



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Margarida Fernandes Pereira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Valido e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2019

Ana Margarida Fernandes Pereira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Valido e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica
Instituto Português de Oncologia Coimbra Francisco Gentil
Áreas: Microbiologia e Imunologia/Hormonologia
dezembro de 2018 a maio de 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO	3
3. CONTROLO DE QUALIDADE	5
4. HEMATOLOGIA.....	7
5. BIOQUÍMICA	9
6. MICROBIOLOGIA	10
6.1. Processamento das amostras.....	11
6.2. Identificação de microrganismos e Testes de suscetibilidade antimicrobiana.....	27
6.2.1. Identificação de microrganismos	27
6.2.1.1. Provas bioquímicas	28
6.2.1.2. Testes de suscetibilidade auxiliares de identificação	29
6.2.1.3. Analisador <i>Vitek</i> [®] 2 <i>Compact 15</i>	30
6.2.1.4. Sistema de identificação BD BBL Crystal.....	31
6.2.1.5. Testes de Biologia Molecular	32
6.2.2. Testes de suscetibilidade antimicrobiana.....	33
6.2.2.1. Analisador <i>Vitek</i> [®] 2 <i>Compact 15</i>	33
6.2.2.2. TSA manual (Método de Kirby-Bauer).....	33
6.2.3. Pesquisa de ESBL (β -Lactamases de espectro alargado) e Carbapenemases	34
7. IMUNOLOGIA/HORMONOLOGIA.....	36
7.1. Princípios dos métodos bioanalíticos	38
7.2. Métodos de deteção dos imunocomplexos.....	40
7.3. Marcadores tumorais	43
7.3.1. Proteínas	44

7.3.2. Enzimas.....	50
7.3.3. Citoqueratinas	51
7.3.4. Hormonas.....	51
8. CONCLUSÃO.....	55
9. BIBLIOGRAFIA.....	57

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, meu orientador externo, agradeço não só a oportunidade que me deu ao realizar este estágio, mas também por toda a orientação e conhecimento que transmitiu nestes seis meses.

Aos orientadores dos quatro setores por onde passei, obrigada pela disponibilidade e por tudo o que me ensinaram, em especial à Dr^a. Maria Alexandre Mendes e ao Dr. Nuno Cunha, pelo tempo despendido na leitura e correção deste relatório.

À direção do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, representada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa no ano letivo 2017/2018 e grande parte do ano letivo 2018/2019 e pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, nos últimos meses, muito obrigada pela oportunidade que proporcionam a todos os estudantes do mestrado.

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, minha orientadora interna, um especial obrigado pela disponibilidade, pelo tempo despendido na revisão deste relatório e por todas as sugestões e correções sugeridas.

Agradeço imenso aos meus pais e irmão, por estarem sempre presentes e por todo o apoio necessário. Obrigada por me permitirem adquirir todo o conhecimento ao longo do meu percurso como estudante e pela confiança que depositaram em mim, sem nunca duvidar das minhas capacidades.

Às minhas colegas de mestrado que me acompanharam durante estes meses de estágio, Vera Pires e Beatriz Sebastião, muito obrigada por toda a força, pela partilha de dúvidas e conhecimentos e por estarem sempre disponíveis.

Por último, às minhas colegas de casa, Cristiana Fontes, Alexandra Silva, Mariana Ribeiro, Ana Forte, Daniela Henriques e Sofia Sousa, obrigada por fazerem da nossa casa a melhor de Coimbra, pelas gargalhadas e por todo o apoio durante estes anos, especialmente nos últimos seis meses.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

¹²⁵I: Iodo-125

3-MT: “3-Methoxytyramine” (3-Metoxitiramina)

ACTH: “Adenocorticotropic hormone” (Hormona adenocorticotrófica)

AFP: α -fetoproteína

ALT: “Alanine aminotransferase” (Alanina aminotransferase)

AST: “Aspartate aminotransferase” (Aspartato aminotransferase)

ATCC: “American Type Culture Collection”

BAAR: Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

BHI: “Brain-Heart Infusion”

CA 125: “Cancer Antigen 125” (Antigénio carbohidrato 125)

CA 15.3: “Cancer Antigen 15.3” (Antigénio carbohidrato 15.3)

CA 19.9: “Cancer Antigen 19.9” (Antigénio carbohidrato 19.9)

CA 72.4: “Cancer Antigen 72.4” (Antigénio carbohidrato 72.4)

CEA: “Carcinoembryonic Antigen” (Antigénio carcinoembrionário)

CK-MB: “Creatine Kinase-MB” (Creatina cinase-MB)

Cl: Ião cloreto

CLED: “Cistine Lactose Eletrolyte Deficient” (Gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos)

CLIA: “Chemiluminescent Immuno Assay”

CMI: Concentração mínima inibitória

CNA: “Colistin and Nalidixic Acid” (Gelose Columbia com colistina e ácido nalidíxico)

CO₂: Dióxido de carbono

COS: “Columbia agar + 5% Sheep Blood” (Gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro)

DHEA-SO₄: “Dehydroepiandrosterone sulfate” (Sulfato de dehidroepiandrosterona)

ECLIA: “Eletrochemiluminescent Immuno Assay”

EDTA: “Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido etilenodiamino tetra acético)

EMIT: “Enzyme Multiplied Immunoassay Technique”

ESBL: “*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*” (β -Lactamases de espectro alargado)

EUCAST: “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*”

FSH: “*Follicle-Stimulating Hormone*” (Hormona foliculo-estimulante)

GDH: Glutamato desidrogenase

GGT: γ -glutamilttransferase

GN: “*Gram Negative broth*”

GRH: “*Gonadotropin-Releasing Hormone*” (Hormona libertadora de gonadotrofina)

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

H₂S: Sulfeto de hidrogénio

HE-4: “*Human Epididymis Protein 4*” (Proteína epididimal humana 4)

HEK: “*Hektoen Enteric agar*” (Gelose Hektoen)

ID: Identificação

IGF-I: “*Insulin-Like Growth Factor I*” (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I)

INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPOCFG: Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

K⁺: Ião potássio

K₃-EDTA: “*Tripotassium Ethylenediamine tetraacetic acid*” (Ácido etilenodiamino tetra acético tripotássio)

KCS: “*Schaedler broth*” (Caldo Schaedler)

KOH: Hidróxido de potássio

LCR: Líquido cefalorraquidiano

LH: “*Luteinizing Hormone*” (Hormona luteinizante)

LJ: “*Löwenstein-Jensen*”

MHE: “*Muller-Hinton EUCAST® agar*” (Gelose Muller-Hinton)

MHF: “*Muller-Hinton Fastidious agar*” (Gelose Muller-Hinton para microrganismos fastidiosos)

Na⁺: Ião sódio

NAD: “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*” (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina [oxidado])

NADH: “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*” (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina [reduzido])

NaOH: Hidróxido de sódio

NSCLC: “*Non Small Cell Lung Cancer*”

NSE: “*Neuro-Specific Enolase*” (Enolase neuro-específica)

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”

PSA: “*Prostate-Specific Antigen*” (Antigénio específico da próstata)

PTH: “*Parathyroid Hormone*” (Paratormona)

PVX: “*Chocolate agar PolyViteX*” (Gelose chocolate + *PolyViteX*)

RIA: “*Radio Immuno Assay*”

RIQAS: “*Randox International Quality Assessment Scheme*”

SCC: “*Squamous-Cell Carcinoma Antigen*” (Antigénio do carcinoma de células escamosas)

SCLC: “*Small Cell Lung Cancer*”

SCS: “*Schaedler + 5% Sheep Blood agar*” (Gelose *Schaedler* com 5% sangue de carneiro)

SGC: “*Sabouraud Gentamicin and Cloranphenicol*” (Gelose *Sabouraud* Gentamicina Cloranfenicol)

SPC: Serviço de Patologia Clínica

T₃: Triiodotironina

T₄: Tiroxina

TASO: “*Antistreptolysin O Titer*” (Título da anti-estreptolisina O)

TRACE: “*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*”

TSA: Testes de suscetibilidade antimicrobiana

TSH: “*Thyroid-Stimulating Hormone*” (Hormona estimuladora da tiroide)

UFC: Unidades Formadoras de Colónias

VIP: “*Vasoactive Intestinal Peptide*” (Polipeptídeo vasoativo intestinal)

XLD: “*Xylose Lysine Desoxycholate*” (Gelose Desoxicolato-Lisina-Xilose)

β-HCG: “*Human Chorionic Gonadotropin*” (Gonadotrofina coriônica humana)

RESUMO

Este relatório reflete os seis meses de estágio, entre dezembro de 2018 e maio de 2019, no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), enquadrado no Mestrado em Análises clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

As análises clínicas são fundamentais na rotina hospitalar. Todo o percurso que as amostras fazem desde a colheita até à emissão do resultado final, sempre com garantia do controlo da qualidade, tornam-se fundamentais no apoio ao diagnóstico e monitorização da terapêutica do doente oncológico.

Os quatro setores do SPC, Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, apesar de estruturalmente separados, funcionam conjuntamente para a concretização do mesmo objetivo: obter resultados fidedignos, que permitam inferir o estado de saúde do doente, a fim de auxiliar o clínico no diagnóstico e instituição da terapêutica.

O principal objetivo deste relatório é descrever a rotina laboratorial envolvida no processamento das amostras, aprofundando as áreas de Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, atendendo sempre a que a interpretação dos resultados obtidos nos diferentes setores não deve ser realizada de modo independente, a fim de permitir a completa e correta avaliação do doente.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Imunologia/Hormonologia; Microbiologia; Oncologia; Serviço de Patologia Clínica.

ABSTRACT

This report refers to the six months of internship, between December 2018 and May 2019, in the Clinical Pathology Department (SPC) of Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), integrated in the Masters of Clinical Analysis of Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Clinical analyses are essential in the hospital routine. The entire course of the samples, from the collection to the final result, always with quality assurance, is fundamental in supporting the diagnosis and monitoring of cancer patient therapy.

The four sectors of SPC, Hematology, Biochemistry, Microbiology, Immunology/Hormonology, although structurally separated, work together to achieve the same goal: to obtain reliable results, which allow to infer the health status of the patient, in order to assist the clinician in the diagnosis and institution of therapy.

The main goal of this report is to describe the laboratory routine involved in sample processing, given special attention to Microbiology and Immunology/Hormonology, always taking into account that the interpretation of the results obtained in the different sectors should not be performed independently, in order to allow the complete and correct evaluation of the patient.

Keywords: Clinical Analyses; Immunology/Hormonology; Microbiology; Oncology; Clinical Pathology Department.

I. INTRODUÇÃO

O cancro tem uma importância cada vez maior em Portugal. Segundo a Direção Geral de Saúde (2017), ao longo dos últimos anos tem-se assistido a um aumento regular da incidência de cancro no nosso país, a uma taxa constante de aproximadamente 3% ao ano. No entanto, embora surjam cada vez mais casos, fruto do envelhecimento da população e da mudança de estilos de vida, há cada vez mais sucesso no tratamento das doenças oncológicas.

Com o aumento da prevalência das doenças oncológicas, torna-se essencial promover a prevenção, diagnóstico e tratamento das mesmas, nos quais o Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) tem um papel preponderante.

A simples análise de um produto biológico revela-se de extrema importância quando se pretende avaliar o estado do doente, uma vez que a presença do tumor altera determinados parâmetros analíticos. Como tal, o Serviço de Patologia Clínica (SPC), através destas determinações, permite ao clínico direcionar a terapêutica, assumindo-se como uma ferramenta essencial no que respeita à monitorização da doença oncológica.

No IPOCFG são prestados serviços de saúde relacionados com a oncologia, um dos quais, o SPC, que desempenha um papel de extrema importância no que respeita ao diagnóstico e monitorização da doença e da terapêutica a que os doentes estão sujeitos. Aqui são analisados diariamente diversos parâmetros analíticos, em variados tipos de amostras, cuja análise permite inferir sobre o estado de saúde do doente, o que é conseguido por uma equipa de profissionais de diferentes áreas que, em conjunto, permitem a realização de todo este processo.

Durante seis meses, de dezembro de 2018 a maio de 2019, pude acompanhar todo o processo envolvido na análise dos produtos biológicos, desde a sua receção até à obtenção de resultados, nos diversos setores que constituem o SPC do IPOCFG: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia, sendo estas duas últimas valências aprofundadas neste relatório.

A Microbiologia assume uma grande importância no IPOCFG uma vez que a doença oncológica torna os doentes mais suscetíveis a infeções, que devem ser corretamente identificadas a fim de se iniciar a terapêutica antimicrobiana adequada e atempadamente.

Sendo o IPOCFG uma unidade hospitalar especializada no acompanhamento da doença oncológica, a Imunologia/Hormonologia é de grande importância, principalmente no que

respeita ao doseamento dos marcadores tumorais, que permitem avaliar a evolução e resposta terapêutica de um tumor maligno.

Este relatório pretende mostrar parte do que é feito no SPC do IPOCFG, a rotina, os métodos de análise dos produtos biológicos e a forma como os resultados são tratados, no sentido de proporcionar ao doente o diagnóstico adequado, com garantia da qualidade.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O IPOCFG é uma unidade hospitalar que integra o Serviço Nacional de Saúde e é responsável pelo diagnóstico e tratamento da doença oncológica.

O SPC está inserido nesta instituição, sendo dirigido pelo Dr. Frederico Valido, Especialista em Patologia Clínica. Este serviço conta com um fluxo diário de aproximadamente 350 utentes, cujas análises são processadas por uma equipa constituída por médicos, farmacêuticos, biólogos, bioquímicos e técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica.

O SPC possui uma área administrativa onde os utentes são recebidos e onde se fazem os registos, baseado no número de processo único da instituição, a nível informático, no Modulab (*Werfen*), de todos os pedidos de análises, sendo atribuído a cada utente um número, ao qual ficam associadas as diversas análises requeridas pelo médico. A cada utente fica associado um número diário sequencial, constituído por 9 algarismos, que incluem o ano, mês e dia em que a amostra foi colhida e os 3 algarismos finais indicam o número da amostra, sendo que apenas estes últimos variam entre os vários utentes de um determinado dia. Devido à automatização laboratorial é atribuído um código de barras a este número sequencial, permitindo a identificação e processamento das amostras nos diversos equipamentos.

Noutra área do SPC é feita a colheita de amostras de ambulatório, pelos técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, a receção de produtos colhidos pelo utente em casa e de amostras que provêm do internamento.

Após colheita e registo das amostras, estas são encaminhadas para os respetivos setores: Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia.

A fim de aumentar a produtividade e facilitar a análise das amostras, o SPC possui vários equipamentos (Tabela I) que permitem a execução dos testes laboratoriais.

Tabela I. Equipamentos utilizados nos setores de Hematologia, Bioquímica, Microbiologia e Imunologia/Hormonologia do SPC do IPOCFG.

