



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Vera Patrícia Aguiar Pires

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2019



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO

## Mestrado em Análises Clínicas

Vera Patrícia Aguiar Pires

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e pelo Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Curricular desenvolvido no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gil E.P.E, no período decorrido entre 3 de dezembro de 2018 e 31 de maio de 2019 e nas áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. Estas duas últimas áreas foram as valências eleitas para aprofundamento neste relatório.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



# ÍNDICE

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	vi
Agradecimentos .....	vii
Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos.....	ix
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xv
Introdução.....	1
Caracterização do Laboratório de Estágio .....	3
Atividades Desenvolvidas.....	6
I. Bioquímica .....	6
II. Hematologia.....	8
III. Imunologia/Hormonologia.....	10
Princípios da Instrumentação .....	12
1. Nefelometria e Turbidimetria.....	13
2. Quimioluminescência .....	14
3. Eletroquimioluminescência .....	14
4. <i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)</i> .....	15
5. Imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT).....	15
6. Radioimunoensaio (RIA).....	16
Marcadores Tumorais .....	16
1. Antígenos oncofetais.....	17
1.1. Antígeno Carcinoembrionário (CEA) .....	17
1.2. $\alpha$ -Fetoproteína (AFP).....	17
2. Antígenos tumorais.....	18
2.1. Antígeno Carboidrato 15.3 (CA 15.3).....	18
2.2. Antígeno Carboidrato (CA 125) .....	18
2.3. Antígeno Carboidrato (CA 19.9).....	19
2.4. Antígeno Carboidrato (CA 72.4).....	19
3. Citoqueratinas .....	19
3.1. Fragmento da Citoqueratina 19 (CYFRA 21.1).....	19
3.2. Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA).....	20

4. Hormonas.....	20
4.1. $\beta$ -Gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG).....	20
4.2. Calcitonina.....	21
4.3. Tiroglobulina.....	21
5. Enzimas.....	22
5.1. Antígeno Específico da Próstata (PSA) .....	22
5.2. Enolase Neuro-específica (NSE).....	22
6. Proteínas .....	22
6.1. Proteína S-100 $\beta$ .....	22
6.2. $\beta_2$ -microglobulina (BMG) .....	23
IV. Microbiologia.....	24
Processamento de Produtos Biológicos .....	25
1. Sangue (hemoculturas) .....	25
1.1. Colheita.....	25
1.2. Processamento laboratorial.....	26
2. Secreções respiratórias .....	28
2.1. Colheita.....	28
2.2. Processamento laboratorial.....	29
3. Urina .....	31
3.1. Colheita.....	32
3.2. Processamento laboratorial.....	32
4. Fezes .....	34
4.1. Colheita.....	35
4.2. Processamento laboratorial.....	35
5. Exsudados purulentos superficiais e profundos.....	38
5.1. Colheita.....	38
5.2. Processamento laboratorial.....	38
6. Exsudados vaginais.....	39
6.1. Colheita.....	39
6.2. Processamento laboratorial.....	39
7. Pontas de cateter .....	40
7.1. Colheita.....	40
7.2. Processamento laboratorial.....	40
8. Líquido cefalorraquidiano (LCR) .....	41

8.1. Colheita.....	41
8.2. Processamento laboratorial.....	42
9. Raspados de fâneros.....	42
9.1. Processamento laboratorial.....	42
Identificação dos Microrganismos e Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....	43
1. Técnicas de identificação.....	43
1.1. Provas bioquímicas auxiliares de identificação.....	43
1.2. Testes de suscetibilidade auxiliares à identificação.....	44
1.3. Galeria de identificação BD BBL™ Crystal™.....	44
1.4. Testes de Biologia Molecular.....	45
1.5. Identificação definitiva.....	45
2. Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	46
2.1. Testes de suscetibilidade manuais.....	47
2.2. Detecção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido e de carbapenemases.....	48
Controlo de Qualidade.....	50
1. Controlo de Qualidade Interno.....	50
2. Controlo de Qualidade Externo.....	51
Conclusão.....	53
Referências bibliográficas.....	55





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Imunoensaio não competitivo ("sandwich").....	12
Figura 2 - Imunoensaio competitivo, demonstrando a proporcionalidade inversa. <b>A</b> – Antígeno-alvo presente em baixas quantidades. <b>B</b> – Antígeno-alvo presente em grandes quantidades.....	13
Figura 3 - Esquema do princípio físico da nefelometria e da turbidimetria.....	14
Figura 4 - Imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT). .....	15
Figura 5 - Exemplos de marcadores tumorais que se podem determinar consoante o tipo de neoplasia maligna, no sexo masculino ( <b>A</b> ) e no sexo feminino ( <b>B</b> ). .....	17
Figura 6 - Técnica da sementeira por esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido.....	26
Figura 7 - Estrutura e constituintes da parede celular de bactérias de gram positivo ( <b>A</b> ) e de gram negativo ( <b>B</b> ). .....	27
Figura 8 - Observação ao microscópio (objetiva 50x) de microrganismos corados pela Coloração de Gram. <b>A</b> – Cocos de gram positivo (coloração roxa). <b>B</b> – Bacilos de gram negativo (coloração rosa). .....	28
Figura 9 - Bacilos ácido-álcool resistentes após a coloração de Kinyoun. <b>A</b> – Exame direto. <b>B</b> - Após homogeneização. <b>C</b> – Após sementeira em meio LJ. .....	31
Figura 10 - <b>A</b> – Técnica da sementeira quantitativa. (Desenho de Marina Tomás). <b>B</b> – <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	33
Figura 11 - Meios de cultura XLD ( <b>A</b> ) e Hektoen ( <b>B</b> ). .....	36
Figura 12 - <i>Clue cells</i> em microscopia ótica (objetiva de 50x). .....	40
Figura 13 - Método fenotípico para a deteção de BLSE. <b>A</b> – Presença de BLSE (sinergismo); <b>B</b> – Suscetibilidade ao faropenemo.....	49

