup>.

## 5.2.4 - ANTIGÉNIOS MUCÍNICOS

### 5.2.4.1 - Antígeno Carbohidrato 15.3

O Antígeno Carbohidrato 15.3 (CA 15.3) ou MUC-I é uma glicoproteína mucínica de elevado peso molecular (350 kDa), sintetizada pela maioria das células epiteliais glandulares. O valor normal é até 35,0 U/mL. Este antígeno mucínico é frequentemente solicitado pelos clínicos, uma vez que os seus níveis séricos estão significativamente elevados no caso de doentes com carcinoma avançado da mama<sup>21,26</sup>.

A determinação do CA 15.3 é recomendada em todas as etapas de evolução da doença, exceto no rastreio e no diagnóstico precoce em que o seu uso é limitado pela baixa sensibilidade e especificidade. Desta forma, é maioritariamente utilizado na deteção precoce de possíveis recidivas ou metástases, no controlo da eficácia do tratamento e determinação do prognóstico. Níveis séricos elevados de CA 15.3 antes do tratamento ou da cirurgia indicam um mau prognóstico e estão relacionados com a massa tumoral<sup>26</sup>. Estão descritos aumentos deste marcador tumoral em outras neoplasias: carcinoma do ovário, tumores do endométrio, hepatocarcinoma e carcinoma do pulmão de não-pequenas células<sup>21,22</sup>.

Insuficiência hepato-renal, infeções pulmonares, quistos do ovário e doenças autoimunes podem originar aumentos moderados da concentração do CA 15.3<sup>21</sup>.

### 5.2.4.2 - Antígeno Carbohidrato 125

O Antígeno Carbohidrato 125 (CA 125) é uma glicoproteína pertencente ao grupo das mucinas e é produzida pelos órgãos genitais femininos internos, e pelo mesotélio pleural, pericárdico e peritoneal. O valor de referência é inferior a 35,0 U/mL, podendo ser maior nas mulheres em idade fértil e menor em mulheres asiáticas ou africanas<sup>21</sup>.

Concentrações séricas elevadas deste antígeno (superiores a 900 U/mL) estão normalmente associadas a carcinomas avançados do ovário<sup>29</sup>. O interesse clínico do CA 125 consiste na monitorização da resposta terapêutica e deteção precoce de recidivas ou metastização, uma vez que este marcador tumoral aumenta algum tempo antes de haver sinais clínicos da doença<sup>22,29</sup>. A carcinomatose peritoneal e metastização pleural originam concentrações significativamente elevadas de CA 125<sup>21</sup>. Carcinoma do endométrio, colo do útero, mama, pulmão de não-pequenas células e colón, podem causar pequenos aumentos da concentração do CA 125<sup>29</sup>.

São várias as situações clínicas que induzem falsos positivos, entre elas o derrame pleural e a ascite (<600 U/mL), a insuficiência renal, hepatopatias, gravidez e derrame pericárdico (<350 U/mL) e endometriose, quistos do ovário, miomas e inflamação pélvica

(<200 U/mL). Não se deve determinar o CA 125 durante o período menstrual por ocorrerem aumentos moderados deste marcador<sup>21,29</sup>.

#### 5.2.4.3 - Antígeno Carbohidrato 19.9

O Antígeno Carbohidrato 19.9 (CA 19.9) é uma glicoproteína do tipo mucina, que pode ser secretado pelas células do pâncreas e vias biliares, bem como pelo epitélio gástrico, salivar e endométrio. Consideram-se normais concentrações séricas inferiores a 37,0 U/mL<sup>21</sup>.

A sensibilidade e especificidade do CA 19.9 no caso do cancro pancreático é bastante elevada, sendo por isso considerado o marcador tumoral de eleição para esta situação. Apesar de possuir fraca utilidade na fase inicial da doença, permite o acompanhamento de doentes em tratamento e a deteção precoce de recidivas ou metastização alguns meses antes de se encontrar evidência clínica ou radiológica da doença<sup>30</sup>. Doentes com tumores hepáticos, colo-retais, gástricos, das vias biliares e do esófago também podem apresentar valores muito elevados deste marcador<sup>30</sup>.

Existem determinadas patologias benignas que podem dar origem a falsos positivos, nomeadamente patologias hepatobiliares, renais ou pancreáticas<sup>21,30</sup>.

#### 5.2.4.4 - Antígeno Carbohidrato 72.4

O Antígeno Carbohidrato 72.4 (CA 72.4) ou TAG-72 é uma glicoproteína tipo mucina de elevado peso molecular produzida em grande concentração por tumores malignos do trato gastrointestinal (cólon, estômago, pâncreas e vias biliares), uma vez que não tem sensibilidade de órgão. Consideram-se normais concentrações inferiores a 6,90 U/mL<sup>21,22</sup>.

A principal utilidade clínica do CA 72.4 é na deteção e monitorização da eficácia terapêutica de tumores gastrointestinais<sup>31</sup>. Também se pode verificar aumentos da sua concentração em tumores do ovário, da mama e do pulmão<sup>21</sup>. No carcinoma do ovário, a associação do CA 72.4 com o CA 125 permite aumentar a sensibilidade de diagnóstico e acompanhamento de doentes com tumores de origem mucinosa<sup>31</sup>.

Este marcador apresenta uma elevada especificidade, que ronda os 95%, em especial no carcinoma do estômago, logo são poucos os falsos positivos detetados<sup>31</sup>. A maioria dos falsos positivos encontrados estão relacionados com tratamentos com inibidores da bomba de prótons, anti-inflamatórios não esteróides (AINES) e corticóides<sup>21</sup>.

## 5.2.5 - ANTIGÉNIOS TECIDULARES

### 5.2.5.1 - Antígeno de Carcinoma das Células Escamosas

O Antígeno de Carcinoma das Células Escamosas (SCC) é uma glicoproteína citoplasmática com um peso molecular de 42 kDa, que faz parte de uma família de inibidores de serina-proteases, denominada de serpinas. O seu valor de referência é inferior a 1,5 ng/mL<sup>21</sup>.