Equipamento	Função
Hematologia	
LH 750 Analyser, Beckman Coulter®	Hemograma
Test 1 BCL, ALI Fax®	Velocidade de sedimentação
ACL TOP® CTS 500, Instrumentation Laboratory	Estudos de hemostase
Cytomics FC500, Beckman Coulter®	Estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo
Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge, WESCOR®	Coloração de esfregaços de sangue periférico e medula óssea
GeneXpert®, Cepheid	Estudos genéticos por reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real
Laborlux S, Leitz	Microscopia ótica
Bioquímica	
Cobas® 6000 c501 Analyser Series Hitachi, Roche® Diagnostics	Autoanalisador
Cobas® 4000 c311, Roche® Diagnostics	Autoanalisador de apoio
ABL 800 FLEX, Radiometer®	Quantificação de cálcio ionizado
Rapidlab® 1265, Siemens	Gasometria
RapidChem™ 744 Na ⁺ K ⁺ Cl ⁻ , Bayer®	Quantificação de iões (confirmação)
Reflotron® Plus, Roche® Diagnostics	Analizador de química seca por refratometria (confirmação)
AQT 90 FLEX, Radiometer®	Autoanalisador para marcadores cardíacos
Microbiologia	
Cobas® u411, Roche Diagnostics	Análise sumária de urina
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Estufa de hemoculturas
Vitek® 2 Compact 15, bioMérieux	Identificação de microrganismos e Testes de suscetibilidade antimicrobiana
GeneXpert®, Cepheid	Estudos genéticos por reação de PCR em tempo real
Miditron® ST, Mannheim Boehringer	Contagem de elementos figurados no sedimento urinário
Câmara de fluxo laminar (Forma Scientific)	
Laborlux K, Leitz	Microscopia ótica
Imunologia/Hormonologia	
Immulate 2000 XPi®, Siemens	Autoanalisador
ADVIA Centaur XP, Siemens	Autoanalisador
Brahms Kryptor®, Termo Fisher Scientific	Autoanalisador
Cobas 6000 e601 Analyser®, Roche	Autoanalisador
Liaison®, DiaSorin	Autoanalisador
Viva-E®, Siemens	Autoanalisador
BN-ProSpec®, Siemens	Nefelómetro
Optilite, Binding Site	Turbidímetro
Hydrasis®, Sebia	Eletroforese em gel de agarose e imunofixação
1470 Wizard Wallac, MediTecno	Contador gama para técnicas manuais com radioisótopos
UniCAP, Termo Fisher Scientific	Autoanalisador
Mago 4, Dia Medix Corporation	Autoanalisador

3. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade constitui uma pequena parte do que é feito no SPC do IPOCFG, no entanto constitui uma das principais preocupações no que respeita à análise e comunicação de resultados em laboratório.

O objetivo de qualquer unidade de cuidados de saúde é diagnosticar corretamente a doença, identificar os fatores responsáveis pela mesma e tomar as ações necessárias para a controlar. Para um diagnóstico correto, a garantia e controlo da qualidade são muito importantes. O propósito do controlo de qualidade é fornecer resultados corretos, confiáveis e em pouco tempo, que possam ser interpretados corretamente, detetando, reduzindo e corrigindo potenciais erros no processo analítico (Rehnuma, Ibrahim e Nasir, 2015).

O controlo de qualidade laboratorial, interno e externo, permite realizar intervenções documentadas e validadas nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Rehnuma, Ibrahim e Nasir, 2015).

O controlo de qualidade interno é efetuado diariamente, antes de se processarem as amostras dos utentes. Nos setores de Hematologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia, utilizam-se controlos de firmas comerciais, que sofrem o mesmo processamento que as amostras dos utentes, e analisam-se os gráficos de *Levey-Jennings*, respeitantes ao controlo, de acordo com as regras de *Westgard*, a fim de determinar se os parâmetros analisados se encontram dentro dos valores de referência. Nos setores de Hematologia e Bioquímica normalmente são utilizados três níveis de cada parâmetro: baixo, normal e alto e na Imunologia/Hormonologia usam-se apenas dois níveis: baixo e alto. Se todas as regras de *Westgard* forem cumpridas, inicia-se o processamento das amostras dos utentes, caso contrário, é necessário aplicar medidas corretivas, como a calibração. Na Microbiologia, em termos de controlo de qualidade interno, é feita mensalmente a inoculação de meios com estirpes comerciais ATCC (*American Type Culture Collection*) conhecidas e são avaliados os resultados.

O controlo de qualidade externo é feito em amostras liofilizadas que são enviadas para o laboratório, sendo processadas tal como as restantes amostras, e os resultados são enviados para a entidade responsável, que irá emitir um relatório final onde se avalia a exatidão dos mesmos, comparando todos os resultados obtidos pelos laboratórios participantes. O SPC do IPOCFG participa em dois programas de avaliação externa da qualidade: o INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), um programa nacional efetuado em todas as áreas,

e o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), um programa internacional realizado na Hematologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia.

O programa de controlo de qualidade externa garante ao laboratório a segurança de que os resultados que ele produz se adequam ao uso clínico, permitindo ao laboratório assegurar que os resultados que reporta são consistentes com os resultados emitidos por outros laboratórios (Badrick, 2008). A periodicidade com que este controlo é feito varia entre os diferentes setores do SPC.

A implementação da qualidade não é uma garantia de que o laboratório está livre de erros, mas minimiza a sua frequência (Rehnuma, Ibrahim e Nasir, 2015).

4. HEMATOLOGIA

O setor de Hematologia está sob orientação da Dr^a. Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada Especialista em Patologia Clínica.

Neste setor realizam-se vários tipos de análises no âmbito da Hematologia, em que a amostra mais frequente é o sangue total e mais raramente aspirados de medula óssea e líquidos biológicos, como o líquido cefalorraquidiano (LCR). O avanço tecnológico possibilitou a automatização deste setor, permitindo que a realização de hemogramas, determinação da velocidade de sedimentação e estudos de hemostase passassem a ser realizadas em equipamentos aumentando a rapidez com que se obtêm resultados.

A partir do sangue total, colhido em tubos com ácido etilenodiamino tetra acético tripotássio (K₃-EDTA) é possível realizar o hemograma, um dos exames mais solicitados, que engloba a análise da série branca, vermelha e plaquetas e, sempre que requerido, reticulócitos. O EDTA é um quelante de cálcio, o qual é necessário para uma ampla variedade de reações enzimáticas da cascata da coagulação, pelo que a eliminação deste elemento previne irreversivelmente a formação de coágulos no tubo de colheita. O EDTA é o anticoagulante de escolha para testes hematológicos, pois permite a melhor preservação dos componentes celulares e morfologia das células sanguíneas (Banfi, Salvagno e Lippi, 2007). A análise dos parâmetros hematológicos é particularmente importante nos doentes oncológicos, que desenvolvem frequentemente anemias, permitindo monitorizar a doença e a resposta aos tratamentos a que são sujeitos.

A partir do sangue total é também determinada a velocidade de sedimentação e realizam-se esfregaços em lâmina, que são posteriormente corados, automaticamente, pela coloração de *Wright-Giemsa*. A visualização microscópica destes esfregaços permite a distinção entre as diversas linhas celulares, contagem celular e observação de características patológicas de leucemias e linfomas.

Distúrbios da coagulação constituem a complicação mais frequente nos doentes oncológicos, apresentando-se com manifestações tromboembólicas, havendo necessidade de realizar estudos de hemostase, a fim de vigiar estes doentes (Zhu *et al.*, 2016). Os estudos de hemostase mais frequentemente realizados na hematologia incluem a determinação do tempo de protrombina, tempo de trombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e D-dímeros. As amostras são colhidas para tubos com citrato de sódio, na proporção de 9:1, e são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, com o objetivo de obter plasma rico em fatores

de coagulação. O citrato de sódio causa uma menor ativação espontânea das plaquetas *in vitro* que o EDTA (Golanski *et al.*, 1996).

Com menor frequência o laboratório de Hematologia recebe esfregaços de medula óssea, preparados imediatamente após punção, e aspirados de medula óssea para preparação de esfregaços no laboratório. Algumas lâminas são coradas automaticamente pela coloração de *Wright-Giemsa* e outras são coradas manualmente pela coloração de *Perls*, para avaliar as reservas de ferro nos eritroblastos.

Recorrendo a estudos genéticos por PCR em tempo real, no sistema *GeneXpert*[®], faz-se a pesquisa do gene de fusão BCR-ABL, que desempenha um papel chave no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. Neste setor faz-se o estudo da imunofenotipagem, por citometria de fluxo, possibilitando o diagnóstico diferencial das doenças linfoproliferativas.

No setor de Hematologia executei o processamento das amostras, incluindo a realização de hemogramas, determinação da velocidade de sedimentação e realização das provas de coagulação, efetuei esfregaços de sangue periférico, observei ao microscópio as diversas linhas celulares características de determinadas patologias e segui a validação de alguns resultados, associando os parâmetros analíticos obtidos com a respectiva doença.

5. BIOQUÍMICA

O setor de Bioquímica está sob responsabilidade do Dr. Luís Nina, Assistente Hospitalar Graduado Especialista em Patologia Clínica. As análises efetuadas neste setor são importantes para a monitorização de determinados órgãos, permitindo avaliar, principalmente, o funcionamento cardiovascular, renal e hepático, revelando-se de grande importância no IPOCFG, uma vez que os doentes oncológicos são sujeitos a tratamentos de quimioterapia e radioterapia que afetam o normal funcionamento dos órgãos.

Neste setor é feito o estudo de parâmetros bioquímicos em diversos tipos de amostras, sobretudo de forma automatizada, sendo a amostra maioritária o soro, obtido por colheita em tubo sem anticoagulante, revestido com sílica e com esferas revestidas com sílica, que permitem ativar a coagulação e fazem uma separação física entre as células e o soro. São ainda realizadas análises em amostras de urina pontual e das 24h, LCR e outros líquidos biológicos.

No soro são realizadas determinações de diversos parâmetros como iões, enzimas, metabolitos, entre outros. No sangue total, colhido para tubos contendo K₃-EDTA como anticoagulante, é feito o doseamento da hemoglobina glicada e a determinação de marcadores cardíacos, utilizados no diagnóstico do enfarte do miocárdio, como a troponina, a mioglobina e a creatina cinase-MB (CK-MB). No sangue total, colhido para tubos contendo heparina como anticoagulante, é doseado o cálcio ionizado.

A análise mais urgente neste setor é a gasometria, que permite avaliar a pressão parcial de gases, determinar o pH, eletrólitos e metabolitos e avaliar o equilíbrio ácido base. A colheita do sangue arterial, para um tubo contendo heparina de lítio equilibrada, é um ato exclusivamente médico e obtém-se resultados em segundos, recorrendo ao sistema automatizado *Rapidlab® 1265*.

No setor de Bioquímica acompanhei a rotina laboratorial, desde o processamento das amostras, à obtenção dos resultados e sua validação, assisti à realização do controlo de qualidade interno, feito diariamente, e análise dos gráficos de *Levey-Jennings*, atendendo às regras de *Westgard*.

6. MICROBIOLOGIA

As infecções nosocomiais constituem uma das principais preocupações em ambiente hospitalar e surgem em pacientes sob cuidado médico hospitalar ou outra unidade de cuidados de saúde e não estava presente na altura da admissão. Com o aumento das infecções, prolonga-se a permanência hospitalar, aumenta a resistência antimicrobiana e aumenta a taxa de mortalidade, tornando-se de extrema importância a detecção precoce do agente microbiológico responsável, que na maioria dos casos é de origem bacteriana, para possibilitar a instituição da terapêutica antimicrobiana adequada o mais rapidamente possível (Khan, Baig e Mehboob, 2017).

O setor de Microbiologia está sob orientação da Dr^a. Maria Alexandre Mendes, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos. Engloba maioritariamente análises bacteriológicas, mas também parasitológicas, micológicas e micobacteriológicas, em diversos tipos amostras como urina (a mais frequente), fezes, sangue, produtos respiratórios (expetorações, lavados e aspirados brônquicos), exsudados purulentos (profundos e superficiais), exsudados vaginais, líquidos pleurais, aspirados ganglionares, LCR, biópsias e pontas de cateter central.

As amostras são processadas de acordo com as análises requeridas, o tipo de amostra e a suspeita de infeção. Na análise dos resultados obtidos é necessário conhecer a microbiota do local de proveniência da amostra, assim como possíveis contaminantes, e proceder à distinção, se possível, entre colonização e infeção. É necessário considerar, também, a quantidade e diversidade de microrganismos encontrados, uma vez que a observação de crescimento microbiano não implica que a amostra seja positiva e em amostras nas quais se observa o desenvolvimento de várias colónias é necessário distinguir se alguma das estirpes detetadas prevalece em relação às outras, o que poderá ser considerado clinicamente relevante, ou se se trata de uma amostra polimicrobiana. Em fluídos estéreis, como sangue ou LCR, a observação do crescimento de microrganismos implica sempre positividade.

O processamento inicia-se com o exame macroscópico, que pretende avaliar se a amostra foi corretamente colhida, transportada, e cumpre os requisitos necessários para a sua análise ou se existe algum motivo que leve à sua rejeição. Neste exame avalia-se a cor e consistência do produto biológico, bem como a presença de sangue, muco, entre outros. A identificação de microrganismos engloba a observação microscópica do produto, seguida da sua sementeira em meio de cultura apropriado e, após incubação, procede-se ao isolamento,

identificação e testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), ambos realizados maioritariamente no analisador *Vitek*[®] 2 Compact 15.

No setor de Microbiologia pude acompanhar a rotina laboratorial, desde a chegada e processamento das amostras, até à obtenção dos resultados. Participei na interpretação, discussão e validação dos mesmos e acompanhei o processamento de amostras do controlo de qualidade interno e externo.

6.1. Processamento das amostras

Urina

O trato urinário é normalmente estéril, mas bactérias da região perianal, principalmente, podem alcançá-lo e causar infeção (Al-Badr e Al-Shaikh, 2013). As infeções do trato urinário são as infeções bacterianas mais comuns no ambiente ambulatorio, abrangendo infeções da uretra (uretrite), bexiga (cistite), ureteres (ureterite) e rins (pielonefrite), surgindo com maior frequência nas mulheres, devido às diferenças anatómicas (Barber *et al.*, 2013).

A urina utilizada para o diagnóstico deverá ser a primeira da manhã, por ser a mais concentrada, sendo que o doente deverá lavar os órgãos genitais com sabão e água e colher o jato intermédio diretamente para um recipiente esterilizado. Outros métodos de colheita incluem punção de cateter urinário, punção supra-púbica e drenagem da nefrostomia/ureterostomia (Fonseca *et al.*, 2004).

O processamento de amostras de urina compreende dois exames: a urocultura e a análise sumária da urina.

Urocultura

A urocultura permite a quantificação dos microrganismos presentes na urina, constituindo a primeira etapa do processamento. A urina é semeada pela técnica quantitativa, em dois meios de cultura: gelose Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos (CLED) e gelose Columbia com colistina e ácido nalidíxico (CNA), utilizando uma ansa calibrada de 10 µL, e incuba-se durante 18 a 24h, a 37°C.

A análise quantitativa é feita no meio CLED, um meio sólido não seletivo e diferencial, que permite a quantificação de colónias e isolamento dos agentes usualmente responsáveis

pela infecção. A deficiência de eletrólitos inibe o “swarming” característico de *Proteus* spp., minimizando a sua proliferação, e a presença de lactose no meio permite distinguir entre fermentadores e não fermentadores, através da alteração de cor do meio devido ao indicador de pH azul de bromotimol (Fonseca *et al.*; 2004). Microrganismos fermentadores da lactose acidificam o meio e este adquire uma cor amarela, enquanto os não fermentadores não alteram a cor do meio, mantendo-se verde/azul.

Uma urocultura é considerada positiva quando a contagem de colónias é igual ou superior a 10^5 unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de urina. Como a sementeira foi preparada com uma ansa de 10 μ L, para se considerar positiva, devem crescer pelo menos 1000 colónias. Se houver predominância de um único tipo de microrganismo, este deve ser identificado, mas se houver mistura de três ou mais, considera-se que a amostra é polimicrobiana (contaminação) e requisita-se nova amostra se clinicamente justificado (Camargo *et al.*, 2001).

O meio CNA é uma gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro e antibióticos (colistina e ácido nalidíxico), que permite diferenciar as colónias bacterianas com base nas reações hemolíticas que elas produzem (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). Este meio de cultura é seletivo para bactérias de Gram positivo, pois contém dois agentes antibacterianos, a colistina e o ácido nalidíxico, que inibem o crescimento das Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp. (Fonseca *et al.*, 2004). A partir da colónia do microrganismo considerado responsável pela infecção, é feita a identificação do tipo de Gram, procedendo-se depois à identificação do microrganismo e ao TSA.