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Hematologia.....	4
Tabela 2 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Microbiologia.....	4
Tabela 3 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Bioquímica Clínica. ....	5
Tabela 4 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Imunologia & Hormonologia.....	5
Tabela 5 - Equipamentos do setor de Bioquímica do IPOCFG, com os respetivos parâmetros analisados e método de deteção.....	7
Tabela 6 - Respetivos parâmetros e metodologias dos diversos equipamentos automatizados do setor de Imunologia e Hormonologia.....	11
Tabela 7 - Parâmetros analisados no setor de Imunologia e Hormonologia por técnicas manuais e consoante o tipo de amostra. ....	12
Tabela 8 - Sistema de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expectoração.....	29
Tabela 9 - Ensaio realizado por PCR em tempo real no setor de Microbiologia do IPOCFG. ....	45
Tabela 10 - Respetivas densidades McFarland e volumes a transferir para o TSA, de acordo com o tipo de carta ID.....	46
Tabela 11 - Cartas TSA usadas em conjunto com o microrganismo para o qual se realiza o antibiograma. ....	47
Tabela 12 - Níveis do Controlo de qualidade interno para os diferentes setores do IPOCFG. ....	50

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço do fundo do coração à minha família por me ter proporcionado mais um momento académico. Aos meus pais, Alice e Luís, cujo apoio foi indescritível e que nunca desistiram de mim. Aos meus tios, Conceição e Manuel, por todos os bons e alegres momentos que me proporcionaram ao longo destes anos e por todo o apoio.

Agradeço à Professora Doutora Maria do Céu Sousa, coordenadora do mestrado em 2017/2018; e à Professora Doutora Ana Miguel Silva, coordenadora em 2018/2019, por toda a disponibilidade e acessibilidade prestada ao longo deste percurso académico.

Expresso também a minha gratificação à Professora Doutora Olga Cardoso, minha orientadora interna, pela prontidão e orientação na realização deste relatório. Sem esquecer os conhecimentos transmitidos nas unidades curriculares que leciona, o que me motivou na escolha da valência de Microbiologia.

Ao Doutor Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, e meu orientador externo, gratifico por me ter possibilitado estagiar neste instituto e por toda a sabedoria transmitida.

A todos os Técnicos Superiores de Saúde do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, agradeço pelos conhecimentos transmitidos e orientação, permitindo-me observar a dinâmica diária de um laboratório de análises clínicas e também a importância da validação biopatológica.

Às minhas colegas de estágio, Margarida Pereira e Beatriz Sebastião, agradeço pelo companheirismo e por terem feito parte desta grande jornada.

Ao meu namorado e melhor amigo, Dylan Torres, por me apoiar em todos os meus momentos e por fazer de mim uma pessoa mais feliz e completa.

Por fim, agradeço às amigas que este mestrado colocou no meu destino, Mariana Silva, Daniela Veiga, Joana Ferreira e Catarina Abrantes, pois sem elas esta etapa não teria sido o que foi e por me mostrarem do que são feitas as grandes amizades.



## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH	hormona adrenocorticotrópica ( <i>adrenocorticotropic hormone</i> )
AFP	$\alpha$ -fetoproteína
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
BAAR	bacilos ácido-álcool resistentes
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
BLSE	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
BMG	$\beta_2$ -microglobulina
CA 125	antígeno carboidrato 125 ( <i>carbohydrate antigen 125</i> )
CA 15.3	antígeno carboidrato 15.3 ( <i>carbohydrate antigen 15.3</i> )
CA 19.9	antígeno carboidrato 19.9 ( <i>carbohydrate antigen 19.9</i> )
CA 72.4	antígeno carboidrato 72.4 ( <i>carbohydrate antigen 72.4</i> )
Ca <sup>2+</sup>	ião cálcio
CEA	antígeno carcinoembrionário ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )
CK-MB	creatinina cinase-MB
Cl <sup>-</sup>	ião cloreto
CLED	gelose cistina-lactose com déficit em eletrólitos
CMI	concentração mínima inibitória
CNA	gelose de sangue com colistina e ácido nalixílico
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
COS	gelose de sangue Columbia
CYFRA 21.1	fragmento da citoqueratina 19 ( <i>serum cytokeratin fragment 21.1</i> )
DHEAS	sulfato de dehidroepiandrosterona ( <i>dehydroepiandrosterone sulfate</i> )
EBV	vírus Epstein-Barr ( <i>Epstein-Barr virus</i> )
EMIT	imunoensaio enzimático de multiplicação ( <i>enzyme-multiplied immunoassay</i> )
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FSH	hormona folículo-estimulante ( <i>follicle-stimulating hormone</i> )
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase ( <i>glucose-6-phosphate-dehydrogenase</i> )
GN	caldo Gram-Negativo
GRH	hormona do crescimento humana ( <i>human growth hormone</i> )
H <sub>2</sub> S	ácido sulfídrico
Hb A1 <sub>c</sub>	hemoglobina glicada