O antígeno SCC está normalmente presente no epitélio escamoso da vulva, colo uterino, pulmão, esófago, e pele, contudo encontra-se em níveis muito elevados no soro de doentes com transformação maligna desses tecidos. Assim, o antígeno SCC é considerado o marcador tumoral de eleição no auxílio ao diagnóstico e seguimento de doentes com carcinoma de células escamosas, sendo particularmente útil em doentes com carcinoma do colo do útero. A quantificação deste marcador, prévio ao tratamento, de doentes com carcinoma do colo do útero tem relevância no prognóstico<sup>32</sup>. Em carcinomas não escamosos, como o adenocarcinoma do pulmão ou do pâncreas, também se podem detetar pequenos aumentos deste marcador<sup>21</sup>.

Falsos positivos podem ocorrer em situações benignas, tais como: doenças dermatológicas sistémicas (psoríase e eczema), insuficiência renal ou hepática, doenças ginecológicas e doenças pulmonares<sup>21</sup>.

## 5.2.6 - HORMONAS

### 5.2.6.1 - Calcitonina

A Calcitonina (CAL) é uma hormona polipeptídica com cerca de 32 aminoácidos, sintetizada no interior das células parafoliculares ou células C da tiróide. Esta hormona regula o metabolismo do cálcio e o maior estímulo para a sua libertação na corrente sanguínea é a hipercalemia. Tem um efeito antagónico à hormona da paratiroide (PTH), sendo a sua função normalizar os níveis séricos de cálcio através da inibição da reabsorção de cálcio no rim e da inibição da atividade osteoclástica no osso. Indivíduos saudáveis apresentam valores de referência entre os 0 – 18,2 pg/mL, contudo as mulheres possuem valores de referência ligeiramente mais baixos que os homens (0 - 11,5 pg/mL)<sup>22,27</sup>.

A principal utilidade clínica da CAL como marcador tumoral é no carcinoma medular da tiróide, sendo que pode ser usada de forma eficaz no rastreio e diagnóstico precoce em indivíduos com história familiar de carcinoma medular da tiróide e no diagnóstico complementar em indivíduos com nódulos na tiróide palpáveis e/ou observados



ecograficamente. Além disso, a CAL também possui um papel crucial no seguimento deste tipo de doentes<sup>27,33</sup>. Podem ser observados aumentos moderados desta hormona em doentes com carcinoma do pulmão de pequenas células, feocromocitoma ou outro tumor de origem neuroendócrina<sup>21,27</sup>.

Estão descritos aumentos não específicos dos níveis da CAL em doenças autoimunes da tiróide (doença de Graves e tiroidite de Hashimoto), doença de Paget óssea, hipercalcémia, insuficiência renal crónica, hipergastrinémia e inflamação aguda do pulmão<sup>21,27</sup>.

## 5.2.7 - ENZIMAS

### 5.2.7.1 - Antígeno Específico da Próstata

O Antígeno Específico da Próstata (PSA) é uma enzima glicoproteica com cerca de 34kDa, membro da família das caliceínas glandulares. Esta enzima é sintetizada maioritariamente pelas células epiteliais da próstata e secretada no líquido seminal, onde desempenha um papel fundamental na fluidificação do sémen. No soro, o PSA é encontrado na forma livre (fração inativa) e na forma ligada a proteínas inibidoras de proteases ( $\alpha_1$ -antitripsina e  $\alpha_2$ -macroglobulina). Os anticorpos utilizados na quantificação do PSA total não diferenciam as duas formas em circulação. Por norma, o seu valor de referência não deve ultrapassar os 4,0 ng/mL<sup>21,34</sup>.

#### PSA total

O PSA foi identificado por Wang e colaboradores em 1979 e a partir desse momento tem sido extensamente estudado e usado na rotina clínica<sup>22</sup>. Atualmente, o PSA é considerado um dos únicos marcadores tumorais com utilidade no rastreio precoce do cancro, uma vez que apresenta sensibilidade e especificidade suficiente para o carcinoma da próstata em homens assintomáticos com idades compreendidas entre os 55-70 anos. Em indivíduos entre os 45-50 anos com história familiar ou de raça negra também deve ser feita a determinação anual do PSA, devido ao risco elevado de desenvolverem cancro da próstata. Qualquer que seja o valor de PSA obtido deve ser sempre interpretado em conjunto com a clínica e com o resultado do exame de toque retal. A determinação do PSA é fulcral na monitorização dos doentes pós-tratamento mas escusada em estádios avançados da doença onde já não fornece informação adicional ao prognóstico<sup>34</sup>.

As principais causas de aumentos significativos do PSA total, em ausência de neoplasia, são a hiperplasia benigna da próstata e a prostatite. Existe uma série de situações que podem justificar a elevação temporária dos níveis séricos de PSA, nomeadamente a

realização prévia de toque retal, citoscopia, colonoscopia, biópsia ou prostatectomia, pelo que, não se recomenda a colheita de amostras para a quantificação do PSA após manipulação da próstata<sup>21,34</sup>.

#### Relação PSA livre / PSA total

O PSA livre corresponde a uma pequena fração do PSA total e resulta da excisão de dois resíduos de lisina, o que torna a enzima inativa<sup>21</sup>. Quando o toque retal é negativo e o valor de PSA total se situa entre 4 e 10 ng/mL (zona de diagnóstico cinzenta), deve ser requisitada a quantificação do PSA livre com o intuito de calcular a percentagem de PSA livre (% PSA livre). A percentagem de PSA livre não é mais do que a relação entre o PSA livre e o PSA total x 100, que nos pode auxiliar a diferenciar a doença prostática maligna da doença benigna e, conseqüentemente, evitar biópsias desnecessárias em doentes com níveis de PSA total moderadamente elevados<sup>34</sup>. Nos doentes com cancro da próstata a % de PSA livre é menor do que nos indivíduos saudáveis ou com hiperplasia benigna<sup>21</sup>.

Na literatura ainda não existe um consenso em relação aos valores da relação PSA livre / PSA total que se devem empregar. No entanto, em Portugal existe um algoritmo clínico recomendado pela Direção Geral de Saúde (DGS) para a deteção precoce do cancro da próstata, que se encontra esquematizado na Figura 10<sup>34</sup>.