A coloração de Gram é uma coloração diferencial que permite a distinção entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, devido a diferenças na estrutura da parede celular entre estes dois grupos de bactérias. A técnica inicia-se com a adição de um corante básico, o violeta de genciana, e soluto de lugol, ao esfregaço, formando-se um complexo insolúvel violeta cristal-iodo no interior da célula, que é extraído por adição de álcool-acetona (diferenciador) nas bactérias de Gram negativo, o que não acontece nas bactérias de Gram positivo. As bactérias de Gram positivo têm a parede celular mais espessa, constituída principalmente por peptidoglicano e, com a adição do álcool-acetona desidratam, o que leva os poros da parede a fechar, impedindo a saída do complexo violeta cristal-iodo. Contrariamente, nas bactérias de Gram negativo, que possuem uma fina camada de peptidoglicano, o álcool-acetona penetra rapidamente na membrana externa rica em lípidos e extrai o complexo violeta cristal-iodo da célula, deixando estas células incolores, até à adição

do segundo corante, a safranina ou fucsina diluída. Deste modo, após coloração, as bactérias de Gram positivo ficam coradas de roxo-violeta, enquanto que as bactérias de Gram negativo coram de rosa, o que permite a sua diferenciação a nível microscópico. Na observação microscópica é também possível observar a sua morfologia e tipo de agrupamento (Madigan *et al.*, 2009).

Os microrganismos mais encontrados em amostras de urina no SPC do IPOCFG são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. (Figura 1), *Enterobacter* spp. e *Enterococcus faecalis*.



Figura 1. Microrganismos isolados de amostras de urina A- *Escherichia coli*, B- *Klebsiella pneumoniae* e C- *Proteus* spp., em meio CLED (Fonte: Fotos tiradas no SPC do IPOCFG).

Análise sumária da urina

A sumária de urina é constituída pela avaliação semiquantitativa de determinados parâmetros bioquímicos e pela observação microscópica do sedimento.

Recorrendo a tiras impregnadas com reagentes que são mergulhadas em 10 mL de urina não centrifugada avaliam-se determinados parâmetros, como densidade, pH, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubina, no equipamento *Cobas u411*, através da formação de cor decorrente da reação química. A nível macroscópico, é registada a cor e aspeto da urina. A análise microscópica do sedimento urinário (exame direto a fresco) faz-se após centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos e permite a observação de elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros e cristais.

Sangue

O sangue é um produto biológico estéril, como tal, o isolamento de um microrganismo a partir duma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infecção (Fonseca *et al.*, 2004). A obtenção da amostra de sangue é feita por punção venosa, após desinfecção da pele no local da colheita com dois antissépticos diferentes, devendo ser colhidas pelo menos duas amostras (a fim de aumentar a probabilidade de deteção do microrganismo), de cerca de 8 a 10 mL, para garrafas de hemocultura, devendo ser cumprido este volume a fim de evitar falsos positivos.

Para as hemoculturas são utilizadas garrafas que contêm misturas do meio de cultura (meio líquido de tripticase de soja), anticoagulante e resina que reduz os efeitos dos antimicrobianos e outros compostos tóxicos (Kirn e Weinstein, 2013). Após inoculação com a amostra de sangue do doente, as garrafas de hemocultura são colocadas no sistema automatizado BD *Bactec™ 9050 Blood Culture System* e a positividade é detetada pela presença do dióxido de carbono (CO₂) produzido durante o crescimento dos microrganismos, o que eleva o pH, levando a aumentos na fluorescência que são detetados pelo equipamento (Fonseca *et al.*, 2004; Opota *et al.*, 2015).

Se não houver crescimento, as amostras ficam no sistema automatizado durante 7 dias, até serem consideradas negativas para aeróbios e anaeróbios. Para pesquisa de fungos, as hemoculturas permanecem no sistema durante 14 dias e no caso de *Mycobacterium tuberculosis* as hemoculturas incubam durante 42 dias até o resultado ser reportado como negativo.

Os frascos utilizados para a cultura de aeróbios, permitem a deteção de bactérias e fungos leveduriformes. Para pesquisa de anaeróbios, microrganismos fastidiosos e intracelulares, os frascos de hemocultura possuem agentes lisantes. Os frascos para cultura de micobactérias são constituídos por caldo *Middlebrook 7H9*.

Quando uma hemocultura é positiva, efetua-se um exame direto que se cora pela técnica de Gram, para confirmar a presença de bactérias ou fungos e, as morfologias associadas (Opota *et al.*, 2015).

É preparada uma subcultura para gelose Columbia suplementada com 5% sangue de carneiro (COS), pela técnica do esgotamento do produto à superfície do meio sólido. Este é um meio de cultura não seletivo, enriquecido, e altamente nutritivo, que permite a multiplicação e isolamento de microrganismos fastidiosos, sendo adequado para a cultura da maioria das espécies bacterianas e a adição de sangue de carneiro permite a observação da

presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise (Fonseca *et al.*, 2004). Nalgumas bactérias, ocorre a lise completa dos glóbulos vermelhos em torno das colónias (β -hemólise), mas outras provocam apenas a lise parcial das células, causando uma coloração esverdeada em torno das colónias (α -hemólise). Quando as bactérias não têm efeito nos glóbulos vermelhos, ou seja, não são hemolíticas, nenhum halo é produzido em torno das colónias (γ -hemólise) (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). Após incubação a 37°C, durante 24 a 48h, procede-se à identificação e TSA.

Os microrganismos mais frequentemente isolados de hemoculturas no SPC do IPOCFG são enterobactérias como *Escherichia coli*, *Proteus spp.* e *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus* (Figura 2) e leveduras *Candida spp.*. Com alguma frequência são também detetados *Staphylococcus coagulase negativa*, como é o caso de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*, que na maioria das vezes representam uma contaminação com microbiota da pele.

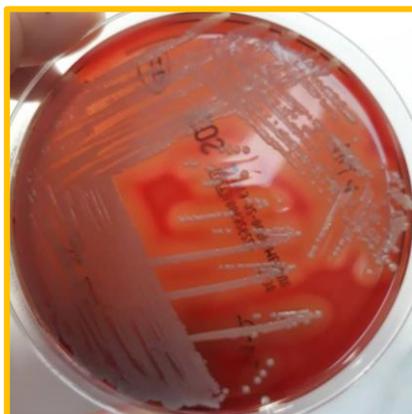


Figura 2. *Staphylococcus aureus* isolado de amostra de sangue, em meio COS (Fonte: Fotos tiradas no SPC do IPOCFG).

Expetoração e outros produtos respiratórios

Quando há suspeita de infeção do trato respiratório inferior são colhidas amostras de origem respiratória para análise no setor de Microbiologia do SPC, como expetoração, lavados e aspirados brônquicos,

A expetoração é a amostra maioritária, devendo ser colhida para um recipiente estéril, preferencialmente a primeira amostra da manhã obtida por tosse profunda, após lavagem da boca com água (Fonseca *et al.*, 2004). Antes de iniciar o diagnóstico é necessário avaliar a qualidade da amostra, para descartar possível contaminação com secreções da orofaringe. Para tal, faz-se uma coloração de Gram de uma porção purulenta do produto, que se observa ao

microscópio ótico em pequena ampliação na objetiva de 10, a fim de quantificar o número de células epiteliais pavimentosas da orofaringe e leucócitos (média por campo). A qualidade da amostra é então avaliada de acordo com os Critérios de Murray-Washington (Tabela II), sendo que apenas devem ser processadas amostras que se enquadrem nos grupos 4 e 5, uma vez que nos restantes grupos, o elevado número de células epiteliais sugere contaminação com secreções da orofaringe.

Tabela II. Critérios de Murray-Washington (Fonte: Fonseca et al., 2004).

	Número de células epiteliais por campo	Número de leucócitos por campo
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10 – 25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10 – 25	25
Grupo 5	< 10	25

Exame bacteriológico e micológico

Uma porção purulenta das amostras respiratórias é semeada, por rotina, nos meios COS, gelose chocolate + *PolyViteX* (PVX), ambos incubados durante 18 a 24h, a 37°C e em duas geloses *Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol* (SGC), uma incubada a 30°C e outra a 37°C. O meio PVX é um meio enriquecido, não seletivo, adicionado de *PolyViteX* que se obtém por aquecimento a 80°C da mistura da gelose Columbia, o que provoca a hemólise dos eritrócitos, enriquecendo a gelose com os fatores X (heme) e V (NAD – dinucleótido de nicotinamida e adenina [oxidado]). Este meio favorece o crescimento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. (Fonseca et al., 2004).

O meio SGC é utilizado para a cultura de fungos, tornando-se mais seletivo pela adição de agentes antimicrobianos (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). A elevada concentração de glucose, que constitui uma fonte de energia para os fungos e a adição dos antimicrobianos gentamicina e cloranfenicol, inibe a maioria das bactérias de Gram positivo e Gram negativo. A incubação é feita em aerobiose a 37°C e o crescimento de leveduras só é valorizado na ausência de crescimento bacteriano. Para a pesquisa de fungos filamentosos, a incubação da gelose SGC é feita durante um mês a 30°C.

Os resultados obtidos nas placas de cultura devem ser sempre acompanhados pelos dados da observação do exame direto corado pela técnica de Gram e após obtenção de cultura pura do microrganismo considerado responsável pela infecção, procede-se à sua identificação e realiza-se o TSA.

Os microrganismos mais frequentemente encontrados em produtos respiratórios no SPC do IPOCFG são *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus* e, mais raramente, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*.

Exame micobacteriológico

Por vezes é também requisitada a pesquisa de micobactérias em produtos respiratórios. Inicialmente é preparado um esfregaço, diretamente a partir do produto, que é corado pela coloração de Kinyoun, uma técnica de coloração a frio, utilizada para a pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) do género *Mycobacterium*. Caracterizam-se pela presença de lípidos únicos na superfície da célula, os ácidos micólicos, covalentemente ligados ao peptidoglicano da parede celular, que lhe conferem uma consistência cerosa e hidrofóbica, o que dificulta a coloração de Gram nas micobactérias (Madigan *et al.*, 2009). A coloração do esfregaço inicia-se com a adição de carbolfucsina (fucsina básica e fenol), que devido à presença de fenol permite que a fucsina básica fique retida na parede celular das micobactérias. Em seguida é feita a descoloração com mistura de ácido clorídrico concentrado e etanol 96%, o que leva a que a carbolfucsina seja retirada dos constituintes da amostra, exceto dos BAAR, e contra-coloração com azul de metileno. As micobactérias apresentam-se coradas de vermelho, sobre um fundo azul, tal como na coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 3).

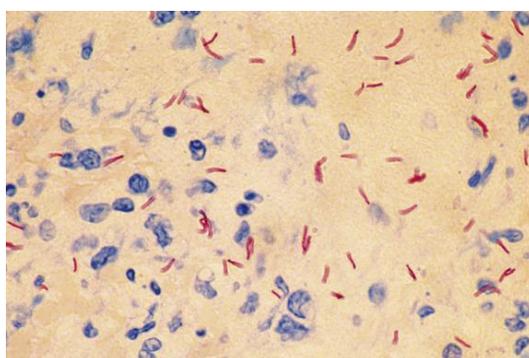


Figura 3. *Mycobacterium tuberculosis* (coloração de Ziehl-Neelsen): elevado número de micobactérias coradas de vermelho (Fonte: Farver e Jagirdar, 2018).

Se solicitado pelo clínico e sempre que se justifique, é feita a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por técnica de Biologia Molecular.

Para além do exame direto do produto é ainda realizado um esfregaço após homogeneização da amostra, processo que consiste na descontaminação, fluidificação e concentração desta. Inicialmente é feita a descontaminação, através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) à amostra, o que permite matar ou reduzir o número de bactérias contaminantes e, recorrendo a N-acetil-L-cisteína e NaOH é feita a fluidificação da amostra, que permite a libertação das micobactérias da mucina/células. O tampão fosfato para a reação. Por fim, recorrendo a centrifugação, as micobactérias são concentradas, a fim de permitir a sua deteção por coloração e em cultura (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). A amostra homogeneizada é ainda semeada no meio *Löwenstein-Jensen* (LJ) e incuba numa atmosfera com elevada humidade, durante cerca de 8 semanas, a 37°C, uma vez que se trata de um microrganismo muito fastidioso. O meio LJ é um meio sólido utilizado para a cultura de *Mycobacterium* spp.. Enquanto a maioria dos meios de cultura contém constituintes que impedem o seu crescimento, o meio LJ é composto por fécula de batata, ovo e glicerol, que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento das micobactérias, a asparagina é utilizada para maximizar a produção de niacina por algumas micobactérias e o verde de malaquite (sensível à luz) inibe o crescimento de outras bactérias que possam estar presentes (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

Como *Mycobacterium tuberculosis* é estritamente aeróbio, é importante que as tampas dos meios de cultura não fiquem totalmente apertadas. Semanalmente, as amostras são observadas para a pesquisa deste microrganismo, cujo crescimento neste meio de cultura se caracteriza pelo aparecimento de colónias típicas, secas, em “couve-flor”. Quando houver crescimento de colónias no meio, independentemente do seu aspeto, é feito um esfregaço que se cora pela coloração de Kinyoun e, se se observar que se trata de um BAAR, procede-se à identificação pelo método de Biologia Molecular para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*. Se positivo, envia-se a amostra para o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, para fazer o TSA; se negativo envia-se para identificação e TSA.

Fezes

Em amostras de fezes faz-se por rotina a pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp.. Caso seja necessária a pesquisa de outros microrganismos, o laboratório

deve ser informado, como é o caso do exame parasitológico e da pesquisa da toxina de *Clostridium difficile*. Devem ser colhidas três amostras de fezes, em dias diferentes, para um recipiente estéril, que deve ser entregue ao laboratório, o mais rápido possível. Amostras contaminadas com urina não devem ser processadas (Fonseca et al., 2004).

Microrganismos como *Clostridium difficile* e *Campylobacter* spp., são os mais frequentemente detetados em amostras de fezes no SPC do IPOCFG.

Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Para o exame bacteriológico de rotina, a amostra deve ser semeada em gelose *Hektoen* (HEK) e gelose Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), pela técnica do esgotamento do produto à superfície do meio sólido e incubada em aerobiose, a 37°C, durante 18 a 24h. Estes meios caracterizam-se pela presença de sais biliares que inibem a maioria dos bacilos de Gram negativo constituintes da microbiota do trato gastrointestinal, permitindo o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.. Os indicadores de pH, fucsina ácida e azul de timol (HEK) e vermelho de fenol (XLD), permitem a distinção entre microrganismos fermentadores da lactose e não fermentadores, como o caso de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). Patogéneos entéricos como *Shigella* spp. não fermentam a xilose presente no meio XLD, pelo que as colónias permanecem incolores. *Salmonella* spp. fermenta a xilose presente no meio e quando esta fonte se esgota, começam a utilizar a lisina presente, devido à lisina descarboxilase produzida, que descarboxila a lisina, alcalinizando o meio, e o indicador de pH muda para vermelho. As colónias de *Salmonella* spp. podem apresentar-se com um centro negro em ambos os meios, resultante do facto desta bactéria ser produtora de sulfeto de hidrogénio (H₂S), que é detetado pelo facto da constituição destes meios incluir o tiosulfato de sódio, que permite a pesquisa de tiosulfato redutase, originando-se H₂S que se combina com o citrato férrico amoniacal, também presente no meio, formando um precipitado negro (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

A amostra de fezes é também semeada em caldo Selenito e caldo *Gram negative broth* (GN) e incubam-se em aerobiose a 37°C durante 12h. Após incubação, repicam-se os caldos de enriquecimento para gelose *Hektoen* e, eventualmente, para outros meios seletivos como o XLD. O selenito de sódio presente no caldo Selenito inibe o crescimento da maioria dos bacilos de Gram negativo e a maioria das Enterobacteriaceae, mas permite o isolamento de *Salmonella* spp. e de algumas estirpes de *Shigella* spp. (Fonseca et al., 2004). O caldo GN contém

na sua constituição citrato de sódio e desoxicolato de sódio (sal biliar) que inibem o crescimento de microrganismos de Gram positivo e a multiplicação inicial dos de Gram negativo não entéricos. O manitol presente no meio promove seletivamente o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., que o metabolizam (Fonseca et al., 2004; Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). Quando se observa turvação do caldo de enriquecimento, deve proceder-se à subcultura em meio sólido, entre 6 a 12h, correspondente ao tempo médio de inibição de outras estirpes, como *Proteus* spp. (Fonseca et al., 2004).