HCG	gonadotrofina coriónica humana ( <i>human chorionic gonadotropin</i> )
HDL	lipoproteínas de alta densidade ( <i>high density lipoproteins</i> )
HEK	gelose <i>Hektoen</i>
HSV	vírus herpes simplex ( <i>herpes-simplex virus</i> )
ID	cartas de identificação
Ig	imunoglobulina
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina I ( <i>insulin-like growth factor I</i> )
IPOCFG	Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil
ITU	infecções do trato urinário
K <sup>+</sup>	ião potássio
K <sub>3</sub> -EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio ( <i>tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
KCS	caldo <i>Schaedler</i>
KOH	hidróxido de potássio
LCR	líquido cefalorraquidiano
LDL	lipoproteínas de baixa densidade ( <i>low density lipoproteins</i> )
LH	hormona luteinizante ( <i>luteinizing hormone</i> )
MGUS	gamopatias monoclonais de significado indeterminado
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MHF	<i>Mueller-Hinton Fastidious</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina sensíveis
Na <sup>+</sup>	ião sódio
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NaOH	hidróxido de sódio
NSE	enolase neuro-específica ( <i>neuron-specific enolase</i> )
pCO <sub>2</sub>	pressão parcial de dióxido de carbono
PCR	reação de polimerização em cadeia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pO <sub>2</sub>	pressão parcial de oxigénio
ProGRP	peptídeo libertador de progastrina ( <i>progastrin-releasing peptide</i> )
PSA	antígeno específico da próstata ( <i>prostate specific antigen</i> )
PTH	hormona paratiroideia ( <i>parathyroid hormone</i> )
PVX	gelose de chocolate com <i>PolyVitex</i> <sup>TM</sup>
RIA	radioimunoensaio ( <i>radioimmunoassay</i> )
SCCA	antígeno carcinoma de células escamosas ( <i>squamous cell carcinoma antigen</i> )

SCS	gelose <i>Schaedler</i>
SGC	gelose <i>Sabouraud</i> com gentamicina e cloranfenicol
SPC	Serviço de Patologia Clínica
T <sub>3</sub>	triiodotironina
T <sub>4</sub>	tiroxina
TPA	tripropilamina
TRABs	anticorpos anti-recetores da hormona estimulante da tiroide ( <i>thyroid-stimulating hormone receptor antibodies</i> )
TRACE	<i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission</i>
TSA	testes de suscetibilidade antimicrobiana
TSH	hormona estimulante da tiroide ( <i>thyroid-stimulating hormone</i> )
UFC	unidades formadoras de colónicas
XLD	gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato
β-hCG	β-gonadotrofina coriónica humana ( <i>β-human chorionic gonadotropin</i> )





## RESUMO

Um laboratório de análises clínicas desempenha, sem qualquer dúvida, um papel relevante ao fornecer informações cruciais sobre o diagnóstico, prognóstico e terapêutica. Tal informação é conseguida a partir da análise de diferentes produtos biológicos (p. ex. sangue, urina, etc.), que possibilitam a determinação de uma vasta gama de parâmetros analíticos.

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra, uma comunidade hospitalar direcionada para as doenças do foro oncológico, foi o local selecionado para a realização do Estágio Curricular. Este relatório realça, portanto, o impacto que o Serviço de Patologia Clínica tem nesse tipo de patologias, permitindo o diagnóstico e seguimento do doente oncológico.

O principal objetivo deste relatório de estágio prende-se com a descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio nas diferentes áreas que constituem o Serviço de Patologia Clínica: Bioquímica, Hematologia, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. Essas atividades incorporam a rotina laboratorial, a metodologia dos diferentes parâmetros analíticos e ainda o controlo de qualidade.

Neste relatório destacam-se as áreas da Microbiologia e da Imunologia/Hormonologia, sendo estas as valências selecionadas para aprofundamento, havendo também uma breve descrição das restantes áreas.

**Palavras-chave:** Análises clínicas, Microbiologia, Imunologia, Hormonologia, Bioquímica, Hematologia, Controlo de qualidade.



## **ABSTRACT**

A clinical analysis laboratory plays, without any doubt, a relevant role in providing crucial information on diagnosis, prognosis and therapy. Such information is obtained from the analysis of different biological products (eg blood, urine, etc.), which enable the determination of a wide range of analytical parameters.

Coimbra's Portuguese Oncology Institute, a hospital community focused on the diseases of the oncological forum, was the place selected for the accomplishment of the Curricular Internship. Therefore, this report emphasises the impact that the Clinical Pathology Service has in this type of diseases, allowing the diagnosis and follow-up of the cancer patient.

The main purpose of this internship report is to describe the activities developed during the internship in the different areas that constitute the Clinical Pathology Service: Biochemistry, Hematology, Immunology/Hormonology and Microbiology. These activities involve the laboratory routine, the methodology of the different analytical parameters and also the quality control.

This report highlights the areas of Microbiology and Immunology/Hormonology, which were the ones selected for further study, and there is also a brief description of the remaining areas.

**Keywords:** Clinical analysis, Microbiology, Immunology, Endocrinology, Biochemistry, Hematology, Quality control.



## INTRODUÇÃO

As neoplasias oncológicas retratam um grupo de doenças atualmente responsáveis por uma grande percentagem de mortalidade a nível mundial. Ingratas e incapacitantes para o doente, estas doenças requerem uma necessidade extensiva de cuidados médicos e também de apoio moral. O ato de lidar diariamente com estas doenças, aperceber-se das mudanças físicas, efetuar os tratamentos e aceitar a fatalidade é muitas vezes desgastante para os pacientes oncológicos. Permanece, então, a necessidade contínua da evolução da tecnologia, com vista a serem investigadas novas formas de prevenir, detetar e fornecer o tratamento mais adequado a cada caso de cancro, sempre com o intuito de melhorar a qualidade de vida destas pessoas.

As análises clínicas são uma ferramenta crucial na deteção, diagnóstico, prognóstico e *follow-up* dos pacientes oncológicos. A partir de uma simples amostra biológica, é possível reproduzir um resultado analítico que nos fornece um panorama geral acerca do estado de saúde de uma pessoa. Analisando esses resultados em conjunto com a respetiva informação clínica e com outros exames auxiliares de diagnóstico, é possível obter uma estimativa do intervalo livre de doença, bem como auxiliar a direcionar a terapêutica de modo a proporcionar uma melhor qualidade de vida a estes pacientes.

No âmbito do Estágio Curricular do Mestrado de Análises Clínicas, foi-me possibilitado integrar, durante 6 meses, a equipa laboratorial que constitui o Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG). Durante esse período tive o prazer de concretizar a minha primeira experiência laboratorial no mundo real: realizar a rotina laboratorial, obter novos ensinamentos, aplicar os conhecimentos teóricos obtidos durante o mestrado e, não menos importante, interpretar os resultados obtidos de modo a reproduzir uma validação biopatológica fidedigna.