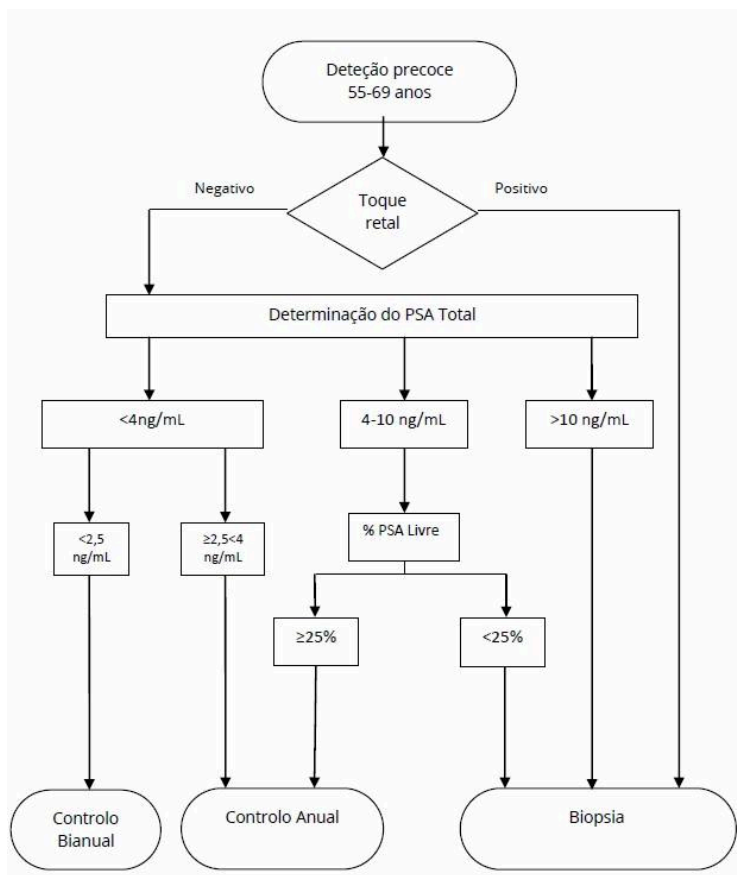


Figura 10 - Algoritmo clínico utilizado para a deteção precoce do cancro da próstata.

Segundo a norma da DGS, quando se obtêm uma relação entre o PSA livre e o PSA total inferior a 25%, deve-se suspeitar de cancro da próstata e o doente deve ser submetido a uma biópsia para confirmar. Por outro lado, quando se obtêm uma relação entre o PSA livre e o PSA total superior a 25%, isto sugere hiperplasia benigna da próstata e recomenda-se que o doente faça controlo anual do PSA total<sup>34</sup>.

#### 5.2.7.2 - Enolase Neuro Específica

A enolase (E.C. 4.2.1.11) é a enzima que catalisa o penúltimo passo da via glicolítica, convertendo o 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Existem três tipos de subunidades da enolase –  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  – que se podem combinar duas a duas e formar as várias isoenzimas que se conhecem até à data:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  e  $\gamma\gamma$ . A isoenzima  $\gamma\gamma$ , também conhecida como Enolase Neuro Específica (NSE), é normalmente expressa nos neurónios (centrais e periféricos), tecido nervoso periférico e tecido neuroendócrino. O valor de referência é de 12,5  $\mu\text{g/L}$ <sup>21</sup>.

A NSE é considerada um marcador extremamente valioso no diagnóstico diferencial, estadiamento, seguimento e controlo da terapêutica de doentes com carcinoma do pulmão de pequenas células. A concentração sérica desta enzima diminui durante a remissão e aumenta com a recidiva. Além disso, também pode ser útil na deteção, controlo terapêutico e acompanhamento de outros tumores neuroendócrinos (neuroblastoma, feocromocitoma e carcinoma medular da tiróide)<sup>35</sup>.

Um dos tecidos que possui maiores concentrações de NSE é o cérebro, assim sendo qualquer patologia a nível cerebral pode induzir falsos positivos. Contudo a principal causa de falsos positivos no laboratório deve-se à hemólise, porque os eritrócitos são ricos na isoenzima  $\alpha\gamma$  e os imunoensaios atualmente disponíveis no mercado não são capazes de diferenciar eficazmente as duas isoenzimas<sup>21</sup>.

### 5.2.8 - FRAGMENTOS DE CITOQUERATINAS

#### 5.2.8.1 - Cyfra 21.1

Cyfra 21.1 é uma proteína ácida de baixo peso molecular (30-40 kDa), formada a partir de um fragmento da citoqueratina 19, a qual é tipicamente expressa pelo epitélio do tecido pulmonar. As citoqueratinas parecem estar envolvidas em várias cascatas de sinalização intracelular e na estabilização das células epiteliais<sup>21,35</sup>.

A principal utilização clínica deste marcador é no diagnóstico diferencial, monitorização terapêutica e acompanhamento de doentes que padecem de cancro do

pulmão de não-pequenas células, em especial do tipo histológico de células escamosas associado ao SCC. Níveis séricos elevados de Cyfra 21.1 apontam para um mau prognóstico<sup>35</sup>. Também se pode verificar aumentos da sua concentração no carcinoma do colo do útero, da bexiga e da cabeça e pescoço<sup>22</sup>.

Pequenos aumentos deste marcador podem surgir em situações não neoplásicas, como por exemplo nas patologias benignas pulmonares (asma, pneumonia e tuberculose), hepáticas (cirrose, hepatite e colestase), renais (insuficiência renal), cutâneas (lesões) e gastrointestinais (doença de Crohn)<sup>21,22</sup>.