Após incubação é avaliada a presença de colónias não fermentadoras da lactose nas placas de meio de cultura, características de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., que se apresentam incolores no meio de cultura, enquanto que colónias de microrganismos fermentadores, devido à acidificação do meio, apresentam-se com coloração laranja/salmão no meio HEK e com coloração amarela no meio XLD (Figura 4). Quanto às colónias não fermentadoras da lactose, procede-se à sua identificação e, se se tratar de estirpes de *Salmonella* ou *Shigella* procede-se ao TSA.

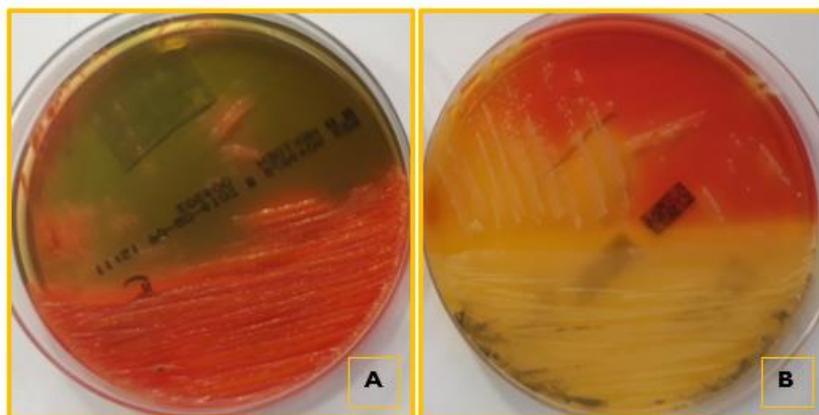


Figura 4. Microrganismos não fermentadores isolados de amostras de fezes: A- Gelose Hektoen e B- Gelose XLD (Fonte: Fotos tiradas no SPC do IPOCFG).

Pesquisa de *Campylobacter* spp.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. nas fezes é feita por um teste imunocromatográfico, RIDA® QUICK *Campylobacter*, que deteta qualitativamente os antígenos de *Campylobacter*. Se este for positivo, deve ser efetuada cultura em gelose Campyloset, seletiva para *Campylobacter* spp., e com incubação em microaerofilia, a 42°C, durante 72h. Após incubação, se houver crescimento bacteriano, deve-se preparar um esfregaço e corar pela coloração de Gram, para

avaliar a presença de bacilos de Gram negativo em forma de “asa de gaivota” ou “S”, característicos do género *Campylobacter* e procede-se ao TSA.

Pesquisa de toxina de *Clostridium difficile*

A infeção por *Clostridium difficile* é resultado maioritariamente da exposição a antibióticos que alteram a microbiota normal do intestino, permitindo que esta bactéria prolifere no cólon e produza toxinas. A infeção caracteriza-se por diarreia e colite pseudomembranosa, devido à libertação de duas exotoxinas: a toxina A (“enterotoxina”) que aumenta a permeabilidade intestinal e secreção de fluídos; a toxina B (“citotoxina”) que provoca grande inflamação do cólon (Ofosu, 2016).

A pesquisa da toxina de *Clostridium difficile* é feita apenas em fezes diarreicas e de acordo com a norma 19/2014 da Direção-Geral da Saúde de 24/3/2015. Inicialmente, através de um teste imunocromatográfico, o RIDA® QUICK *Clostridium difficile* GDH, pesquisa-se a glutamato desidrogenase (GDH), uma proteína da parede celular que é produzida em grandes quantidades pela bactéria, muito superiores quando comparadas às toxinas (Heinlen e Ballard, 2010). Se este teste for negativo, dá-se o resultado como negativo para *Clostridium difficile* mas se for positivo, procede-se à pesquisa da toxina B por PCR em tempo real, no equipamento GeneXpert®. Se a pesquisa das toxinas for positiva, o resultado considera-se positivo para *Clostridium difficile* produtor de toxina, caso contrário, dá-se o resultado como equívoco e, se houver forte suspeita clínica, repete-se a colheita após 24h.

Exame micológico

É também realizado o exame micológico, em que o produto é semeado em gelose SGC, sempre que haja forte suspeita e na ausência de crescimento bacteriano total. É feita a pesquisa de fungos leveduriformes, uma vez que como consequência da antibioterapia, a microbiota bacteriana intestinal é inibida e o crescimento de leveduras é então favorecido.

Exame parasitológico

O exame parasitológico de fezes é feito macroscópica e microscopicamente. A nível macroscópico é registada a consistência da amostra, a presença de restos alimentares e a presença de elementos anormais, como é o caso de sangue, muco ou vermes. A nível microscópico, inicialmente é feito o exame direto a fresco, entre lâmina e lamela, após adição de soluto de lugol. Em seguida, é feita a concentração da amostra, pelo método de Ritchie (Ritchie, 1948), que permite concentrar os elementos parasitológicos no sedimento que é posteriormente observado. Com a objetiva de 10, procuram-se estruturas parasitárias, ovos e larvas e com a objetiva de 40, pesquisam-se ovos e quistos.

Ponta de cateter central

Infeções da corrente sanguínea relacionadas com o uso de cateter são um grave problema clínico, que tem aumentado nos últimos anos devido ao frequente uso de cateteres intravasculares em unidades de cuidados intensivos, apresentando-se como uma causa comum de bacteriemia e sepsis (Kumar *et al.*, 2014). Quando se suspeita que o cateter é fonte de infeção, este deve ser retirado e analisado microbiologicamente. A confirmação de infeção requer identificação do mesmo microrganismo em cultura pura a partir do sangue e na ponta do cateter (Kumar *et al.*, 2014).

Para tal, deve-se colher assepticamente os 5 cm distais do cateter e é feita cultura do mesmo por um método de referência, a técnica semiquantitativa descrita por Maki, Weise e Sarafin (1977), com um *cut off* de 15 UFC para distinguir contaminação do cateter de colonização significativa (Slobbe *et al.*, 2009).

O cateter é rodado sob a superfície de uma placa de meio COS e é depois mergulhado no meio de enriquecimento *Brain-Heart Infusion* (BHI), um meio de cultura líquido nutricionalmente rico usado para o crescimento de vários microrganismos. Na sua constituição inclui-se uma infusão de cérebro-coração, peptona (proteína), tampão fosfato e uma pequena concentração de dextrose. Os carboidratos fornecem uma fonte de energia rapidamente acessível para muitas bactérias e a adição de sangue e antibióticos (cloranfenicol e gentamicina) permite o isolamento de bactérias exigentes (Fonseca *et al.*, 2004; Forbes, Sahn e Weissfeld, 2007).

A gelose COS e o caldo BHI são incubados a 37°C e observam-se os resultados após 18 a 24 h de incubação. Após incubação, o caldo BHI é repicado para COS e, no caso de haver turvação do meio, que indica que houve crescimento de microrganismos, prepara-se um esfregaço corado pela coloração de Gram. O meio COS semeado a partir da “rodagem do cateter” permite saber quais os microrganismos existentes no seu exterior, enquanto que a placa semeada a partir do meio de enriquecimento indica quais os microrganismos presentes no interior e exterior do cateter. Se o desenvolvimento for superior a 15 UFC na gelose COS semeada a partir da “rodagem do cateter” é de valorizar e deve proceder-se à identificação, tendo em atenção que os resultados obtidos na cultura do cateter devem ser correlacionados com o resultado da hemocultura, visto que em caso de infeção, o mesmo microrganismo deve ser detetado na ponta de cateter e em hemocultura (Fonseca *et al.*, 2004).

Os microrganismos mais frequentemente isolados em pontas de cateter central no SPC do IPOCFG são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* β -hemolíticos, podendo aparecer “contaminantes” da pele como *Staphylococcus coagulase negativa*.

Exsudados purulentos

As amostras de exsudados purulentos podem ser obtidas de modos diferentes, consoante se trate de lesões abertas ou fechadas. No caso de se tratar de uma lesão aberta (exsudado superficial), a amostra é colhida em zaragatoa e transportada ao laboratório em meio de transporte *Stuart*. Caso se trate de uma lesão fechada (exsudado profundo), a colheita é realizada por punção e aspiração com agulha e seringa, após desinfeção da pele, mantendo-se as condições de anaerobiose (Fonseca *et al.*, 2004). Por rotina é feita a análise bacteriológica e micológica para amostras enviadas em zaragatoa, enquanto que para amostras enviadas em seringa é apenas realizada a análise bacteriológica, com pesquisa de anaeróbios. Quando solicitado pelo clínico é também efetuada a análise micobacteriológica, apenas em amostras de abscessos.

Para o exame bacteriológico, por rotina, é feito um exame direto corado pela técnica de Gram a partir do produto e o produto é semeado em COS e PVX, incubando-se os meios a 37°C durante 18 a 24h.

Quando se pretende a pesquisa de anaeróbios, procede-se à sementeira em gelose de *Schaedler* com 5% sangue de carneiro reduzida (SCS) e o caldo *Schaedler* com 5% sangue de

carneiro (KCS) e incuba-se em aerobiose e em anaerobiose a 37°C durante pelo menos 48h e até 5 dias. A gelose SCS é um meio de enriquecimento utilizado para o crescimento de bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, contendo peptonas, extrato de levedura e glucose, sendo enriquecido com vitamina K, sangue de carneiro e hemina (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Este meio possui um agente redutor que vai impedir a formação de espécies reativas de oxigénio, suportando a anaerobiose. A anaerobiose é conseguida utilizando o sistema *GENbag*, que consiste num envelope de plástico transparente (permite avaliar se existe crescimento microbiano, sem necessitar abrir o envelope e comprometer a atmosfera), no qual se coloca um gerador específico da atmosfera que se pretende criar e um indicador que permite controlar se a anaerobiose foi mantida durante a incubação. Após incubação, a gelose SCS e o caldo KCS são observados e se houver turvação no caldo KCS, este é repicado para COS e SCS reduzido, com incubação em aerobiose e anaerobiose e é feito um esfregaço, que é corado pela coloração de Gram.

Para o exame micológico, o produto é semeado meio SGC com incubação em aerobiose, a 37°C durante 18 a 24h, procedendo-se depois à observação e valorização das placas.

Após obtenção de culturas puras do(s) microrganismo(s) considerados responsáveis pela infeção, procede-se à identificação e TSA.

Os microrganismos mais frequentemente isolados em exsudados purulentos no SPC do IPOCFG são enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sendo isolados poucos anaeróbios.

Exsudados vaginais

O exsudado vaginal é obtido recorrendo a uma zaragatoa, que é transportada até ao laboratório em meio de transporte de *Stuart*. É realizado um exame cultural pela sementeira em COS, PVX e SGC. Após obtenção de culturas puras do microrganismo considerado responsável pela infeção, procede-se à identificação e TSA. A valorização clínica das culturas é efetuada de acordo com a informação clínica e o exame direto (Fonseca *et al.*, 2004).

É também realizado um exame direto corado pela técnica de Gram, para avaliar a microbiota existente. O exame direto após coloração de Gram permite a pesquisa de *Gardnerella vaginalis*, através da observação de “*clue cells*”, células epiteliais cobertas por

cocobacilos de Gram variável (Figura 5), e a realização do teste de *Whiff*, que consiste na detecção de um odor característico a peixe após adição de hidróxido de potássio (KOH) 10% à amostra, odor esse que resulta da libertação de aminas produzidas por *Gardnerella vaginalis* (Chen et al., 1979; Da Vila e Barreda, 1985).

A análise da amostra inicia-se com a realização do exame direto a fresco entre lâmina e lamela com 0,9% NaCl, o mais rápido possível, permitindo a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, que possui morfologia e mobilidade características, e de elementos leveduriformes.

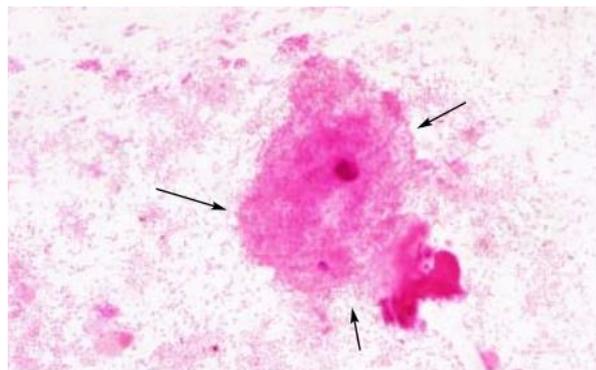


Figura 5. “Clue cells”: Células epiteliais escamosas com os bordos (setas) revestidos por cocobacilos de Gram variável, característicos de *Gardnerella vaginalis*, num exsudado vaginal (Fonte: Barenfanger e Drake, 2001).

Os microrganismos mais comuns em exsudados vaginais no IPOCFG são *Gardnerella vaginalis*, leveduras do género *Candida* e bactérias da família Enterobacteriaceae.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

No IPOCFG, tratando-se de doentes oncológicos, as meningites podem ser divididas em dois tipos: meningite carcinomatosa e meningite microbiana. A meningite carcinomatosa consiste na invasão das leptomeninges e do LCR por células neoplásicas, uma complicação dos tumores sólidos, produzindo uma série de sinais e sintomas neurológicos pleomórficos (Lima et al., 2003). A meningite microbiana é uma inflamação das meninges associada a invasão do espaço subaracnóide, assumindo-se que os microrganismos (bactérias ou fungos) têm acesso ao sistema nervoso central pela corrente sanguínea. É uma emergência médica, que requer diagnóstico imediato a partir da análise bioquímica e microbiológica do LCR, a fim de se proceder ao tratamento o mais rapidamente possível. Os patogéneos mais comuns são *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (Hoffman e Weber, 2009).

O líquido cefalorraquidiano é normalmente estéril, pelo que, qualquer microrganismo detetado deve ser valorizado. A colheita é feita por punção lombar, após desinfecção do local de colheita, devendo ser a amostra imediatamente enviada ao laboratório sem refrigeração (Fonseca *et al.*, 2004). Uma vez que a amostra pode conter poucos microrganismos, deve ser concentrada por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, antes de iniciar o seu processamento. Procede-se à sementeira do sedimento em gelose COS e PVX, pela técnica da inundação, incubando a 37°C, durante 24h. Simultaneamente é preparado um esfregaço do sedimento e cora-se pela coloração de Gram, sendo que qualquer resultado positivo deve ser imediatamente comunicado ao médico. Após incubação e observação das colónias procede-se aos testes de identificação e TSA.

Cryptococcus neoformans é um fungo capsulado responsável por infeções sistémicas devastadoras, geralmente limitadas a pacientes imunocomprometidos, como é o caso dos doentes oncológicos. A infeção ocorre inicialmente nos pulmões, mas rapidamente se dissemina para o cérebro e meninges (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Pelo exposto, a amostra é também semeada na gelose SGC e feita uma preparação em lâmina com tinta da china para permitir a pesquisa da cápsula característica deste microrganismo ao microscópio.

Tal como nas amostras respiratórias para pesquisa de fungos filamentosos as amostras incubam em gelose SGC durante 4 semanas a 30°C.

Raspados de fâneros

Raramente, o laboratório de Microbiologia do SPC recebe raspados de fâneros (unhas, pele, cabelos) entre outros, para realização de exame micológico.