O SPC encontra-se dividido em quatro setores, sendo eles os setores de Bioquímica, Hematologia, Imunologia/Hormonologia e Microbiologia. As áreas da Microbiologia e da Imunologia/Hormonologia sempre me fascinaram ao longo do meu percurso académico, pelo que foram essas as duas valências que seleccionei para aprofundamento neste relatório de estágio.

No que toca às doenças oncológicas, a relevância do setor de Imunologia/Hormonologia é grande, nomeadamente no estudo dos marcadores tumorais, sendo capaz de nos fornecer informações relevantes para o estadiamento e prognóstico da doença, assim como da eficácia terapêutica.

A Microbiologia, por outro lado, prende-se com a identificação de microrganismos que possam causar infeções nos doentes oncológicos, tendo em atenção que se tratam de indivíduos imunocomprometidos, e portanto, mais suscetíveis a infeções microbiológicas.

Quanto aos setores da Bioquímica e Hematologia, é descrito de forma sucinta a rotina laboratorial e as metodologias a que recorrem.

Finalizando, também é destacado o Controlo de Qualidade que se efetua no SPC do IPOCFG, uma vez que garante a obtenção de resultados analíticos fidedignos e precisos.

## CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O SPC encontra-se situado no Edifício da Oncologia Médica e Laboratórios e está sob a responsabilidade do diretor de serviço Dr. Frederico Valido, envolvendo uma equipa de 34 pessoas com diferentes formações de base, desde médicos, farmacêuticos, bioquímicos, biólogos e técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, assim como pessoal administrativo e também auxiliar.

Quando um utente se dirige à receção deste piso, o pessoal administrativo da secretaria é o responsável por documentar os dados do utente e, com base nas requisições médicas, registar no programa informático *Modulab\**(*Werfen*) quais as análises a efetuar por parte dos diferentes setores. Assim sendo, é atribuído a cada utente um número de identificação composto por 9 dígitos, que engloba a data da colheita e o número da amostra dessa mesma data (p. ex. 190204153); e que facilita o fluxo das amostras no laboratório, constituindo, portanto, uma etapa fundamental da fase pré-analítica.

Aquando a chamada do seu nome, o utente dirige-se à sala das colheitas para que os técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica possam efetuar a colheita de sangue para os contentores adequados, consoante as análises previamente requisitadas pelo médico. Quanto aos doentes internados no IPOCFG, as suas amostras são colhidas e depois enviadas para o SPC, passando também pelo registo na secretaria. Por norma, são colhidas em média 350 amostras por dia.

Após a realização das colheitas, os contentores são devidamente etiquetados e, juntamente com a própria requisição, são distribuídos pelos setores – Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia – onde se procede de imediato ao registo da amostra e ao seu correto processamento analítico. Cada um destes setores possui os seus equipamentos e tecnologias, conforme demonstrado nas tabelas enumeradas de I a 4.

No setor de Hematologia predominam as amostras de sangue total, plasma e medula óssea. Relativamente ao setor de Microbiologia, existe a maior variedade de amostras, podendo elas ser de urina, expetoração, lavados brônquicos, fezes, sangue total (hemoculturas), pontas de cateter, exsudatos (vaginal, pleural, purulento), fâneros e raspados de pele. No que toca aos setores de Bioquímica e de Imunologia/Hormonologia, os produtos biológicos mais comuns incluem o soro e plasma, podendo também surgir outros tipos de produtos (urina, líquido, ascítico, líquido cefalorraquidiano, etc.).

---

\* Este programa informático permite o acesso aos processos dos utentes, desde todas as solicitações analíticas até à emissão dos resultados definitivos.

Tabela 1 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Hematologia.

<b>Hematologia</b>	
<b>Equipamento (Casa comercial)</b>	<b>Função</b>
Aerospray 7150 Slide Stainer Centrifuge (Wescor)	Coloração de esfregaços sanguíneos
Coulter LH 750 Analyzer (Beckman Coulter)	Hemograma
Spiramix 10 (Denley)	Homogeneização das amostras
Test1 BCL (Alifax)	Velocidade de sedimentação
ACL Top CTS 500 (Instrumentation Laboratory)	Provas de coagulação
Microscópio ótico (Leitz Laborlux S)	Observação de esfregaços sanguíneos
Cytomics FC500 (Beckman Coulter)	Imunofenotipagem (citometria de fluxo)
GeneXpert® (Cepheid)	Deteção do gene <i>BCR-ABL</i> por PCR em tempo real

Tabela 2 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Microbiologia.

<b>Microbiologia</b>	
<b>Equipamento (Casa comercial)</b>	<b>Função</b>
Bactec™ 9050 Blood Culture System (BD)	Armazenamento e estufa de hemoculturas
Câmara de fluxo laminar (Forma Scientific)	Atmosfera protetora para manipulação de amostras microbiológicas
Miditron®ST (Mannheim Boehringer)	Contagem de elementos figurados no sedimento urinário
Cobas® u411 (Roche)	Análise sumária da urina
Microscópio ótico (Leitz Laborlux K)	Observação do sedimento urinário e esfregaços bacterianos
GeneXpert® (Cepheid)	Deteção de DNA bacteriano por PCR em tempo real
Vitek® 2 Compact 15 (BioMérieux)	Identificação dos microrganismos e estudo da suscetibilidade antimicrobiana



Tabela 3 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Bioquímica.

<b>Bioquímica Clínica</b>	
<b>Equipamento (Casa comercial)</b>	<b>Função</b>
Cobas® 6000 c501 (Roche)	Autoanalizador
Cobas® 4000 c311 (Roche)	Autoanalizador
ABL800® Flex (Radiometer)	Calcímetro (Ca <sup>2+</sup> ionizado)
AQT90® Flex (Radiometer)	Autoanalizador (marcadores cardíacos)
RAPIDChem® 744 (Siemens)	Ionogramas
RAPIDLab® 1265 (Siemens)	Gasometrias
Reflotron® Plus (Roche)	Química seca por tiras-teste reativas (confirmação de resultados)

Tabela 4 - Equipamentos e respetivas funções presentes no setor de Imunologia/Hormonologia.