## 5.2.9 - OUTROS MARCADORES TUMORAIS

### 5.2.9.1 - Tiroglobulina

A Tiroglobulina (TG) é uma glicoproteína de elevado peso molecular (660 kDa), que representa cerca de 75% das proteínas presentes na tiróide. A TG é produzida nas células foliculares e transportada para o lúmen folicular (coloide), onde irá ocorrer a síntese das hormonas tiroideias, a triiodotironina ( $T_3$ ) e a tiroxina ( $T_4$ ). A concentração sérica da TG vai depender da massa de tecido diferenciado da tiróide, da presença de lesões ou de inflamação na glândula tiroidea e do grau de estimulação do recetor da hormona estimulante da tiróide (TSH) pela TSH, pela hCG ou pelos anticorpos anti-recetor da TSH (TRAbs). Todavia, o seu valor de referência varia normalmente entre os 0 e os 55 ng/mL<sup>21</sup>.

A principal utilidade clínica deste marcador tumoral é no seguimento pós-operatório de doentes com carcinoma diferenciado da tiróide, nomeadamente tumores de origem folicular ou papilar. A TG é uma ferramenta valiosa na deteção precoce de recidivas ou metastização deste tipo de tumores, na monitorização pós tiroidectomia e na determinação da eficácia terapêutica com iodo radioativo ( $I^{131}$ )<sup>33</sup>.

O aumento da TG no soro é um indicador não específico de disfunção da tiróide, na maioria dos casos com causa benigna. Assim sendo, níveis elevados de TG podem apontar para doença de Graves, tiroidites auto-imunes, bócio multinodular, entre outras. Existem outras situações benignas que também podem afetar os níveis séricos da TG, como por exemplo a gravidez, o tabaco, a deficiência de iodo (bócio endémico) e fármacos que bloqueiem a síntese ou libertação de  $T_3$  e  $T_4$ <sup>21,33</sup>.

#### 5.2.9.2 - Proteína Epidídima Humana 4

A Proteína Epidídima Humana 4 (HE-4) é uma proteína de baixo peso molecular (11 kDa) detetada em diversos tecidos. Encontra-se em maior concentração no trato genital feminino e no trato genital masculino e em menor concentração no epitélio respiratório, nos túbulos distais renais e nas glândulas salivares<sup>21</sup>.

A HE-4 é o marcador tumoral de eleição em doentes que padecem de neoplasias ováricas, uma vez que nestes casos há a sobreexpressão do gene que codifica esta proteína (WFDC2). Este marcador apresenta uma elevada sensibilidade para os carcinomas do ovário não mucinosos, nomeadamente para o carcinoma seroso e endometriode<sup>29</sup>. Também pode haver a expressão de HE-4, em menor intensidade, nos adenocarcinomas do pulmão, da mama e do endométrio<sup>21,29</sup>.

A especificidade do HE-4 é superior à do CA 125, sendo que a maior causa de aumentos moderados ocorre em doentes com patologia do foro renal<sup>21,29</sup>.

#### Índice de ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm)

Normalmente, é difícil para o médico diferenciar uma massa pélvica maligna de uma benigna apenas por técnicas imagiológicas (exemplo: ecografia ginecológica ou ressonância magnética), por isso sempre que se justifique pode ser calculado o índice de ROMA<sup>29,36</sup>.

O índice de ROMA é um algoritmo que combina o estado fértil da mulher com os marcadores tumorais CA 125 e HE-4, sendo uma mais-valia para os oncologistas ginecológicos pois permite avaliar o risco de carcinoma do ovário em doentes pré- ou pós-menopausa com massa pélvica, como representado na Tabela 13. Sempre que não se conhece o estado de menopausa de uma paciente com idade compreendida entre os 49-55 anos, deve-se dosear a Hormona Folículo Estimulante (FSH) e o 17- $\beta$ -estradiol<sup>36</sup>.

Tabela 13 - Valores de *cut-off* do índice de ROMA que nos permitem avaliar o risco de carcinoma do ovário em doentes pré- ou pós-menopausa com massa pélvica.

	<b>Mulheres pré-menopausa</b>	<b>Mulheres pós-menopausa</b>	<b>Risco de a massa pélvica ser cancro do ovário</b>
<b>Índice de ROMA</b>	< 11,4%	< 29,9%	Baixo
	> = 11,4%	> = 29,9%	Alto

Estes valores de *cut-off* resultam de um ensaio clínico internacional realizado pela Roche® Diagnostics e foram determinados com o intuito de obter uma especificidade de 75% quando combinado o CA 125 com o HE-4.

### 5.2.9.3 - Cromogranina A

A família das graninas é constituída pela cromogranina A, B e C e pela secretogranina III-VII. A granina mais abundante no ser humano é a Cromogranina A (Cg A), uma glicoproteína ácida hidrofílica com 49 kDa que se encontra armazenada nos grânulos secretores dos tecidos neuroendócrinos, nomeadamente no trato gastrointestinal, na zona medular das glândulas suprarrenais, na hipófise e no pâncreas. A sua concentração sérica encontra-se entre os 19,4 – 98,1 ng/mL<sup>21,37</sup>.

A principal utilidade clínica da Cg A é no diagnóstico e seguimento de doentes com tumores neuroendócrinos, como o tumor carcinóide, feocromocitoma, adenoma hipofisário, carcinoma do pâncreas e carcinoma medular da tiróide<sup>22,27,37</sup>. Mas este marcador tumoral não é específico de tumores neuroendócrinos, uma vez que pode haver aumentos significativos de Cg A em tumores não neuroendócrinos (fígado, próstata, cólon ou pâncreas)<sup>21,23,37</sup>.

Podem ser encontrados níveis elevados desta proteína no caso de doenças benignas como a gastrite e em doentes com cardiopatias e insuficiência renal. Os valores da Cg A também podem subir durante o tratamento com inibidor da bomba de protões, pelo que se recomenda a interrupção do tratamento duas semanas antes da sua determinação<sup>21,37</sup>.