O processamento da amostra inicia-se com o exame cultural, pela sementeira em SGC (25°C e 30°C) e Mycoline (25°C). Paralelamente é efetuado um exame direto a fresco com adição de hidróxido de sódio 10% (NaOH) para raspados de pele e NaOH 30% para raspados de cabelos e unhas, entre lâmina e lamela, para pesquisa de fungos. Se forem detetadas hifas é comunicado ao médico para que se inicie a terapêutica antifúngica assim que possível. Se a cultura for negativa e o exame direto a fresco também, a amostra incuba durante 4 semanas; caso a cultura seja negativa, mas o exame direto a fresco seja positivo, incuba durante 8 semanas, com observação semanal durante a incubação para ver se surge crescimento.

Quando na gelose SGC se deteta crescimento de fungos leveduriformes procede-se à sua identificação no analisador *Vitek® 2 Compact 15*. Se houver crescimento de fungos filamentosos, é feita uma preparação entre lâmina e lamela com azul de lactofenol, pela técnica da fita cola. A observação das estruturas do fungo, nomeadamente a existência de hifas septadas ou asseptadas, a presença de esporos, o tipo de conidiogénese (microconídeos ou macroconídeos), entre outras características permitem auxiliar a identificação. Existem características morfológicas dos fungos, quando em cultura, como o seu aspeto ou a cor (verso e reverso), assim como a temperatura mais favorável ao crescimento, entre outras, que auxiliam na identificação do fungo. Para valorizar leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos é necessário pedir mais amostras.

O sistema Mycoline consiste numa lâmina que contém gelose *Sabouraud* Gentamicina Cloranfenicol de um lado e gelose *Sabouraud* Cloranfenicol Actidiona do outro lado, dentro de um tubo fechado, permitindo a cultura de leveduras, dermatófitos e outros fungos. A gelose *Sabouraud* Gentamicina Cloranfenicol é seletiva para todos os fungos e impede o crescimento bacteriano e, a conjugação com a gelose *Sabouraud* Cloranfenicol Actidiona permite o isolamento de dermatófitos, já que estes crescem em ambos os meios, enquanto que fungos saprófitas apenas crescem na ausência de actidiona (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Os dermatófitos mais frequentemente detetados no SPC do IPOCFG são *Trichophyton rubrum* e mais raramente *Trichophyton mentagrophytes*.

6.2. Identificação de microrganismos e Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Os microrganismos isolados considerados responsáveis pela infeção devem ser identificados e deve-se proceder ao TSA, ambos realizados automaticamente e em simultâneo no analisador *Vitek® 2 Compact 15* para a maioria dos casos. O tipo de cartas *Vitek® 2 ID/AST* a utilizar é decidido atendendo ao aspeto das colónias e recorrendo a provas de identificação manuais, que ajudam a orientar a escolha.

6.2.1. Identificação de microrganismos

A identificação dos microrganismos inicia-se com a observação das colónias presentes nos meios de cultura, atendendo ao seu aspeto (forma, dimensão, elevação, bordos, produção de

pigmento), odor, presença ou ausência de hemólise, entre outras características que permitem uma identificação presuntiva. Apesar de orientar a identificação, esta identificação preliminar não é suficiente, podendo ser necessário realizar a coloração de Gram (a partir das colónias) e fazer algumas provas bioquímicas e testes de suscetibilidade auxiliares de identificação, descritos de seguida, que permitem orientar a escolha das cartas para as provas de identificação.

6.2.1.1. Provas bioquímicas

Teste da catalase

O teste da catalase permite detetar a presença desta enzima, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em oxigénio e água, distinguindo entre *Staphylococcus* spp. (catalase positiva) e *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., ambos catalase negativa. Consiste na adição de uma gota de H_2O_2 à colónia em estudo, sobre uma lâmina de vidro, observando-se a produção de efervescência (formação de bolhas de oxigénio), que evidenciam a presença da enzima (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Teste da oxidase

O teste da oxidase permite a distinção entre as bactérias da família Enterobacteriaceae, que são oxidase negativa, e outros bacilos de Gram negativo, oxidase positiva, nomeadamente Pseudomonaceae.

O estudo da presença da enzima citocromo oxidase tem por base a utilização do substrato tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato 1% (reagente de Kovac) que, na presença da enzima, é convertido a indofenol, um produto final corado de roxo escuro, indicando positividade do teste (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007). Recorrendo a uma tira comercial e, com uma ansa não metálica, coloca-se a colónia a testar, observando-se se ocorre formação de cor roxo escuro em cerca de 10s, o que indica positividade do teste.

Teste da urease

O teste da urease diferencia *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., urease negativa, de *Proteus* spp., urease positiva, por exemplo, ou *Trichophyton rubrum* (urease negativo) de *Trichophyton mentagrophytes* (urease positiva).

Este teste é utilizado para determinar a capacidade dos microrganismos produzirem a enzima urease, responsável pela hidrólise da ureia, levando à formação de amónia e CO₂. Uma colónia do microrganismo a testar é inoculada em meio de ureia e incuba-se a 37°C durante 18 a 24h. Se o microrganismo for produtor de urease irá formar-se amónia que alcaliniza o meio. A alteração no pH é detetada pela mudança de cor do indicador (vermelho fenol) de amarelo para magenta (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

6.2.1.2. Testes de suscetibilidade auxiliares de identificação

Teste de suscetibilidade à optoquina

A optoquina inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição da cultura em meio COS, igual ou superior a 19 mm, o que permite distingui-lo de outros *Streptococcus* spp. resistentes à optoquina (Fonseca et al., 2004).

É preparada uma suspensão de densidade 0,5 McFarland a partir do microrganismo que se pretende identificar, semeia-se em meio de cultura apropriado ao seu crescimento, pela técnica da sementeira em toalha e coloca-se o disco de optoquina no centro da placa, incubando a 37°C, durante 18 a 24h. A presença de halo de inibição após incubação indica a presença de *Streptococcus pneumoniae*.

Teste de suscetibilidade à vancomicina

Quando a coloração de Gram suscita dúvidas, não sendo possível determinar se a bactéria é de Gram positivo ou de Gram negativo, recorre-se ao teste de suscetibilidade à vancomicina. A maioria das bactérias de Gram positivo são suscetíveis à vancomicina, um agente antimicrobiano que atua na parede celular bacteriana, enquanto as bactérias de Gram negativo são intrinsecamente resistentes. Como tal, qualquer zona de inibição em torno do

disco de vancomicina, após incubação, é usualmente indicativo de microrganismo de Gram positivo (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Teste de suscetibilidade ao metronidazol

O teste de suscetibilidade ao metronidazol distingue bactérias aeróbias (resistentes) de anaeróbias (sensíveis). A atividade antibacteriana do metronidazol requer a redução sob condições de baixo potencial redox, como as que se encontram em ambientes anaeróbios, o que faz com que este seja o agente mais potente contra bactérias anaeróbias. (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

É preparada uma suspensão de densidade 0,5 McFarland a partir do microrganismo que se pretende identificar, semeia-se em meio SCS, adiciona-se o disco de metronidazol no centro da placa e incuba-se em anaerobiose a 37°C, durante 24 a 48h. A presença de halo de inibição em torno do disco indica que o microrganismo é anaeróbio.

6.2.1.3. Analisador Vitek® 2 Compact I5

A identificação dos microrganismos no analisador *Vitek® 2 Compact I5* é feita utilizando as cartas de identificação (ID) (Tabela III).

A suspensão bacteriana é preparada em 3 mL de solução salina, com uma turvação padronizada com a escala de McFarland (Tabela III). A suspensão deve também ser semeada em meio COS (para identificação de bactérias de Gram positivo), em meio CLED (para identificação de bactérias de Gram negativo), em meio SGC (para identificação de leveduras), em meio PVX (para a identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*) ou em meio SCS (para anaeróbios e *Corynebacterium* spp.), funcionando como controlo ID, a fim de avaliar a pureza da suspensão microbiana preparada para a identificação. As cartas ID são constituídas por 64 poços que contêm substratos, que vão ser preenchidos com o inóculo, ocorrendo reações colorimétricas que permitem a identificação dos microrganismos pela sua capacidade de utilização dos substratos.

Tabela III. Cartas de ID e TSA a utilizar para os diversos microrganismos, com indicação da turvação McFarland aconselhável para preparação da suspensão.

Carta ID	Turvação McFarland	Microrganismo	TSA	
GN	0,6 – 0,63	Gram negativo	<i>Enterobacteriaceae</i>	AST 355
			<i>Pseudomonaceae</i>	AST 373
GP	0,6 – 0,63	Gram positivo	<i>Staphylococcus</i> spp.	AST 648
			<i>Streptococcus</i> spp.	AST 586 (β e γ hemolíticos)/ AST ST-03 (α hemolíticos)
			<i>Enterococcus</i> spp.	AST 586
YST	1,8 – 2,2	Leveduras	AST YS08	
ANC	2,7 – 3,3	Microrganismos anaeróbios <i>Corynebacterium</i> spp.		
NH	2,7 – 3,3	<i>Neisseria</i>		
		<i>Haemophilus</i>		
		Microrganismos fastidiosos		

6.2.1.4. Sistema de identificação BD BBL Crystal

O sistema de identificação BD BBL Crystal é utilizado para identificação de bactérias de Gram positivo, sendo constituído por testes cromogénicos e fluorogénicos. No setor de Microbiologia do SPC este sistema de identificação é utilizado para identificar bactérias de Gram positivo para as quais não existe carta de ID no *Vitek® 2 Compact 15* ou sempre que existirem dúvidas na identificação de um microrganismo de Gram positivo.

Este sistema é constituído por poços que contêm substratos desidratados, que são rehidratados pela suspensão bacteriana adicionada. Em determinados poços, a degradação dos substratos é avaliada macroscopicamente pela alteração de cor, enquanto noutros, o resultado é detetado por leitura de fluorescência. A conjugação destes resultados permite a obtenção de um bionúmero com 10 dígitos, que permite a identificação da bactéria recorrendo a um *software* da casa comercial.

6.2.1.5. Testes de Biologia Molecular

A Microbiologia clínica tem vindo a utilizar testes de Biologia Molecular, baseados em sequências de ácidos nucleicos, altamente sensíveis, específicos e rápidos, fornecendo resultados em poucas horas com particular utilidade para microrganismos difíceis de crescer em cultura ou fastidiosos/infeções graves. Permitem ao clínico uma resposta rápida na avaliação das opções terapêuticas, poupando tempo precioso no caso de infeções que ameaçam a vida (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

No setor de Microbiologia do SPC utiliza-se o sistema GeneXpert® para realizar os testes moleculares, através de uma reação de PCR em tempo real, o que permite que um resultado positivo seja rapidamente observado (Tabela IV).

Tabela IV. Testes de biologia molecular realizados no sistema GeneXpert®.

Teste	Amostra	Deteção
Xpert MTB/RIF	Expectoração	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex; Mutações no gene <i>rpoB</i> (resistência à rifampicina)
Xpert Clostridium difficile	Amostras fecais não formadas	Genes codificantes das toxinas de <i>Clostridium difficile</i> (toxina B, toxina binária, ribotipo hipervirulento O27-tcdC)
Xpert MRSA/SA BC	Hemoculturas positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente (MRSA)
Xpert Carba-R	Zaragatoa com amostra retal	Genes associados à resistência a carbapenemos: OXA-48; VIM; KPC; NDM; IMP-I

6.2.2. Testes de suscetibilidade antimicrobiana

6.2.2.1. Analisador Vitek® 2 Compact 15

Neste equipamento são também feitas as cartas TSA (Tabela III) a fim de determinar a suscetibilidade dos microrganismos. A partir da suspensão preparada para a identificação dos microrganismos pipetam-se 145 µL (Gram negativo) ou 280 µL (Gram positivo e leveduras) para um tubo contendo 3 mL de solução salina, colocando-se esta suspensão em contacto com a carta TSA.

As cartas TSA contêm poços com concentrações específicas de antibióticos e são incubadas num compartimento de temperatura controlada. O equipamento efetua leituras óticas a cada 15 minutos, a fim de medir a quantidade de luz transmitida através de cada poço, incluindo um poço de controlo do crescimento. É feita uma análise algorítmica do crescimento em cada poço, a fim de determinar a concentração mínima inibitória (CMI) a partir de diluições sucessivas (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

O analisador identifica os fármacos para os quais o microrganismo é sensível, resistente ou intermédio, de acordo com as normas da EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

6.2.2.2. TSA manual (Método de Kirby-Bauer)

O TSA pode ser feito manualmente, quando não existem cartas TSA para o analisador Vitek® 2 Compact 15 como acontece para microrganismos fastidiosos (anaeróbios, *Corynebacterium spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*) ou sempre que o resultado obtido no analisador suscitar dúvidas ou necessitar confirmação. É preparada uma suspensão bacteriana diretamente a partir das colónias em meio não seletivo e com menos de 48h de incubação, com uma densidade de 0,5 McFarland. A suspensão é semeada em gelose *Muller-Hinton* (MHE) ou gelose *Muller-Hinton* para microrganismos fastidiosos (MHF), pela técnica da sementeira em toalha, e aplicam-se os discos de antibiótico, incubando-se a 37°C, durante 16 a 20h, de acordo com os procedimentos EUCAST.

A gelose MHE é um meio não seletivo que se utiliza essencialmente para o estudo da suscetibilidade a antimicrobianos (Fonseca *et al.*, 2004). Como este meio contém infusão animal, extrato de caseína e amido, suporta o crescimento da maioria dos microrganismos (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). A adição de certos suplementos e substituições, como a

adição de 5% de sangue de cavalo é necessário para testar microrganismos fastidiosos (MHF) (Forbes, Sahm e Weissfeld, 2007).

Após incubação, medem-se os halos de inibição, que devem ser interpretados de acordo com as normas EUCAST.

6.2.3. Pesquisa de ESBL (β -Lactamases de espectro alargado) e Carbapenemases

A aquisição de enzimas que inativam diretamente antibióticos é um dos primeiros mecanismos de resistência identificados nas bactérias e é uma estratégia de sucesso utilizada por muitos microrganismos para sobreviver à ação de antibióticos (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Como exemplo destas enzimas incluem-se as β -lactamases de espectro alargado (ESBL) e as carbapenemases que no SPC do IPOCFG são usualmente pesquisadas para Enterobacteriaceae.

Os β -lactâmicos são o maior grupo de antibióticos, constituído pelas penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenemos (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012). O substrato das β -lactamases é o anel β -lactâmico, que é seletivamente hidrolisado pelas β -lactamases, ficando inativo. As ESBL são β -lactamases de espectro alargado, que diferem das outras β -lactamases numa ou mais substituições aminoacídicas próximo do local reativo da enzima, sendo capazes de utilizar mais substratos e aumentar a afinidade para a molécula de antibiótico alvo (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). As ESBL são capazes de hidrolisar especificamente todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenemos, e são inibidas pelo ácido clavulânico (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012).

A resistência aos carbapenemos ocorre por dois mecanismos principais: aquisição de genes de carbapenemase, que codificam enzimas capazes de degradar os carbapenemos; diminuição do aporte de antibióticos por uma deficiência qualitativa e/ou quantitativa na expressão de porinas em associação com sobreexpressão de β -lactamases que possuem fraca afinidade para os carbapenemos. As carbapenemases inativam os carbapenemos e, dependendo da enzima, também podem inativar outros tipos de β -lactâmicos (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012).