<b>Imunologia/Hormonologia</b>	
<b>Equipamento (Casa comercial)</b>	<b>Função</b>
VersaCell X3® System (Siemens)	Distribuição de amostras
Immulate® 2000 XPi (Siemens)	Autoanalizador
Advia Centaur® XP (Siemens)	Autoanalizador
Mago4® Plus (Diamedix Corporation)	Autoanalizador (autoimunidade)
Liaison® (DiaSorin)	Autoanalizador
Viva-E® (Siemens)	Autoanalizador
Cobas® 6000 e601 (Roche)	Autoanalizador
Brahms Kryptor® Compact Plus (ThermoFisher Scientific)	Autoanalizador
BN ProSpec® (Siemens)	Autoanalizador
Optilite® (Binding Site)	Autoanalizador
UniCAP™ 100 (ThermoFisher Scientific)	Autoanalizador (autoimunidade)
Wizard 1470 Gamma Counter (Wallac)	Contador de radiação gama
Hydrasys® (Sebia)	Eletroforese de proteínas e Imunofixação

# ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

## I. BIOQUÍMICA

O setor de Bioquímica encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Luís Nina, Assistente Hospitalar Graduado Especialista em Patologia Clínica. Trata-se de um setor bastante automatizado e cuja relevância se prende com a análise bioquímica e metabólica de vários órgãos, sendo mais comum a avaliação dos parâmetros hepáticos, renais e cardíacos.

Grande parte das amostras enviadas para este setor são de sangue total, colhidos para tubos revestidos com sílica, sem anticoagulante e com esferas de sílica procoagulantes, que promovem a ativação da cascata da coagulação. Após o registo dos tubos, estes são sujeitos a uma centrifugação (3000 rpm durante 10 minutos) para se obter o soro sanguíneo, sendo este o fluido biológico mais usado neste setor na determinação dos diversos parâmetros bioquímicos (iões, enzimas, proteínas).

Para além do soro, podem também ser recebidos tubos de sangue total com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássio ( $K_3$ -EDTA), utilizados para a determinação da hemoglobina glicada (Hb A<sub>1c</sub>) e marcadores cardíacos, assim como seringas com heparina balanceada, usados na colheita de sangue arterial para a determinação do cálcio ionizado e gasometria.

Existem outros fluídos que surgem com menos frequência, como por exemplo líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido ascítico, líquido pleural, urina pontual e urina das 24 horas; que sofrem um tratamento prévio (homogeneização e centrifugação) antes de serem processados. A Tabela 5 mostra os parâmetros bioquímicos avaliados em cada equipamento e qual o método usado na respetiva determinação.

Após o doseamento dos parâmetros, os valores obtidos são enviados para o programa informático *Modulab*, de modo a efetuar-se a validação biopatológica e a emissão do boletim de resultados para o clínico.

Durante a minha passagem por este setor, foi-me permitido acompanhar todo o percurso das amostras, desde o seu registo inicial até ao processamento no respetivo equipamento. Presenciei alguns momentos da validação biopatológica, com o intuito de correlacionar os valores obtidos com o histórico clínico do utente.

Tabela 5 - Equipamentos do setor de Bioquímica do IPOCFG, com os respectivos parâmetros analisados e método de detecção.

Metodologia	Parâmetros analisados
<b>Cobas® 6000 c501 (Roche)</b>	
Enzimático	Ureia, Glicose, Lactato desidrogenase, Ião amônia, Creatinina cinase, Alanina aminotransferase, Aspartato aminotransferase
Potenciometria indireta	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>
Turbidimetria	Proteínas totais na urina
Colorimetria enzimática	Creatinina, , Proteínas totais séricas, Albumina, Colesterol total, Colesterol-LDL, Colesterol-HDL, Triglicerídeos, Ácido úrico, γ-glutamilttransferase
Colorimetria	Ferro sérico, Magnésio, Fosfatase alcalina, Fosfatase ácida total, Fosfatase ácida prostática, Amilase, Lipase, Cálcio, Cobre, Capacidade total de fixação do ferro, Bilirrubina total, Bilirrubina conjugada, Fósforo
<b>RAPIDLab® 1265 (Siemens)</b>	
Potenciometria direta	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , Lactato, Hemoglobina total
<b>AQT90® FLEX (Radiometer)</b>	
Quimioluminescência	Marcadores cardíacos (Troponinas I e T, CK-MB, Mioglobina)
<b>Cobas® 4000 c311 (Roche)</b>	
Turbidimetria	Hb A1c
<b>ABL800® Flex (Radiometer)</b>	
Potenciometria direta	Cálcio ionizado

## II. HEMATOLOGIA

O setor de Hematologia está à responsabilidade da Dr.<sup>a</sup> Isabel Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada Especialista em Patologia Clínica.

Este setor é de extrema importância no *follow-up* das doenças oncológicas, pois devido aos tratamentos de quimioterapia, praticamente todos os doentes desenvolvem anemia. Posto isto, a realização do hemograma permite ao clínico acompanhar a progressão da doença e também monitorizá-la da melhor forma. Além disso, o risco de tromboembolismo venoso está aumentado em pacientes oncológicos e também associada a um pior prognóstico, sendo fulcral a realização das provas de coagulação.

As amostras mais comuns neste setor são o sangue total e o plasma. O sangue total é obtido através da colheita para tubos com K<sub>3</sub>-EDTA, que vai interromper a cascata da coagulação e evitar a formação de soro, para além de preservar a morfologia das células sanguíneas. Já o plasma é obtido pela colheita para tubos com citrato, que vai também evitar a cascata da coagulação, permitindo preservar os fatores que nela participam.