### 5.2.9.4 - Proteína S100B

A proteína S100B faz parte de uma família de proteínas de baixo peso molecular que ligam cálcio. Esta possui uma estrutura dimérica que resulta da combinação de dois monómeros,  $\alpha$  e  $\beta$ , originando dois homodímeros (S100 $\alpha\alpha$  e S100 $\beta\beta$ ) e um heterodímero (S100 $\alpha\beta$ ). A S100 pode ser encontrada em vários tecidos: melanócitos, células renais, ilhéus de Langerhans, músculo esquelético e cardíaco e sistema nervoso central (células de glia e de Schwann). O seu papel biológico permanece incerto, mas parece estar relacionado com a divisão e diferenciação celular. O valor de referência, no soro, é de 0,15  $\mu\text{g/L}$ <sup>21</sup>.

O aumento do homodímero S100 $\beta\beta$  está associado ao melanoma maligno, sendo considerado um marcador útil no diagnóstico diferencial, estadiamento, prognóstico, controlo terapêutico e na deteção precoce de metastização. Quanto mais elevados forem os níveis circulantes de S100 $\beta\beta$ , menor a taxa de sobrevivência<sup>38</sup>. Devido à elevada especificidade desta proteína é possível fazer o diagnóstico diferencial do melanoma maligno de outras patologias cutâneas não neoplásicas<sup>21,38</sup>.

Estão descritos falsos positivos em situações de insuficiência renal (valor 20 vezes superior ao normal), hepatopatias, patologias do sistema nervoso central, gravidez, doenças autoimunes sistémicas e algumas doenças infecciosas<sup>21</sup>.

### 5.2.9.5 - $\beta$ 2 Microglobulina

A  $\beta$ 2 Microglobulina (BMG) é uma das cadeias integrantes da molécula do complexo de histocompatibilidade da classe I (MHC I), que está presente em todas as células nucleadas. Esta glicoproteína de baixo peso molecular (12 kDa) apresenta duas funções importantes: reforçar a ligação do antígeno e estabilizar a molécula MHC I após a ligação do peptídeo. O seu valor de referência é inferior a 2,50 mg/L<sup>22,39</sup>.

A BMG é o marcador tumoral utilizado em determinadas patologias neoplásicas do leucócito, como a leucemia linfocítica crónica de células B, linfomas e mieloma múltiplo. O seu interesse clínico consiste maioritariamente na avaliação da eficácia da terapêutica em curso, evolução da doença e relaciona-se ainda com a massa tumoral. No mieloma múltiplo a BMG é um importante marcador de prognóstico, uma vez que concentrações séricas superiores a 6 mg/L estão associadas a taxas de reposta ao tratamento e de sobrevivência baixas<sup>39</sup>.

A insuficiência renal pode levar ao aumento moderado deste marcador, assim como múltiplas doenças inflamatórias, infecciosas e auto-imunes<sup>21,39</sup>.

Na Tabela 14 encontra-se discriminado para cada Marcador Tumoral o equipamento utilizado para a sua determinação, o respetivo fornecedor, o tipo de imunoensaio e o valor de referência.

Tabela 14 - Marcadores Tumorais quantificados no IPOCFG – equipamento, fornecedor, imunoensaio e valor de referência.

Parâmetro	Equipamento	Fornecedor	Imunoensaio	Valor de referência
ANTIGÉNIOS ONCOFETAIS				
AFP	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	< 5,0 UI/mL
CEA	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	Não fumadores < 3,4 ng/mL
				Fumadores <= 5,2 ng/mL
ANTIGÉNIOS ONCOPLACENTARES				
hCG	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	< 5,0 mUI/mL

Tabela 14 (cont.) – Marcadores Tumorais quantificados no IPOCFG – equipamento, fornecedor, imunoenensaio e valor de referência.

ANTIGÉNIOS MUCÍNICOS				
CA 15.3	<i>Kryptor®</i>	<i>B R A H M S™</i>	TRACE	< 35,0 U/mL
CA 125	<i>Cobas e601</i>	<i>Roche® Diagnostics</i>	ECLIA	< 35,0 U/mL
CA 19.9	<i>Cobas e601</i>	<i>Roche® Diagnostics</i>	ECLIA	< 37,0 U/mL
CA 72.4	<i>Cobas e601</i>	<i>Roche® Diagnostics</i>	ECLIA	< 6,90 U/mL
ANTIGÉNIOS TECIDULARES				
SCC	<i>Kryptor®</i>	<i>B R A H M S™</i>	TRACE	< 1,5 ng/mL
HORMONAS				
CAL	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	Homem < 18,2 pg/mL
				Mulher < 11,5 pg/mL
ENZIMAS				
PSA total	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	< 4,0 ng/mL
NSE	<i>Kryptor®</i>	<i>B R A H M S™</i>	TRACE	< 12,5 µg/L
FRAGMENTOS DE CITOQUERATINAS				
Cyfra 21.1	<i>Cobas e601</i>	<i>Roche® Diagnostics</i>	ECLIA	< 3,30 ng/mL
OUTROS MARCADORES TUMORAIS				
TG	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	< 55,0 ng/mL
HE-4	<i>Cobas e601</i>	<i>Roche® Diagnostics</i>	ECLIA	< 125 pmol/L
Cg A	<i>Kryptor®</i>	<i>B R A H M S™</i>	TRACE	19,4 - 98,1 ng/mL
S100B	<i>Liaison®</i>	<i>DiaSorin™</i>	CLIA	< 0,15 µg/L
BMG	<i>Immulite® 2000 XPi</i>	<i>Siemens™</i>	CLIA	< 2,50 mg/L



## 6 - CONCLUSÃO

A realização do estágio curricular no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil permitiu-me conhecer e perceber a dinâmica de um laboratório de Análises Clínicas na vertente hospitalar de oncologia. Além disso, possibilitou-me aplicar na prática os conhecimentos adquiridos ao longo da componente curricular do mestrado, familiarizar-me com as regras e procedimentos do laboratório, manipular e processar diversos produtos biológicos, contactar com diferentes equipamentos automáticos e semi-automáticos, executar técnicas manuais e analisar resultados.

Devido à minha falta de experiência no mundo do trabalho, tive algum receio de que não me conseguisse integrar e adaptar nas diferentes equipas de trabalho de cada setor, mas este estágio provou-me exatamente o contrário. Apesar de ainda ter um longo caminho pela frente, sei que adquiri boa capacidade de trabalhar em equipa ou autonomamente e que tenho vontade de aprender mais. Tendo tudo isto em conta, posso afirmar sem qualquer dúvida que o estágio curricular é uma mais-valia.