A fim de testar se um microrganismo é produtor de ESBL (Figura 6), prepara-se um inóculo (0,5 McFarland), e pelo método de Kirby-Bauer semeia-se pela técnica da sementeira em toalha em gelose MHE, e adiciona-se os discos de antibióticos a testar, nomeadamente

cefotaxima, amoxicilina + ácido clavulânico e ceftriaxona, sendo que o disco de amoxicilina + ácido clavulânico é colocado no centro da placa e os outros dois são colocados a exatamente 20 mm deste. Se houver sinergismo entre os antibióticos, o resultado é dado como positivo para ESBL (Figura 6-B). Na mesma placa é ainda colocado um disco de faropenemo (carbapenemo), afastado dos restantes, a fim de determinar se o microrganismo é resistente ou sensível, dependendo respetivamente da ausência ou presença de halo de inibição. A leitura e interpretação dos resultados é feita após incubação a 37°C durante 18h.

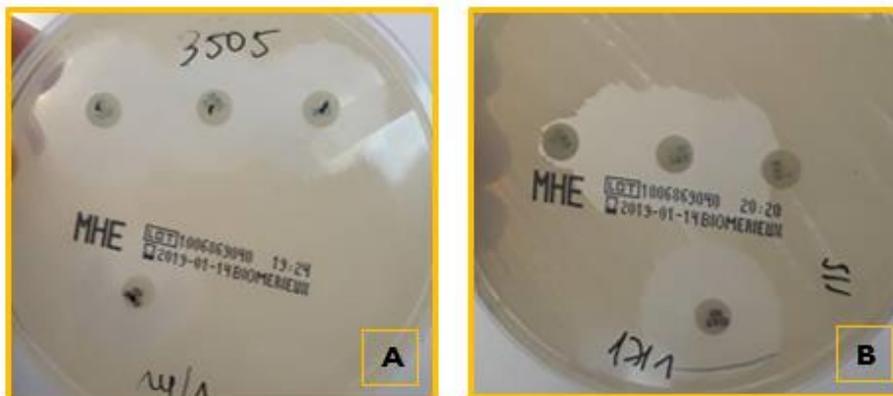


Figura 6. Microrganismos: Não produtor de ESBL e não produtor de carbapenemases (A) e Produtor de ESBL e não produtor de carbapenemases (B), em meio MHE (Fonte: Fotos tiradas no SPC do IPOCFG).

7. IMUNOLOGIA/HORMONOLOGIA

O setor de Imunologia/Hormonologia está sob responsabilidade do Dr. Nuno Cunha, Licenciado em Bioquímica, Técnico Superior de Saúde, Especialista em Análises Clínicas.

Neste setor, existem várias técnicas manuais, cuja deteção é feita maioritariamente por técnicas radioativas (Tabela V).

Tabela V. Parâmetros analisados no setor de Imunologia/Hormonologia por técnicas manuais, nas respetivas amostras.

Amostra	Parâmetros analisados
Soro	Testosterona livre; 17α -hidroxiprogesterona; DHEA (Dehidroepiandrosterona); Aldosterona; Polipeptídeo pancreático.
Plasma	Glucagon; Metanefrinas; Normetanefrinas; 3-MT (3-metoxitiramina); VIP (Peptídeo vasoativo intestinal).
Urina	Iodo; Metanefrinas; Normetanefrinas; Ácido vanilmandélico; Ácido 5-hidroxi-indolacético.

Contudo, a maioria das análises são realizadas de forma automatizada (Tabela VI), com base em imunoensaios, como é o caso do doseamento de marcadores tumorais (hormonas, proteínas, enzimas), marcadores da função cardíaca, pesquisa de autoanticorpos e doseamento de fármacos. Estão também incluídas neste setor a eletroforese das proteínas séricas (proteinograma), das isoenzimas da fosfatase alcalina e da lactato desidrogenase, e das hemoglobinas, assim como imunofixações das proteínas séricas e urinárias.

Tabela VI. Parâmetros analíticos doseados nos diversos equipamentos do setor de Imunologia/Hormonologia.

Equipamento	Princípio	Parâmetros analisados
Immolute 2000 XPI®, Siemens	Quimioluminescência	ACTH; α -fetoproteína; CEA; Eritropoietina; PSA total; PSA livre; HCG total; Anticorpos estimuladores da tiroide; Anticorpos anti-tiroglobulina; Anticorpos anti-peroxidase; Androstenediona; GRH; IGF-I; Gastrina; Calcitonina; β_2 -microglobulina.
ADVIA Centaur XP, Siemens	Quimioluminescência	IgE total; 25 OH-Vitamina D total; Ferritina; Troponina I de alta sensibilidade; DHEA-SO ₄ ; Progesterona; Estradiol; PTH; LH; FSH; TSH.
Brahms Kryptor®, Termo Fisher Scientific	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)</i>	CA 15.3; CA 125; Cromogranina A; NSE; Procalcitonina; SCC.
Cobas 6000 e601 Analyser®, Roche	Eletroquimioluminescência	CA 19.9; CA 72.4; Cortisol; Testosterona total; CA 125, CYFRA 21.1; HE-4; Peptídeo libertador de pró-gastrina; T ₃ e T ₄ livre e total; CA 72.4; Anticorpos anti-recetores da TSH; Ácido fólico; Vitamina B12.
Liaison®, DiaSorin	Quimioluminescência	Renina; Proteína S-100 B.
Viva-E®, Siemens	<i>Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)</i>	Ácido valpróico; Carbamazepina; Fenitoína; Digoxina; Vancomicina; Metotrexato; Fenobarbital; Gentamicina.
BN-ProSpec®, Siemens	Nefelometria	Imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM); Proteína C reativa; Transferrina; Complemento C3 e C4; Fator reumatoide; haptoglobina; α 1-antitripsina; ceruloplasmina; homocisteína.
Optilite, Binding Site	Turbidimetria	Cadeias leves livres Kappa e Lambda.

As amostras analisadas são soro, plasma e urina pontual e das 24h. O soro é a amostra mais frequente e é obtido por colheita do sangue para tubos revestidos com sílica e que contêm um gel separador, sem anticoagulante, enquanto que o plasma é obtido por colheita para tubos contendo K₃-EDTA como anticoagulante. Ambas as amostras são centrifugadas a

2000 g, durante 10 minutos para obtenção da amostra final. Alguns parâmetros são doseados em plasma refrigerado (6 a 8°C), como é o caso da hormona adenocorticotrófica (ACTH) e das metanefrinas e normetanefrinas plasmáticas. A urina das 24h é homogeneizada, regista-se o seu volume e centrifuga-se uma alíquota. Com menor frequência, faz-se a determinação do cortisol livre, a partir de amostras de urina ou mais raramente saliva e quantificam-se a tiroglobulina e a calcitonina em biópsias de agulha fina de aspirados de gânglios cervicais e mediastínicos.

As amostras analisadas nos equipamentos automatizados seguem uma ordem pré-definida, após centrifugação, que vem indicada na etiqueta identificadora da amostra e que depende das análises a realizar, podendo não incluir o percurso completo: a amostra é colocada no *VersaCell*, que encaminha as amostras para o *Immulite XPi* e/ou *Centaur XP*, depois seguem para o *Kryptor*, *COBAS e601* e, consoante os restantes parâmetros a analisar, poderão ainda ser encaminhados para o *BN ProSpec*, *Liaison*, *Hydrasis* e/ou *Optilite*.

Na imunologia executei toda a rotina, desde a receção das amostras à sua distribuição pelos diversos equipamentos, acompanhei e realizei diversas técnicas manuais, como a determinação da testosterona livre, aldosterona, 17 α -hidroxiprogesterona, ácido 5-hidroxi indolacético, iodo urinário, peptídeo intestinal vasoativo, polipeptídeo pancreático, metanefrinas e normetanefrinas plasmáticas e urinárias, ácido vanilmandélico na urina das 24h, assim como eletroforese e imunofixação das proteínas plasmáticas e urinárias e acompanhei a validação de alguns resultados.

7.1. Princípios dos métodos bioanalíticos

Os imunoensaios estão na base das determinações efetuadas neste setor e são métodos bioanalíticos em que a quantificação do analito depende da reação entre um antígeno (analito) e um anticorpo (Darwish, 2006). Estes métodos de medição de analitos biológicos oferecem resultados específicos e sensíveis e são relativamente fáceis de usar, envolvendo duas etapas principais: a reação e a deteção (Slagle e Ghosn, 1996). Existem dois tipos de imunoensaios, os competitivos e os não competitivos ou *sandwich*, que culminam na deteção do complexo antígeno-anticorpo formado.

Imunoensaios competitivos

Nos imunoensaios competitivos (Figura 7), o analito de interesse (do doente) não marcado compete com uma quantidade constante de um antígeno semelhante, marcado, por uma quantidade limitada de um anticorpo específico. O analito a medir e o antígeno marcado são simultaneamente adicionados ao anticorpo específico pelo qual competem e a reação atinge o equilíbrio, segundo a lei da ação de massas, sendo que a quantidade de complexo antígeno-anticorpo marcado é inversamente proporcional à quantidade do analito de interesse presente na amostra (Slagle e Ghosn, 1996).

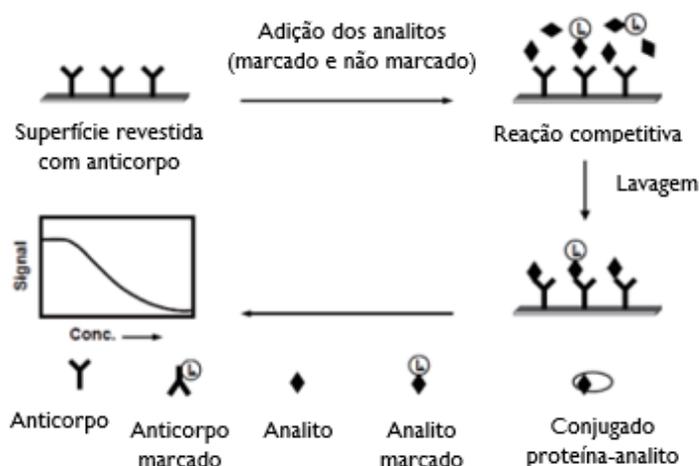


Figura 7. Diagrama esquemático de imunoensaios competitivos (Fonte: Darwish, 2006).

Imunoensaios não competitivos

Em imunoensaios não competitivos ou *sandwich* utilizam-se dois anticorpos, um marcado e outro não marcado, e fixo a uma superfície sólida (Figura 8). Os antígenos do doente vão-se ligar ao anticorpo não marcado e ocorre posteriormente a ligação do segundo anticorpo marcado. A quantidade de anticorpo marcado ligado, é diretamente proporcional à quantidade de analito na amostra (Slagle e Ghosn, 1996).

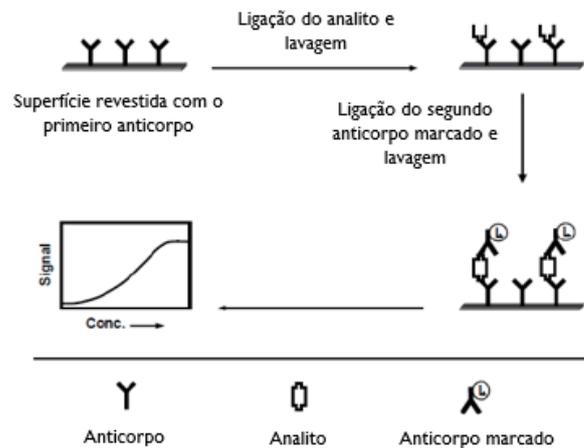


Figura 8. Diagrama esquemático de imunoenaios não competitivos (Fonte: Darwish, 2006).

Os imunoenaios não competitivos têm maior sensibilidade, precisão e linearidade, no entanto, o analito a medir deve ser suficientemente grande para ter pelo menos dois epítopos a serem capturados, o que dificulta a detecção de moléculas de baixo peso molecular (Liu *et al.*, 2018).

7.2. Métodos de detecção dos imunocomplexos

CLIA (Chemiluminescent Immuno Assay)

A quimioluminescência (Figura 9) é o princípio base do *Immulate 2000 XPI*[®], *ADVIA Centaur XP* e do *Liaison*[®]. Utilizam moléculas luminescentes como marcador da reação química que ocorre entre o antígeno e o anticorpo, havendo emissão de luz quando ocorrem transições eletrônicas do estado excitado para o estado fundamental, que é detetada e medida por um fotomultiplicador (Cinquanta, Fontana e Bizzaro, 2017).

Os métodos de quimioluminescência podem ser diretos, como é o caso do *Centaur XP*, ou indiretos, como no *Immulate 2000 XPI*[®]. Nos métodos de quimioluminescência direta, utiliza-se um marcador luminóforo, o éster de acridíno, para a detecção do imunocomplexo, enquanto que os imunoenaios de quimioluminescência indireta recorrem a um marcador enzimático, a fosfatase alcalina, que se liga ao antígeno e, após adição de fosfato de dioxetano,

um substrato luminescente, ocorre a detecção do imunocomplexo (Cinquanta, Fontana e Bizzaro, 2017).



Figura 9. Representação esquemática de CLIA (Chemiluminescent Immuno Assay) (Fonte: <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/autoimunidade/zenit-ra/caracteristicas/vantagens>).

ECLIA (Eletrochemiluminescent Immuno Assay)

O princípio base do *Cobas e601 Analyser*[®] é a eletroquimioluminescência, que se baseia na competição entre o analito na amostra e um análogo marcado com ruténio II. É aplicada uma diferença de potencial na superfície do eléctrodo e o sinal de eletroquimioluminescência é detetado (Fung *et al.*, 2017). A instabilidade do ruténio II é causada pela aplicação de uma diferença de potencial e pela transferência de electrões com a tripopilamina (reação de oxidação-redução) e a estimulação eléctrica induz a produção de luz, detetada por um fotomultiplicador.

Nefelometria

A nefelometria é o princípio do *BN-ProSpec*[®], permitindo a detecção de imunocomplexos insolúveis através da dispersão de luz provocada. É uma técnica espectroscópica baseada na luz dispersa por partículas suspensas numa solução, que é detetada num ângulo de 13 a 24° em relação ao feixe de luz incidente (Santos *et al.*, 2011).

Turbidimetria

A turbidimetria é uma técnica baseada na atenuação da luz incidente (transmitida) devido às partículas em suspensão, com um detetor localizado a 180° do feixe incidente (Santos *et al.*, 2011). Este é o princípio do *Optilite*, em que se mede a absorvância aparente, devido ao decréscimo da intensidade de luz que passa.

TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission)

A tecnologia TRACE é a base de funcionamento do *Kryptor*[®]. Esta técnica baseia-se na transferência de energia não radiante de uma molécula dadora (criptato) para uma molécula aceitadora (XL665) (Bereciartua, 2011). O complexo formado com o antigénio de interesse aproxima o dador e o aceitador, o que leva à emissão de um sinal de fluorescência, cuja intensidade é proporcional à concentração de antigénio na amostra.

EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)

O *Viva-E*[®] é um equipamento utilizado para a análise de fármacos, permitindo a monitorização de terapêuticas. O seu princípio base é a tecnologia EMIT (Figura 10), uma técnica de imunoensaio homogéneo enzimática, cuja determinação é baseada na competição entre o xenobiótico na amostra e um xenobiótico marcado com glucose-6-fosfato desidrogenase, pelos locais de ligação ao anticorpo. A amostra do paciente é misturada com o anticorpo específico do xenobiótico a determinar, ligando-se a este, sendo depois adicionado o xenobiótico marcado com a enzima, que se irá ligar aos anticorpos disponíveis. A ligação ao anticorpo provoca uma diminuição da atividade da enzima e, com base nesta atividade, é determinada a concentração de analito na amostra, uma vez que a enzima ativa reduz o NAD a NADH (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina [reduzido]), resultando em alterações da absorvância, detetadas por medição espectrofotométrica (Luo, *et al.*, 2011).