Assim que os tubos são entregues, é dada a entrada das amostras no setor através do programa *Modulab* e procede-se à sua imediata homogeneização (tubos com K<sub>3</sub>-EDTA) ou centrifugação (tubos com citrato). A homogeneização do sangue total facilita a contagem das células aquando a realização do hemograma e tem como objetivo evitar a formação de agregados plaquetares. A centrifugação dos tubos com citrato (proporção 9:1) é efetuada a 3000 rpm durante 10 minutos, de modo a se obter o plasma sanguíneo.

Para se obter um hemograma, os tubos de K<sub>3</sub>-EDTA são colocados no analisador LH 750 *Coulter*, que vai proceder à contagem diferencial das células sanguíneas e também diferenciar as populações leucocitárias.

Assim que é emitido o resultado do hemograma, os mesmos tubos são inseridos no equipamento Testl BCL, que vai proceder à medição da velocidade de sedimentação. Nos casos em que o volume de amostra é muito reduzido, a velocidade de sedimentação é medida manualmente pelo método de *Westergren*. Sabendo que muitos destes pacientes desenvolvem uma anemia da doença crónica, a velocidade de sedimentação funciona como um marcador de inflamação.

Para os testes da coagulação, os tubos com plasma são colocados no ACL Top 500, sendo feita a determinação do tempo de tromboplastina parcialmente ativada, tempo de protrombina, tempo de trombina, D-dímeros, quantificação de fibrinogénio e pesquisa de anticoagulante lúpico.

Por vezes surgem alarmes no hemograma que indicam a presença de blastos e/ou células sanguíneas imaturas no sangue ou um aumento significativo na contagem dos leucócitos. Nestes casos, é mandatário a execução de um esfregaço de sangue periférico, posteriormente corado pela coloração *Wright-Giemsa* para observação ao microscópio ótico e contagem diferencial dos leucócitos (até 100 células), de modo a identificar as diferentes linhagens celulares.

Com alguma frequência chegam ao setor de Hematologia aspirados de medula óssea (colhidos por punção lombar), cujos esfregaços são corados pela coloração de *Perls* (visualização dos fragmentos e depósitos de ferro) e também pela coloração de *Wright-Giemsa* (identificação e contagem das células sanguíneas).

É neste setor que também se recorre à deteção do gene de fusão *BCR-ABL*, responsável pelo surgimento da leucemia mieloide crónica. A sua deteção é feita em sangue total e através de PCR em tempo real, permitindo monitorizar o nível da doença no paciente.

Pode ainda ser requisitada a imunofenotipagem das células sanguíneas através de citometria fluxo.

Ao longo da minha passagem neste setor, foi-me possibilitado aprender e realizar toda a rotina laboratorial (processamento das amostras), inclusive a observação de esfregaços sanguíneos ao microscópio ótico. Existe um vasto leque de doenças oncológicas que surgem para análise, sendo de realçar algumas patologias, como a leucemia linfocítica/mieloide crónica, mieloma múltiplo, linfocitose e síndromes mielodisplásicas. Infelizmente, não foi exequível a aprendizagem acerca da citometria de fluxo e foram raros os momentos em que estive em contato com a validação biopatológica.

### III. IMUNOLOGIA/HORMONOLOGIA

O setor de Imunologia/Hormonologia encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Nuno Cunha, Técnico Superior de Saúde Especialista em Análises Clínicas. Trata-se de um setor onde se utilizam diversas metodologias analíticas para a quantificação de hormonas, proteínas, anticorpos, autoanticorpos, marcadores tumorais séricos e alguns fármacos; que em associação contribuem para a monitorização do doente oncológico e da sua terapêutica. A grande maioria das determinações são efetuadas por equipamentos automatizados; porém, existem ainda alguns parâmetros que são doseados através de técnicas manuais.

Os produtos biológicos mais comuns para a determinação dos parâmetros analíticos são o soro, plasma e urina pontual ou das 24 horas. Também podem ser recebidas amostras de biópsia aspirativa de agulha fina, para a determinação da tiroglobulina ou da calcitonina.

O soro obtém-se pela colheita de sangue venoso para um tubo sem anticoagulante, cujas paredes são revestidas de sílica e que possui um gel separador, facilitando a ativação da cascata da coagulação. O plasma é obtido pela colheita de sangue para tubos com K<sub>3</sub>-EDTA, um anticoagulante que inibe a cascata da coagulação. A centrifugação destes produtos é feita a 2000 g durante 10 minutos. De realçar que tanto a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) como as metanefrinas e normetanefrinas são instáveis à temperatura ambiente, e por isso requerem uma centrifugação a frio (6-8°C).

Após a centrifugação, as amostras são analisadas nos respetivos equipamentos, consoante os parâmetros analíticos requisitados, descritos na Tabela 6. O soro obtido para as técnicas manuais é separado para um tubo secundário e armazenado a -20°C até ao momento da realização da respetiva técnica. Na Tabela 7 estão representados os parâmetros analisados por técnicas manuais.

É também neste setor que se procede à execução dos proteinogramas e das imunofixações (soro ou urina). Os proteinogramas têm como objetivo a deteção de anomalias no perfil proteico e as imunofixações permitem a separação e caracterização dos diferentes tipos de imunoglobulinas (incluindo as cadeias leves e pesadas), com o intuito de se detetarem componentes monoclonais. Tanto os proteinogramas como as imunofixações são análises pedidas com grande frequência para a monitorização de pacientes com doenças hematológicas, como é o caso de gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiplo e macroglobulinemia de *Waldenström*.

Tabela 6 - Respetivos parâmetros e metodologias dos diversos equipamentos automatizados do setor de Imunologia e Hormonologia.