Sendo o IPOCFG uma unidade hospitalar focada no diagnóstico, tratamento e seguimento de doentes oncológicos, é necessário manter elevados padrões de qualidade. Nesse sentido, o laboratório foi adquirindo novos equipamentos automáticos e implementando programas de controlo de qualidade interno e externo. No início do estágio, senti alguma dificuldade em perceber qual a importância do controlo de qualidade no laboratório, uma vez que nunca tinha tido qualquer tipo de formação neste assunto. Assim sendo, gostaria de sugerir que a disciplina de Gestão de Qualidade Laboratorial passasse a ser lecionada no 1º semestre do 2º ano do Mestrado de Análises Clínicas.

Durante estes 2 últimos anos adquiri as competências e os conhecimentos necessários para o exercício profissional das Análises Clínicas, uma vez que nos seus diferentes âmbitos, obtive uma excelente formação teórica e prática tanto por parte da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra como do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

## BIBLIOGRAFIA

1. [http://www.croc.min-saude.pt/Hospital/Apresentacao/?sm=1\\_0](http://www.croc.min-saude.pt/Hospital/Apresentacao/?sm=1_0)
2. MAHON, C.R.; LEHMAN, D.C.; MANUSELIS, G. - **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ª Ed. Maryland Heights, Missouri: Saunders, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
3. MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; Pfaller, M.A. - **Medical Microbiology**. 7ª Ed. Philadelphia: Saunders, 2013. ISBN 978-0-323-08692-9.
4. TILLE, P.M. - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 13ª Ed. St. Louis, Missouri: Mosby, 2014. ISBN 978-0-323-08330-0.
5. FONSECA, A.B. *et al.* - **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Ministério da Saúde - Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, Programa Nacional de Controlo de Infeção, 2004.
6. KASS, E.H. - **Asymptomatic infections of the urinary tract**. *Trans Assoc Am Physicians*, 1956. 69:56-64.
7. O'CONNOR, J.R.; JOHNSON, S.; GERDING, D.N. - **Clostridium difficile infection caused by the epidemic BI/NAPI/027 strain**. *Gastroenterology*, 2009. 136(6):1913-24.
8. VAN SCOY, R.E. - **Bacterial sputum cultures. A clinician's viewpoint**. *Mayo Clin Proc*, 1977. 52(1):39-41.
9. MURRAY, P.R.; WASHINGTON, J.A. - **Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum**. *Mayo Clin Proc*, 1975. 50(6):339-44.
10. SCHIFFER, C.A. *et al.* - **Central venous catheter care for the patient with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline**. *J Clin Oncol*, 2013. 31(10):1357-70.
11. FLETCHER, S. - **Catheter-related bloodstream infection**. *Contin Educ Anaesth, Crit Care Pain*, 2005. 5(2):49-51.
12. MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. - **A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection**. *N Engl J Med*, 1977. 296(23):1305-9.
13. JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. - **Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices**. *Clin Infect Dis*, 2009. 49(11):1749-55.
14. DUBREUIL, L.; HOUCHE, I.; SINGER, E. - **Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Evaluation of the Redesigned (Version 96) bioMérieux ATB ANA Device**. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(6):1824-28.
15. MATUSCHEK, E.; BROWN, D.F.; KAHLMETER, G. - **Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories**. *Clin Microbiol Infect*, 2014. 20(4):O255-66.
16. WILD, D. - **The Immunoassay Handbook**. 3ª Ed. Oxford: Elsevier Ltd., 2005. ISBN 0-08-044526-8.

17. TRUCHAUD, A. *et al.* - **An Innovative Modular Approach in an Automated Compact Immunoassay System.** Journal of Laboratory Automation, 2009. 14(1):41-48.
18. <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=0&tabid=246>
19. ANADÓN, A.M. *et al.* - **Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s I and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay.** Clin Vaccine Immunolo, 2010. 17(4):496-502.
20. BURMESTER, G.; PEZZUTTO, A. - **Color Atlas of Immunology.** New York: Thieme, 2003. ISBN 0-86577-964-3.
21. MOLINA, R. *et al.* - **Utilidad Clínica de los Marcadores TumORAles [Estado Actual y Perspectiva de Futuro III].** Roche Diagnostics S.L., 2011.
22. ALMEIDA, J.R. *et al.* - **Marcadores TumORAis: Revisão de Literatura.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2007. 53(3):305-316.
23. MALAGUARNERA, G. *et al.* - **Serum markers of hepatocellular carcinoma.** Dig Dis Sci, 2010. 55(10):2744-55.
24. KREGE, S.; ALBERS, P.; HEIDENREICH, A. - **[The role of tumour markers in diagnosis and management of testicular germ cell tumours].** Urologe A, 2011. 50(3):313-21.
25. SISIK, A. *et al.* - **CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients.** Asian Pac J Cancer Prev, 2013. 14(7):4289-94.
26. MOLINA, R. *et al.* - **Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers recommendations.** Tumour Biol, 2005. 26(6):281-93.
27. LEBoulLEUX, S. *et al.* - **Medullary thyroid carcinoma.** Clin Endocrinol (Oxf.), 2004. 61(3):299-310.
28. NICOLAIDES, K.H. - **Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks.** Prenat Diagn, 2011. 31(1):7-15.
29. MOLINA, R. *et al.* - **HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases.** Tumour Biol, 2011. 32(6):1087-95.
30. DUFFY, M.J. *et al.* - **Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report.** Ann Oncol, 2010. 21(3):441-7.
31. GUADAGNI, F. *et al.* - **CA 72-4 serum marker--a new tool in the management of carcinoma patients.** Cancer Invest, 1995. 13(2):227-38.
32. JEONG, B.K. *et al.* - **The role of squamous cell carcinoma antigen as a prognostic and predictive factor in carcinoma of uterine cervix.** Radiat Oncol J, 2011. 29(3):191-8.
33. PACINI, F. *et al.* - **Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** Ann Oncol, 2010. 21(5):v214-9.
34. PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde - **Prescrição e Determinação do Antígeno Específico da Próstata – PSA.** Lisboa: Norma nº 060/2011 de 29/12/2011 atualizada a 01/08/2014.