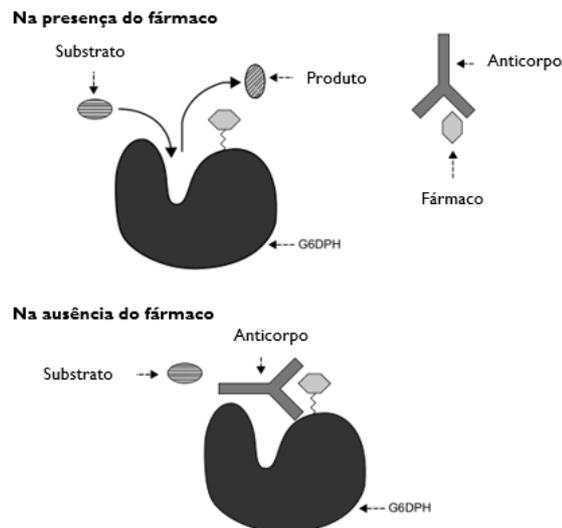


Figura 10. Representação esquemática de EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*)
 (Fonte: <https://www.analyticaltoxicology.com/en/immunoassays/>).

RIA (*RadiImmunoAssay*)

Os radioimunoensaios são ensaios competitivos que utilizam a amostra contendo o antígeno de interesse, um anticorpo complementar e um antígeno marcado com um radioisótopo, normalmente o iodo-125 (^{125}I), em que os dois antígenos vão competir pelos locais de ligação ao anticorpo. Quanto mais antígeno estiver presente na amostra, menor será a capacidade do antígeno marcado se ligar ao anticorpo (Grange, Thompson e Lambert, 2014). A radiação emitida é medida no contador de radiação gama *1470 Wizard Wallac*. É sempre feita uma curva de calibração com concentrações crescentes conhecidas do analito em estudo, a fim de determinar a concentração do analito na amostra.

7.3. Marcadores tumorais

Uma vez que o IPOCFG é uma instituição hospitalar destinada à vigilância, tratamento e investigação da doença oncológica, a determinação de marcadores tumorais na Imunologia/Hormonologia assume um papel de extrema importância no SPC, uma vez que o seu doseamento permite orientar o diagnóstico e tratamento, bem como avaliar a eficácia do mesmo, permitindo também a detecção precoce de recidivas ou metástases tardias.

Os marcadores tumorais são substâncias bioquímicas, maioritariamente proteínas e hormonas, que são diretamente produzidas por células malignas ou são produzidas por outras células, em resposta a certas condições malignas ou não, podendo estar associados a malignidade de um órgão específico ou estar aumentados numa variedade de cancros (Holdenrieder *et al.*, 2016; Steinberg, 1990). Os marcadores podem refletir o crescimento e/ou atividade da célula neoplásica e permitem conhecer a presença, evolução ou resposta terapêutica de um tumor maligno (Molina, Filella e Ballesta, 1994).

A maioria dos marcadores tumorais não são específicos de cancro e são sintetizados por células normais de um determinado tecido ou órgão pelo que, a lesão de tecidos produtores do marcador tumoral, por patologias não neoplásicas ou por efeito secundário do tratamento, provocará um aumento dos níveis séricos na ausência de cancro (falsos positivos), o que faz com que os marcadores tumorais não sejam utilizados isoladamente no diagnóstico (Molina *et al.*, 2011).

No IPOCFG é feito o doseamento dos marcadores tumorais séricos, cuja determinação está associada a sensibilidade e especificidade insuficientes. Com o intuito de melhorar o uso dos marcadores tumorais, é necessário atender aos níveis séricos do marcador tumoral, descartar patologia benigna e fazer um estudo sequencial do marcador tumoral, de forma a distinguir e valorizar corretamente os resultados obtidos (Molina *et al.*, 2011).

7.3.1. Proteínas

Antigénio carcinoembrionário (CEA)

O antigénio carcinoembrionário (CEA) foi primeiramente identificado numa metástase de carcinoma colorretal. A sua função fisiológica é desconhecida, mas considera-se que possa estar relacionada com mecanismos de reconhecimento celular ou mecanismos de adesão, devido à sua semelhança com as imunoglobulinas. O CEA é o marcador tumoral mais amplamente utilizado, podendo detetar-se aumentos em numerosos tumores epiteliais como o do pulmão, mama, neoplasias da cabeça e pescoço, entre outros. Observam-se, também, aumentos em diversas doenças benignas como cirrose hepática, insuficiência renal, patologia pulmonar, doenças digestivas, quistos ováricos ou hipertireoidismo (Molina *et al.*, 2011).

Um aumento persistente do valor de CEA pode estar associado a doença maligna progressiva e a uma pobre resposta terapêutica, enquanto que uma diminuição desse valor é

geralmente indicativa de um prognóstico favorável e uma boa resposta ao tratamento (Malati, 2007).

Antigénio carbohidrato 15.3 (CA 15.3)

O antigénio carbohidrato 15.3 (CA 15.3) é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais glandulares, sendo o marcador tumoral, por excelência, na monitorização do cancro da mama. Os níveis pré-operatórios de CEA no plasma, combinados com os níveis de CA 15.3, podem fornecer informação útil para o diagnóstico e tratamento do cancro da mama (Molina *et al.*, 2005). O aumento da concentração de CA 15.3 varia de acordo com o estadio da doença, sendo que na fase inicial da doença este marcador não está, normalmente, aumentado. A grande utilização deste marcador tumoral é no diagnóstico precoce de recidiva, precedendo os sinais clínicos em até 13 meses (Almeida *et al.*, 2007).

A sensibilidade de diagnóstico do CA 15.3 para o carcinoma da mama é baixa, apesar de ser mais sensível e específico que o CEA, sendo que se observam níveis elevados também em doenças benignas da mama, na cirrose hepática e na hepatite aguda e crónica. As concentrações do marcador estão também aumentadas em cancros metastáticos do pâncreas, ovário, colorretal, pulmão, estômago e útero (Malati, 2007).

Antigénio carbohidrato 125 (CA 125)

O antigénio carbohidrato 125 (CA 125) é o marcador de primeira escolha para carcinoma epitelial do ovário, em particular o adenocarcinoma seroso do ovário (Malati, 2007). Está presente nas estruturas derivadas dos ductos de Muller (trompa de Falópio, endocérnix e fundo vaginal) e mesotélios (pleura, pericárdio e peritoneu) e, mediante imunohistoquímica, também se deteta, embora em menor concentração, no epitélio pulmonar, renal, estômago, pâncreas e cólon (Molina *et al.*, 2011).

O CA125 pode ser eficazmente utilizado no diagnóstico, prognóstico e monitorização de cancro do ovário. Na altura do diagnóstico e antes da terapia, o CA 125 tem 80% de sensibilidade para o adenocarcinoma seroso e uma percentagem inferior para o adenocarcinoma mucinoso. Após remoção do tumor há um rápido declínio na concentração, numa semana, e normalização dos valores em cerca de três semanas após terapia, o que indica

uma boa correlação com a resposta clínica ao tratamento. O aumento da concentração do marcador precede o diagnóstico clínico ou recorrência em quatro meses (Malati, 2007).

Os falsos positivos podem ocorrer devido a insuficiência renal, hepatopatias, derrames, doenças ginecológicas e podendo também haver aumentos moderados no pico ovulatório e na menstruação (Molina *et al.*, 2011).

Proteína epididimal humana 4 (HE-4)

A proteína epididimal humana 4 (HE-4) é a proteína precursora da proteína E4 secretada no epidídimo, pertencente a uma família de inibidores de protease envolvidos na função imunitária. Está presente em diferentes tecidos, majoritariamente no trato genital feminino, no epidídimo e no ducto deferente do trato genital masculino, mas também noutros tecidos, embora em menor quantidade (Molina *et al.*, 2011).

O gene que codifica esta proteína está sobre expresso em carcinomas do ovário e expressa-se principalmente nos carcinomas serosos e do endométrio, mas não em tumores mucinosos. Na patologia ginecológica, a especificidade do HE-4 é muito superior à do CA 125, permitindo eliminar alguns falsos positivos inerentes à determinação do CA125 (Molina *et al.*, 2011).

Podem-se encontrar aumentos noutras neoplasias, principalmente ginecológicas e pulmonares. A insuficiência renal é a principal causa de falsos positivos, podendo alcançar concentrações de até 10 vezes o limite superior da normalidade (Molina *et al.*, 2011).

Antigénio carboidrato 19.9 (CA19.9)

O antigénio carboidrato 19.9 (CA 19.9) é um marcador tumoral de primeira escolha no cancro do pâncreas e das vias biliares. Está histologicamente localizado no epitélio fetal do cólon, intestino delgado, estômago, pâncreas e fígado e em muito pequena concentração no trato gastrointestinal do adulto e tecido pulmonar (Malati, 2007).

Este marcador não é específico de tumor, nem de órgão, no entanto, a sensibilidade (85%) e especificidade (95%) do diagnóstico são maiores no adenocarcinoma do pâncreas e observa-se sensibilidade de 70% no colangiocarcinoma e carcinoma da vesícula. A concentração de CA 19.9 correlaciona-se bem com a resposta clínica ao tratamento, sendo

um marcador promissor que prediz a recorrência de tumor após pancreatemia, antes de evidência clínica ou radiográfica de doença biliar (Malati, 2007).

Observam-se aumentos deste antígeno em pacientes com patologias benignas, sendo as hepatopatias e a insuficiência renal as principais causas de falsos positivos (Molina *et al.*, 2011).

Antígeno carboidrato 72.4 (CA 72.4)

O antígeno carboidrato 72.4 (CA 72.4), também designado TAG-72 (*Tumor associated glycoprotein 72*), foi detetado no epitélio fetal e também no soro de pacientes com diversos adenocarcinomas. Este marcador tumoral emergiu como o de primeira escolha para o carcinoma gástrico, com uma sensibilidade superior ao CA 19.9 e ao CEA (Malati, 2007). É utilizado no controle da remissão e recidiva de carcinomas do trato gastrointestinal (gástrico, cólon, pâncreas e trato biliar), apresentando elevada especificidade para cancro, mas sem sensibilidade de órgão (Almeida *et al.*, 2007).

Antígeno do carcinoma das células escamosas (SCC)

O antígeno do carcinoma das células escamosas (SCC) é uma glicoproteína de superfície celular, uma subfração do antígeno TA-4, isolado de amostras de tumores do cérvix uterino. Pode ser detetado no tecido escamoso da vulva, exocérvix uterino, pulmão, esófago e pele, cuja expressão aumenta em situação maligna (Molina *et al.*, 2011).

A principal utilização do SCC é auxiliar o diagnóstico e seguimento dos pacientes com neoplasias escamosas de diversas origens como cérvix uterino, pulmão ou cabeça e pescoço. Apesar de predominar nos carcinomas escamosos, também pode ser detetado em neoplasias não escamosas, apesar de em menores concentrações, como no adenocarcinoma do pulmão ou do pâncreas (Molina *et al.*, 2011).

Os principais falsos positivos estão associados a patologia renal crônica e doenças dermatológicas, nomeadamente doenças dermatológicas sistêmicas como pênfigo, psoríase e eczema (Molina *et al.*, 2011).

α -fetoproteína (AFP)

A α -fetoproteína (AFP) é uma das primeiras α -globulinas a aparecer no soro durante o desenvolvimento do embrião, sintetizada no saco vitelino fetal e fígado e é a proteína dominante do soro no início da vida embrionária. Contudo, decresce rapidamente, reaparecendo no adulto durante certos estados patológicos (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008).

A concentração de AFP sérica está aumentada na presença de várias formas de carcinoma hepatocelular e carcinoma das células germinais em crianças e adultos (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008). É também indicador de tumores germinais do testículo e ovário e de carcinoma gástrico (Molina *et al.*, 2011).

Podem ocorrer falsos positivos devidos a doenças autoimunes, doenças hepatobiliares, gravidez, hepatopatias de diversas origens ou tirosinemia hereditária (Molina *et al.*, 2011).

Proteínas S-100

As proteínas S-100 pertencem a uma família de proteínas ácidas intracelulares de baixo peso molecular e fixadoras de cálcio. Encontram-se no sistema nervoso central, células da glia, células de *Schwann*, melanócitos, células de *Langerhans*, músculo esquelético, miocárdio e tecido renal (Molina *et al.*, 2011).

A sua principal aplicação clínica é no melanoma maligno, no qual a sua concentração sérica se relaciona com o estadió tumoral, sobrevivência, prognóstico e resposta ao tratamento (Molina *et al.*, 2011).

A principal causa de falsos positivos é a insuficiência renal, mas também se detetam aumentos mais moderados em hepatopatias, patologia do sistema nervoso, gravidez, doenças infecciosas e doenças sistémicas autoimunes (Molina *et al.*, 2011).

β 2-microglobulina

A β 2-microglobulina é uma proteína encontrada na superfície celular de todas as células nucleadas e corresponde à cadeia leve do complexo maior de histocompatibilidade tipo I (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008). Está presente em elevadas concentrações nos linfócitos, estando envolvida em processos inflamatórios (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

É clinicamente utilizada como marcador de primeira escolha para leucemia das células B, linfomas e mieloma múltiplo. Devido à sua não especificidade, aumentos moderados observam-se em tumores sólidos e também em várias doenças inflamatórias, doenças infecciosas benignas, na cirrose biliar primária e na síndrome da imunodeficiência adquirida (Malati, 2007).

É utilizado para avaliar a carga celular tumoral, progressão da doença, prognóstico e resposta do paciente ao tratamento (Malati, 2007).

7.3.2. Enzimas

Enolase neuro-específica (NSE)

A enolase (fosfopiruvato hidratase) é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato. Conhecem-se cinco isoenzimas da enolase, formadas pela combinação de três subunidades, alfa, beta e gama, sendo que a isoenzima gama-gama, neuro-específica, é sintetizada principalmente nos neurónios e em células neuroendócrinas, o que faz do cérebro um dos tecidos com maiores concentrações de NSE (Molina et al., 2011).

É um dos marcadores tumorais mais específicos, principalmente nos tumores de origem neuroectodérmica, como tumores carcinoides intestinais, neuroblastomas e carcinomas indiferenciados de pequenas células, como é o caso do carcinoma de pequenas células do pulmão, *Small Cell Lung Cancer* (SCLC) (Molina et al., 2011).

A maioria dos falsos positivos detetam-se em situações de hemólise, pacientes com hepatopatias, doença renal, derrames, patologia pulmonar, especialmente tuberculose ou doenças autoimunes (Molina et al., 2011).

Antigénio específico da próstata (PSA)

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma enzima sintetizada pela glândula prostática e secretada no líquido seminal, onde tem uma função fluidificante associada à sua atividade enzimática. Em condições normais, é sintetizado na forma de precursor, pro-PSA, no retículo endoplasmático rugoso das células epiteliais da próstata e, após excisão de 17

aminoácidos, é secretado pelos ductos prostáticos. No líquido seminal, o PSA pode ser inativado pela excisão dos resíduos de lisina, originando uma isoforma que não forma complexos, o PSA livre (Almeida *et al.*, 2007).

O PSA circula ligado a proteínas inibidoras das proteases, alfa-1 antiqumiotripsina e alfa-2-macroglobulina, sendo que apenas uma pequena fração do PSA permanece no estado livre. A percentagem de PSA livre varia em função da patologia prostática, sendo menor em pacientes com cancro da próstata do que em indivíduos normais ou com patologia benigna (Filella *et al.*, 1997; Filella *et al.*, 2001).

O PSA é um marcador tumoral clinicamente relevante e mais usado no carcinoma da próstata, sendo considerado um marcador adequado como auxiliar no diagnóstico e um excelente marcador na monitorização da eficácia de qualquer modalidade terapêutica. O valor de PSA sérico fornece uma elevada sensibilidade diagnóstica no pré-tratamento do carcinoma da próstata e, se combinado com o exame retal digital e ecografia transretal, torna-se muito útil na identificação precoce do adenocarcinoma da próstata (Malati, 2007). Normalmente é feito o doseamento do PSA total, ou seja, das formas livre e ligada a proteínas, mas sempre que se justifique é doseado o PSA livre, sendo que a relação PSA livre/PSA total, permite distinguir entre uma situação benigna ou maligna.