Equipamento	Parâmetros analisados	Metodologia
<b>Immulite® 2000 XPi</b>	CEA, Eritropoietina, AFP, Anticorpos anti-tiroglobulina e anti-peroxidase, BMG, Calcitonina, PSA total e livre, Gastrina, GRH, HCG total, IGF-I, $\Delta$ 4-androstenediona, ACTH, Anticorpos estimuladores da tiroide	Quimioluminescência
<b>Advia Centaur® XP</b>	IgE total, 25OH-vitamina D total, LH, TSH, FSH, PTH, Estradiol, Progesterona, DHEAS, Ferritina, Prolactina	Quimioluminescência
<b>Liaison®</b>	Renina, Proteína S-100 $\beta$ , Anticorpos anti-rubéola (IgM e IgG), anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgM e IgG), anti-HSV 1 e 2 (IgM e IgG) e anti-EBV (IgM, EBNA IgG, VCA IgG, EA IgG)	Quimioluminescência
<b>Viva-E®</b>	Metotrexato, Carbamazepina, Ácido valpróico, Gentamicina, Fenitoína, Fenobarbital	Imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT)
<b>Cobas® 6000 e601</b>	CA 19.9, CA 72.4, CA 125, Cortisol, Testosterona total, Tiroglobulina (2ª geração), HE-4, ProGRP, Ácido fólico, Vitamina B12, TRABs, T <sub>3</sub> total e livre, T <sub>4</sub> total e livre	Eletroquimioluminescência
<b>Kryptor® Compact Plus</b>	NSE, Procalcitonina, , CA 15.3, SCCA, Cromogranina A	<i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)</i>
<b>BN ProSpec®</b>	Proteína-C reativa, Complemento C3 e C4, Transferrina, Recetores solúveis da transferrina, Fator reumatoide, IgA, IgG, IgM, $\alpha$ I-antitripsina, Haptoglobina, Ceruloplasmina, Homocisteína	Nefelometria
<b>Optilite®</b>	Cadeias leves Kappa e Lambda	Turbidimetria

Tabela 7 - Parâmetros analisados no setor de Imunologia e Hormonologia por técnicas manuais e consoante o tipo de amostra.

Produto biológico	Parâmetros analisados por Técnicas Manuais
Urina	Iodo, Ácido vanilmandélico, Metanefrina, Normetanefrina, Ácido 5-hidroxi-indolacético.
Soro	Testosterona livre, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, Dehidroepiandrosterona, Polipeptídeo pancreático, Aldosterona.
Plasma	Glucagina, Metanefrinas, Normetanefrinas, 3-metoxitiramina, Peptídeo vasoativo intestinal.

## PRINCÍPIOS DA INSTRUMENTAÇÃO

Tanto os equipamentos automatizados como as técnicas manuais baseiam-se em imunoensaios, que se caracterizam fundamentalmente por uma reação antigénio-anticorpo que origina a formação de imunocomplexos. Esta reação por norma ocorre entre duas moléculas proteicas, o antigénio, que pode ser uma glicoproteína ou lipoproteína; e o anticorpo, que se trata de uma glicoproteína (Montero, 2003). A interação entre o antigénio e o anticorpo deve ser de elevada especificidade e sensibilidade, obtida pela utilização de anticorpos monoclonais específicos para o antigénio-alvo, evitando ao mínimo a possibilidade de reações cruzadas.

Os imunocomplexos podem ser obtidos por diferentes metodologias, como é o caso dos métodos não competitivos (em “sandwich”) e os métodos competitivos. No método não competitivo decorre a ligação do antigénio-alvo a um anticorpo fixado numa superfície (representado na Figura 1), sendo posteriormente adicionado um segundo anticorpo marcado que se vai ligar ao antigénio-alvo (“sandwich”). Neste caso, quanto maior for a quantidade de antigénio-alvo, maior será o sinal resultante, sendo diretamente proporcionais.

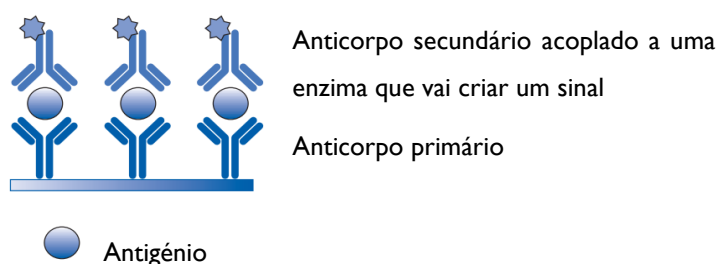


Figura 1 - Imunoensaio não competitivo ("sandwich"). (Retirado do livro Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control – Elsevier (2014)).



Na reação competitiva surge, tal como o nome indica, uma competição entre o antígeno-alvo e um antígeno análogo marcado com um composto (fluorocromo, radioisótopo, etc.) para o local de ligação dos anticorpos que se encontram fixos numa superfície sólida. Desta forma, quanto maior for a quantidade de antígeno-alvo, menor será o sinal obtido e vice-versa, havendo uma proporcionalidade inversa (esquematizado na Figura 2).

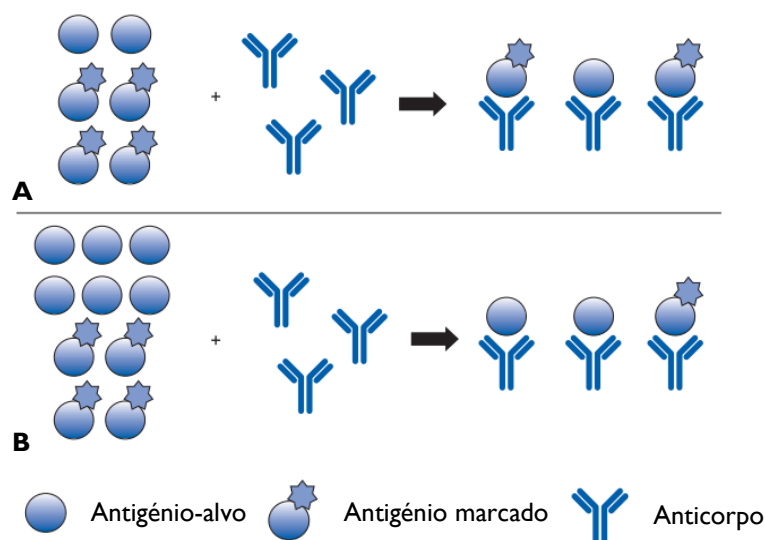


Figura 2 - Imunoensaio competitivo, demonstrando a proporcionalidade inversa. **A** – Antígeno-alvo presente em baixas quantidades. **B** – Antígeno-alvo presente em grandes quantidades. (Retirado do livro *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control* – Elsevier (2014)).