35. OREMEK, G.M.; SAUER-EPEL, H.; BRUZDZIAK, T.H. - **Value of tumour and inflammatory markers in lung cancer.** *Anticancer Res*, 2007. 27(4A):1911-5.
36. MOORE, R.G. *et al.* - **Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass.** *Obstet Gynecol*, 2011. 118(2 Pt 1):280-8.
37. MODLIN, I.M. *et al.* - **Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease.** *Ann Surg Oncol*, 2010. 17(9):2427-43.
38. HARPIO, R.; EINARSSON, R. - **S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma.** *Clin Biochem*, 2004. 37(7):512-8.
39. BETHEA, M.; FORMAN, D.T. - **Beta 2-microglobulin: its significance and clinical usefulness.** *Ann Clin Lab Sci*, 1990. 20(3):163-8.



## ANEXOS

### MEIOS DE CULTURA

#### **Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS):**

Classificação – Meio não seletivo e enriquecido; Principais constituintes - Peptonas de caseína e de carne, extratos de leveduras e sangue de carneiro; Objetivo - Promover o crescimento de uma grande variedade de bactérias, tanto aeróbias como anaeróbias. A adição de 5% de sangue de carneiro permite o crescimento de bactérias mais exigentes (devido à presença de fator X) e possibilita a visualização dos diferentes tipos de hemólise ( $\alpha$  ou  $\beta$  hemólise); Caraterísticas das colónias –  $\alpha$  hemólise: cor esverdeada na base e no bordo da colónia.  $\beta$  hemólise: halo mais claro em torno da colónia. Sem hemólise: não se observa alterações na coloração da gelose.

#### **Gelose Chocolate PolyViteX (PVX):**

Classificação – Meio não seletivo e enriquecido; Principais constituintes – Peptona de caseína e de carne, hemoglobina e PolyViteX que fornecem à gelose a hemina (fator X) e o NAD (fator V). Objetivo – Meio que se destina a auxiliar o desenvolvimento de microrganismos fastidiosos, como o *Haemophilus* spp., a *Neisseria* spp. e *Streptococcus pneumoniae*.

#### **Gelose Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED):**

Classificação – Meio não seletivo e diferencial; Principais constituintes – Peptonas de gelatina e caseína, extrato de carne, lactose, L-cistina e azul de bromotimol; Objetivo – Meio que se utiliza sobretudo para a cultura de amostras de urina. Sendo este um meio deficiente em eletrólitos, diminui a probabilidade de ocorrer o fenómeno de *swarming* pelos *Proteus* spp.. Caraterísticas das colónias – Bactérias fermentadoras da lactose: colónias amarelas. Bactérias não fermentadoras da lactose: colónias incolores, verdes ou azuis.

#### **Gelose Columbia ANC + 5% de sangue carneiro (CNA):**

Classificação – Meio seletivo e diferencial; Principais constituintes – Peptonas de caseína e de carne, extratos de leveduras, sangue de carneiro, colimicina e ácido nalidíxico; Objetivo – Cultura de bactérias Gram-positivo, uma vez que a adição dos antibióticos inibe o crescimento da flora Gram-negativo. Caraterísticas das colónias –  $\alpha$  hemólise: cor

esverdeada na base e no bordo da colónia.  $\beta$  hemólise: halo mais claro em torno da colónia. Sem hemólise: não se observa alterações na coloração da gelose.

### **Gelose *Schaedler* + 5% de sangue de carneiro (SCS):**

Classificação – Meio enriquecido; Principais constituintes – Peptonas provenientes dos vegetais e da carne, extratos de levedura, vitamina K, sangue de carneiro, hemina, L-cistina e glucose; Objetivo - Favorecer o isolamento e cultura de bactérias anaeróbias, obrigatórias e facultativas. Para se diferenciar as bactérias anaeróbias estritas das facultativas ou aeróbias é necessário semear duas placas de SCS, uma em aerobiose e outra em anaerobiose para efeitos comparativos, e realizar o teste do disco de metronidazol. Caraterísticas das colónias – Anaeróbios estritos: crescem apenas na placa colocada em anaerobiose e são sensíveis ao metronidazol, formando um halo à volta do disco. Anaeróbios facultativos: crescem nas duas placas e não são sensíveis ao metronidazol, havendo crescimento bacteriano em volta do disco.

### **Hektoen Enteric Agar (Hektoen):**

Classificação – Meio seletivo e diferencial; Principais constituintes – Sais biliares, lactose, salicilina, sacarose, azul de bromotimol, tiosulfato de sódio e citrato de ferro amoniacal (pesquisa de  $H_2S$ ); Objetivo – Meio utilizado na deteção de microrganismos patogénicos presentes em amostras fecais, nomeadamente no isolamento da *Salmonella* spp. e da *Shigella* spp.. É também nesta gelose que se faz a repicagem do caldo de enriquecimento (Selenito-F); Caraterísticas das colónias – Microrganismos não patogénicos (fermentadores dos hidratos de carbono): colónias grandes amarelas ou cor de salmão. *Salmonella*: colónias verdes ou azuis-esverdeadas com ou sem um precipitado negro no centro. *Shigella*: colónias verdes ou azuis-esverdeadas sem o precipitado negro no centro.

### **Gelose *Campyloset* (CAM):**

Classificação – Meio seletivo e enriquecido; Principais constituintes - Sangue de carneiro e vários agentes antimicrobianos como: vancomicina, trimetoprim, polimixina B e anfotericina B; Objetivo – Meio destinado à pesquisa de *Campylobacter* spp. a partir de amostras fecais; Caraterísticas das colónias - Colónias de *Campylobacter*: cinzentas, pequenas, planas e não hemolíticas. Mas também podem ser mucoides, ligeiramente rosadas ou aparecerem em forma de vela.