As principais causas de aumento, na ausência de neoplasia, são a prostatite e a hipertrofia benigna da próstata (Almeida *et al.*, 2007).

7.3.3. Citoqueratinas

CYFRA 21.1

O CYFRA 21.1 é um determinante antigénico presente na citoqueratina 19, que predomina no tecido pulmonar, sendo expresso no epitélio simples normal, assim como no epitélio em proliferação. É utilizado como marcador tumoral para *Non Small Cell Lung Cancer* (NSCLC), como o carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinomas das células grandes, constituindo um fator de mau prognóstico no carcinoma de células escamosas do pulmão (Almeida *et al.*, 2007; Malati, 2007).

Este marcador encontra-se elevado também no carcinoma da bexiga, do colo do útero e da cabeça e pescoço e aumenta inespecificamente em algumas patologias benignas

pulmonares, gastrointestinais, ginecológicas, urológicas e da mama, podendo levar a falsos positivos (Almeida *et al.*, 2007).

7.3.4. Hormonas

Tiroglobulina

A tiroglobulina é uma glicoproteína produzida exclusivamente pela glândula tiroide, como um precursor das hormonas da tiroide, regulada pela TSH (hormona estimuladora da tiroide; regula o crescimento da glândula tiroide e a iodação dos resíduos tirosil) (Bishop, Fody e Schoeff, 2010). É doseada principalmente como um marcador tumoral em doentes com diagnóstico de carcinoma diferenciado da tiroide (carcinoma folicular ou carcinoma papilar), uma vez que cerca de dois terços destes doentes possuem um valor de tiroglobulina pré-operatório elevado. A presença desta pró-hormona em circulação demonstra a presença de tecido tiroideu, benigno ou maligno (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008).

Localizada nas células foliculares da tiroide, a tiroglobulina é rica no aminoácido tirosina e, alguns dos resíduos tirosil podem ser iodados (iodo proveniente da alimentação), pela ação da peroxidase, obtendo-se como produtos finais a triiodotironina (T₃) ou a tiroxina (T₄), que são secretadas para a circulação. A T₃ tem uma atividade metabólica 3 a 8 vezes superior à T₄ e é considerada a forma ativa da hormona da tiroide, enquanto a T₄ é a “pré-hormona” (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

Uma concentração de tiroglobulina pré-operatória elevada confirma a capacidade do tumor em secretá-la e valida o uso da tiroglobulina pós-operatória para monitorização de recorrência do tumor. A nível pós-operatório, o método mais sensível para detetar tumores residuais ou metástases é a estimulação da TSH, uma vez que, em tumores bem diferenciados, se observa um grande aumento da tiroglobulina após estimulação da TSH. Após tireoidectomia total e terapia com iodo (ablação com iodo radioativo), a tiroglobulina deve ser indetetável, caso contrário poderá tratar-se de uma recidiva ou metástase (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

A precisão do ensaio da tiroglobulina depende primeiramente da especificidade do anticorpo usado e da ausência de autoanticorpos anti-tiroglobulina, que interferem com as medições e levam a resultados de tiroglobulina não confiáveis, sendo, portanto, importante a pesquisa destes autoanticorpos sempre que a tiroglobulina é doseada (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

Qualquer doença da glândula da tiroide, tanto benigna como maligna, provoca aumentos da tiroglobulina.

Calcitonina

A calcitonina é um polipéptido produzido pelas células C da tiroide (parafoliculares) e é normalmente secretada em resposta ao aumento de cálcio sérico, inibindo a libertação de cálcio dos ossos, diminuindo assim a sua concentração no soro (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008). Em conjunto com a paratormona (PTH) controla o metabolismo do cálcio e do fósforo no organismo.

Concentrações elevadas estão normalmente associadas com carcinoma medular da tiroide, sendo a sua determinação especialmente útil no carcinoma medular da tiroide familiar, em que familiares assintomáticos de um doente afetado irão apresentar concentrações basais de calcitonina aumentadas. As concentrações de calcitonina são indicadoras do grau de extensão da doença, nomeadamente do volume tumoral e do envolvimento local do tumor e desenvolvimento de metástases, revelando-se um marcador útil na monitorização do tratamento e deteção de recorrência da doença (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008).

Também se observam concentrações elevadas de calcitonina no cancro do pulmão, mama, rim e fígado, apesar da sua utilidade como marcador tumoral nestas situações ainda não estar provada, e em situações não malignas como doença pulmonar, pancreatite, hiperparatiroidismo, anemia perniciosa, doença de Paget e gravidez (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008).

Gonadotrofina coriónica humana (β -HCG)

A HCG, constituída por duas subunidades (α e β), é uma hormona glicoproteica sintetizada pelas células sinciciotrofoblásticas da placenta, com função de preservar a secreção de progesterona e a função do corpo lúteo, durante as fases iniciais da gravidez. Os tumores podem produzir variantes da HCG, formas hiperglicosiladas, variantes sem a porção C-terminal da fração β , etc. (Molina *et al.*, 2011).

Os imunoensaios utilizados na atualidade são incorretamente designados como pesquisa da β -HCG, mas doseiam tanto a HCG total como a fração β (mais específica que a

fração α), geralmente a partir de anticorpos monoclonais ou policlonais contra a subunidade β (Molina *et al.*, 2011).

A detecção de aumentos da β -HCG na ausência de gravidez leva a que se suspeite de um tumor maligno, sendo utilizado principalmente como marcador tumoral em tumores trofoblásticos e neoplasias germinais do testículo e ovário (Molina *et al.*, 2011). Juntamente com a α -fetoproteína, este marcador é utilizado para identificar pacientes com tumores germinativos do testículo (Burtis, Ashwood e Bruns, 2008).

8. CONCLUSÃO

Este estágio curricular representa o culminar de mais uma etapa académica, a finalização do Mestrado em Análises clínicas, no qual foi possível pôr em prática os conhecimentos teóricos previamente adquiridos.

A realização deste estágio e a passagem pelos quatro setores do SPC do IPOCFG permitiu-me ter a noção do que é trabalhar num laboratório de análises clínicas, perceber qual a rotina laboratorial envolvida e a importância do processamento adequado das amostras, para que sejam emitidos resultados fiáveis e com qualidade. Esta divisão em setores é apenas estrutural, a fim de facilitar o processamento das amostras, uma vez que os resultados obtidos nos diferentes setores são analisados conjuntamente, a fim de suportar o diagnóstico clínico.

Sendo as análises clínicas uma área complementar ao diagnóstico, é essencial assegurar que sejam realizadas nas melhores condições, permitindo avaliar adequadamente o estado de saúde do doente, algo que é garantido no SPC.

Apesar do avanço tecnológico, que possibilitou a automatização de grande parte do SPC, permitindo a obtenção de resultados com menor percentagem de erro, num intervalo de tempo mais curto, o papel de toda a equipa do SPC é de extrema importância, a fim de garantir o correto processamento dos produtos biológicos, obtendo-se resultados com qualidade, dos quais estão dependentes os diagnósticos e decisões terapêuticas.

Este estágio permitiu-me compreender a complexidade de um laboratório de análises, perceber como os resultados obtidos nos diferentes setores se conjugam e permitem orientar o clínico, auxiliando o diagnóstico. Percebi a verdadeira importância das análises clínicas, que a partir de uma pequena amostra fornecem dados de extrema importância acerca do estado do doente, contribuindo assim para uma boa prestação de cuidados de saúde.

9. BIBLIOGRAFIA

- AL-BADR, A.; AL-SHAIKH, G. (2013) – Recurrent urinary tract infections management in women. “Sultan Qaboos University Medical Journal” 13 (2013) 359-367.
- ALMEIDA, J.R.C. [et.al] (2007) – Marcadores tumorais: Revisão de literatura. “Revista Brasileira de Cancerologia” 53 (2007) 305-316.
- BADRICK, T. (2008) – The quality control system. “The Clinical Biochemist Reviews” 29 (2008) 67-70.
- BAEBER, A. [et.al] (2013) – Urinary tract infections: current and emerging management strategies. “Clinical Infectious Diseases” 57 (2013) 719-724.
- BANFI, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G. (2007) – The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as *in vitro* anticoagulant for diagnostic purposes. “Clinical Chemical Laboratory Medicine” 45 (2007) 565-576.
- BARENFANGER, J.; DRAKE, C.A. (2001) – Interpretation of Gram stains for the nonmicrobiologist. “Laboratory Medicine” 32 (2001) 368-375.
- BERECIARTUA, E. [et.al] (2011) – TRACE Technology for assays of novel biomarkers. “The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” 21 (2011) 118-121.
- BISHOP, M.L.; FODY, E.P.; SCHOEFF, L.E. – **Clinical chemistry: techniques, principles, correlations**. 6ªEd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1.
- BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. – **Tietz Fundamentals of clinical chemistry**. 6ªEd. Missouri: Saunders Elsevier, 2008. ISBN 978-0-7216-3865-2.
- CAMARGO, I. [et.al] (2001) – Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário – uma revisão técnica. “Medicina, Ribeirão Preto” 34 (2001) 70-78.
- CHEN, K. [et.al] (1979) – Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginites. “Journal of Clinical Investigation” 63 (1979) 828-835.
- CINQUANTA, L.; FONTANA, D.E.; BIZZARO, N. (2017) – Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? “Autoimmunity Highlights” 8 (2017) 1-8.

DARWISH, I.A. (2006) – Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. “International Journal of Biomedical Science” 2 (2006) 217-235.

DA VILA, G.; BARREDA, C. (1985) – Predictive value of the “Clue cells” investigation and the amine volatilization test in vaginal infections caused by *Gardnerella vaginalis*. “Journal of Clinical Microbiology” 22 (1985) 686-687.

Decreto-Lei nº14/2012 de 26 de fevereiro. *Norma nº 019/2014*. Direção-Geral da Saúde. Lisboa.

FARVER, Carol F.; JAGIRDAR, Jaishree - **Mycobacterial diseases**. In: ZANDER, Dani S.; FARVER, Carol F. Pulmonary Pathology. Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-39308-9, 201-26.

FILELLA, X. [et.al] (1997) – Clinical evaluation of free PSA/total PSA (prostate-specific antigen) ratio in the diagnosis of prostate cancer. “European Journal of Cancer” 33 (1997) 1226-1229.

FILELLA, X. [et.al] (2001) – Free to complexed PSA ratio in differentiating benign prostate hyperplasia from prostate cancer. “Anticancer Research” 21 (2001) 3717-3720.

FONSECA, A.B. et al. – **Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia**. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/Programa Nacional de controlo de infeção, 2004.

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. – **Bailey & Scott’s Diagnostic microbiology**. 12ªEd. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. ISBN 13 978-0-323-03065-6.

FUNG, A.W.S. [et.al] (2017) – Evaluation of electrochemiluminescence immunoassays for immunosuppressive drugs on the Roche cobas e411. “F1000 Research” 6 (2017) 1-13.

GOLANSKI, J. [et.al] (1996) – Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood – various anticoagulants are not equal. “Thrombosis Research” 83 (1996) 199-216.

GRANGER, R.D.; THOMPSON, J.P.; LAMBERT, D.G. (2014) – Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. “British Journal of Anaesthesia” 112 (2014) 213-216.

HEINLEN, L.; BALLARD, J. (2010) – *Clostridium difficile* infection. “The American Journal of the Medical Sciences” 340 (2010) 247-252.

HOFFMAN, O.; WEBER, J.R. (2009) – Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. “Therapeutic Advances in Neurological Disorders” 2 (2009) 401-412.

- HOLDENRIEDER, S. [et.al] (2016) – Clinically meaningful use of blood tumor markers in oncology. “BioMed Research International” 4 (2016) 1-10.
- KHAN, H.A.; BAIG, F.K.; MEHBOOB, R. (2017) – Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. “Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine” 7 (2017) 478-482.
- KIRN, T.J.; WEINSTEIN, M.P. (2013) – Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. “Clinical Microbiology and Infection” 19 (2013) 513-520.
- KUMAR, M. [et.al] (2014) – Diagnosis of central venous catheter-related bloodstream infection without catheter removal: a prospective observational study. “Medical Journal Armed Forces India” 70 (2014) 17-21.
- LIMA, V.S. [et.al] (2003) – Carcinomatose meníngea nos tumores sólidos. “Revista Brasileira de Cancerologia” 49 (2003) 245-251.
- LIU, A. [et.al] (2018) – Non-competitive immunoassay for low molecular weight contaminant detection in food, feed and agricultural products: a mini review. “Trends in food science & technology” 71 (2018) 181-187.
- LUO, X.H. [et.al] (2011) – The clinical value of enzyme-multiplied immunoassay technique monitoring the plasma concentrations of cyclosporine A after renal transplantation. “Journal of Pharmaceutical Analysis” 1 (2011) 139-142.
- MADIGAN, Michael T. et al. – **Brock Biology of Microorganisms**. 13ªEd. São Francisco: Pearson Education, Inc., 2009. ISBN 10: 0-321-64963-X.
- MAHON, C.R.; LEHMAN, D.C.; MANUSELIS, G. – **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ªEd. Missouri: Saunders Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
- MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. (1977) – A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. “New England Journal of Medicine” 296 (1977) 1305-1309.
- MALATI, T. (2007) – Tumor markers: an overview. “Indian Journal of Clinical Biochemistry” 22 (2007) 17-31.
- MOLINA, R. [et.al] (2005) – Tumor markers in breast cancer – European group on tumor markers recommendations. “Tumor Biology” 26 (2005) 281-293.
- MOLINA, R. et al. - **Utilidad clínica de los marcadores tumorales [Estado actual y perspectivas de futuro III]**. Roche Diagnostics S.L., 2011.

MOLINA, R.; FILELLA, X.; BALLESTA, A.M. (1994) – Marcadores tumorales, teoría o realidad. “Medicina Clínica” 102 (1994) 189-195.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. (2012) – Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! “Trends in Molecular Medicine” 18 (2012) 263-272.

O’CONNELL, T.X.; HORITA, T.J.; KASRAVI, B. (2005) – Understanding and interpreting serum protein eletrophoresis. “American Family Physician” 71 (2005) 105-112.

OFOFU, A. (2016) - *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. “Annals of Gastroenterology” 29 (2016) 147-154.

OPOTA, O. [et.al] (2015) – Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. “Clinical Microbiology and Infection” 21 (2015) 313-322.

PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde – **Programa nacional para as doenças oncológicas**. Lisboa: DGS, 2017.

REHNUMA, B.; IBRAHIM, M.; NASIR, T.A. (2015) – Quality assurance and quality control in clinical laboratories. “Pulse” 8 (2015) 62-65.

RITCHIE, L.S. (1948) – An ether sedimentation technique for routine stool examinations. “The Bulletin of the U.S. Army Medical Department” 8 (1948) 326.

SANTOS, V.B. [et.al] (2011) – Evaluation of turbidimetric and nephelometric techniques for analytical determination of N-acetylcysteine and thiamine in pharmaceutical formulations employing a lab-made portable microcontrolled turbidimeter and nephelometer. “Journal of the Brazilian Chemical Society” 22 (2011) 1968-1978.

SLAGLE, K.M.; GHOSN, S.J. (1996) – Immunoassays tools for sensitive, specific, and accurate test results. “Laboratory Medicine” 27 (1996) 177-183.

SLOBBE, L. [et.al] (2009) – Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose cateter colonization and bacteriemia in patients with long-term tunnelled cateter: a randomized prospective study. “Journal of Clinical Microbiology” 47 (2009) 885-888.

STEINBERG, W. (1990) – The clinical utility of the CA 19-9 tumor associated antigen. “The American Journal of Gastroenterology” 85 (1990) 350-355.

ZHU, Y.W. [et.al] (2016) – Routine hemostasis and hemograma parameters: valuable assessments for coagulation disorder and chemotherapy in cancer patients. “Chinese Medical Journal” 129 (2016) 1772-1777.