### **Meio Löwenstein-Jensen (LJ-T):**

Classificação – Meio não seletivo e enriquecido; Principais constituintes – Fécula de batata, ovo, glicerol, asparagina e verde malaquite; Objetivo - Promover o crescimento de *Mycobacterium* spp.; Caraterísticas das colónias – *Mycobacterium tuberculosis*: colónias brancas ou amarelas com aspeto rugoso, geralmente em forma de uma couve-flor. A contaminação da amostra com outro tipo de bactérias pode levar a uma modificação da cor do meio.

### **Frascos de hemocultura Bactec™:**

Classificação – Meio não seletivo; Principais constituintes – Meio líquido de soja-caseína digerida, extratos de levedura, aminoácidos e açúcares; Objetivo – Permite o crescimento de bactérias (aeróbias e anaeróbias) e leveduras presentes no sangue; Princípio – Assim que a amostra de sangue é inoculada no meio, o frasco deve ser colocado o mais rápido possível no interior do equipamento BACTEC™. Cada frasco possui um sensor químico que deteta aumentos na produção de CO<sub>2</sub>, aumentos esses que são devidos ao crescimento microbiológico. Por sua vez, o aumento de CO<sub>2</sub> leva a aumentos proporcionais na fluorescência que são detetados pelo equipamento (leitura positiva).

### **Caldo Schaedler + Vitamina K3 (Schaedler):**

Classificação – Caldo de enriquecimento; Principais constituintes – Peptonas de caseína, carne e soja, extrato de levedura, glucose, hemina, vitamina K e L-cisteína; Objetivo – Caldo recomendado para promover o crescimento de bactérias anaeróbias; Procedimento – se o caldo se apresentar turvo significa que houve crescimento bacteriano, assim sendo este deve ser repicado para um meio sólido, como o SCS ou COS.

### **Caldo Selenito:**

Classificação – Caldo de enriquecimento seletivo; Principais constituintes – Selenito de sódio, lactose e tampão fosfato; Objetivo – Selecionar o crescimento da *Salmonella* spp. e da *Shigella* (só algumas espécies), até às 12h após a inoculação do caldo com as fezes, com o intuito de aumentar a probabilidade de recuperação destes microrganismos de entre todos os que existem na flora intestinal. Procedimento – Após as 12h de incubação, o caldo deve ser repicado para um meio sólido, como o Hektoen.



### **Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI):**

Classificação – Caldo de enriquecimento; Principais constituintes – Infusão de cérebro e coração, peptonas, glucose, cloreto de sódio e tampão fosfato dissódico; Objetivo – promover o crescimento de microrganismos não-fastidiosos e fastidiosos, incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias; Procedimento – se o caldo se apresentar turvo significa que houve crescimento bacteriano, pelo que deve ser repicado para um meio sólido, como o COS.

### **Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (SGC):**

Classificação – Meio seletivo; Principais constituintes – Peptonas de caseína e de gelatina, glucose, gentamicina e cloranfenicol; Objetivo – Meio que se destina à cultura de fungos leveduriformes ou filamentosos; Caraterísticas das colónias – Leveduras: colónias pequenas e brancas/beiges (exceção *Rhodotorula* spp. que é cor salmão), semelhantes às colónias bacterianas. Fungos filamentosos: colónias pequenas ou grandes com micélio aéreo e vegetativo.

### **Mycoline:**

Classificação – Meio não seletivo e seletivo; Princípio – O Mycoline é composto por um tubo fechado de plástico transparente, que contém uma lâmina com diferentes meios de cultura de cada um dos lados: meio 1 ou Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (lado amarelo pálido) e meio 2 ou Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (lado amarelo-alaranjado); Principais constituintes – Peptonas derivadas da carne, caseína e soja, extratos de levedura e malte, glucose e cloranfenicol. Ao meio 1 é adicionado gentamicina enquanto ao meio 2 é adicionado actidiona e vermelho de fenol; Objetivo – Meio 1: cultura de fungos leveduriformes, dermatófitos e de outro tipo de fungos (exemplo: saprófitas). Meio 2: promove, essencialmente, o crescimento de fungos dermatófitos, já que estes são resistentes à actidiona. Ao crescerem os dermatófitos alcalinizam o meio, alterando a cor deste para vermelho.

### **Gelose *Mueller Hinton E* (MHE) - E para Etest® & EUCAST®:**

Classificação – Meio não seletivo; Principais constituintes – Extrato de caseína, amido e iões de cálcio, magnésio e zinco; Objetivo – testar a sensibilidade ou resistência de bactérias não-fastidiosas aos antimicrobianos, ou seja, é a gelose recomendada para a realização do teste de *Kirby-Bauer*.

**Gelose Mueller Hinton + 5% sangue de cavalo + 20mg/L  $\beta$ -NAD (MHF):**

Classificação – Meio não seletivo e enriquecido; Principais constituintes – Extrato de caseína, amido, íons de cálcio, magnésio e zinco, sangue de cavalo e NAD (fator V); Objetivo – testar a sensibilidade ou resistência de bactérias fastidiosas aos antimicrobianos. O suplemento de sangue de cavalo e o NAD é que permitem o crescimento de bactérias fastidiosas, como *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Moraxella* spp..

Tabela 11 - Cartas de identificação disponíveis no IPOCFG.

<b>Nome da carta</b>	<b>Carta de identificação para</b>
GN	Bactérias Gram-negativo
GP	Bactérias Gram-positivo
NH	<i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.
ANC	Bactérias anaeróbias e Corinebactérias
YST	Fungos leveduriformes

Tabela 12 - Cartas de antibiograma disponíveis no IPOCFG.

<b>Nome da carta</b>	<b>Carta de antibiograma para</b>
AST-N192	Bacilos Gram-negativo fermentadores
AST-N222	Bacilos Gram-negativo não-fermentadores
AST-P619	<i>Staphylococcus</i> spp.
AST-P586	<i>Enterococcus</i> spp. e <i>Streptococcus agalactiae</i>
AST-ST01	<i>Streptococcus</i> spp.
AST-YST	Fungos leveduriformes