Após a formação dos imunocomplexos, procede-se à sua deteção, que pode variar no tipo de leitura e/ou no tipo de marcador utilizado.

## 1. Nefelometria e Turbidimetria

A nefelometria é um método espectrofotométrico caracterizado pela medição da luz dispersa num ângulo de 13 a 24° numa suspensão, de modo a determinar a concentração de partículas suspensas na amostra (Harris, 2010). Já a turbidimetria diz respeito à deteção e medição, por um detetor localizado a 180°, de uma redução na intensidade de um feixe de luz que atravessa a solução-amostra, redução essa que acontece devido aos fenómenos de dispersão, refletância e absorção da luz (Dasgupta e Wahed, 2014).

No que toca à nefelometria, as partículas referem-se aos imunocomplexos formados e a luz dispersada é depois detetada por um sensor fotodíodo, tornando-se mensurável como densidade ótica. O princípio da nefelometria e turbidimetria está ilustrado na Figura 3.

A vantagem destas técnicas prende-se com o facto de os imunocomplexos causarem a turvação da amostra, o que faz com que seja possível a quantificação dos mesmos (Dasgupta e Wahed, 2014).

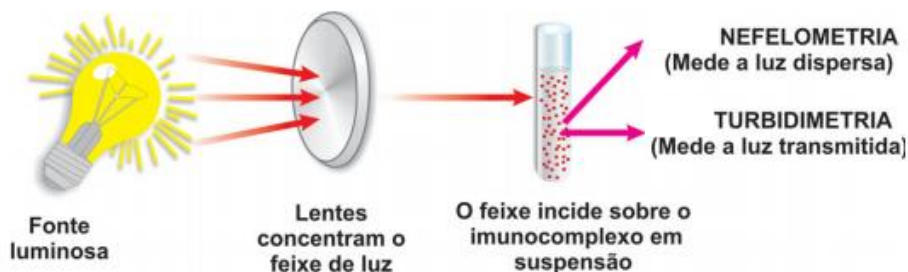


Figura 3 - Esquema do princípio físico da nefelometria e da turbidimetria. (Fonte: <https://www.sobrau.com/wp-content/uploads/2016/11/Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf>)

## 2. Quimioluminescência

A quimioluminescência é um método em que o evento de excitação é causado por uma reação química e não por um estímulo luminoso (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Quando o composto excitado regressa ao estado fundamental decorre a emissão de luz, que é detetada por um tubo fotomultiplicador. No contexto dos imunoensaios, recorrem-se a anticorpos marcados com uma enzima e após a conjugação ao antigénio-alvo, essa enzima hidrolisa um substrato luminogénico, desencadeando a reação de quimioluminescência.

A grande maioria dos parâmetros analisados neste setor são quantificados através da imunoquimioluminescência, uma vez que apresenta uma elevada sensibilidade e completa automatização (Zhao, Sun e Chu, 2009).

## 3. Eletroquimioluminescência

Apesar de seguir o mesmo princípio da reação de quimioluminescência, a diferença reside na necessidade de um estímulo elétrico aplicado através de uma corrente elétrica. A eletroquimioluminescência envolve a formação de iões na superfície do eletrodo que são sujeitos a reações de transferência de eletrões criando estados energéticos que posteriormente emitem luz (Richter, 2004). Nos imunoensaios, consoante o método competitivo ou não competitivo, obtêm-se imunocomplexos marcados com ruténio que interagem com a tripropilamina (TPA). Quando é aplicado um potencial elétrico na superfície do eletrodo dá-se a excitação do ruténio e a TPA faz com que este regresse ao seu estado fundamental através de reações redox entre ambos (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). A luz emitida pelo ruténio é detetada por um tubo fotomultiplicador e medida, permitindo a

extrapolação da concentração através de uma curva de calibração, que transcreve a quantidade de analito presente na amostra.

#### 4. *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)*

Trata-se de uma técnica que se baseia na transferência de energia fluorescente entre o criptato (dador de energia) e o fluorocromo XL665 (recetor de energia), levando à emissão de um sinal de fluorescência de longa duração (Alpha-Bazin *et al.*, 2000). O antigénio liga-se ao anticorpo marcado com o criptato e também ao anticorpo marcado com o fluorocromo, formando um imunocomplexo pelo método em “sandwich”. Isto faz com que ocorra a transferência de energia, fazendo com que haja a excitação do fluorocromo e posterior emissão de um sinal fluorescente.

A grande vantagem desta reação homogénea prende-se com o facto de não ser influenciada pelas condições da amostra (hemólise, turvação, cor, etc.) e porque dispensa lavagens intermédias, evitando desperdícios da amostra e também a possibilidade de erros.

#### 5. Imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT)

Esta técnica é utilizada com o intuito de monitorizar/ajustar a terapêutica do paciente oncológico. Consiste na competição entre o antigénio da amostra (fármaco) e um antigénio análogo marcado com a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) para os locais de ligação dos anticorpos (Figura 4). A enzima marcada com G6PD apenas está ativa quando se encontra livre, podendo nessa situação converter o NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) a NADH, permitindo a leitura da absorvância a 340 nm (Datta, 2019). Assim sendo, quando a enzima se encontra associada a um anticorpo, a atividade enzimática diminui, pelo que a concentração de fármaco na amostra pode ser quantificada fotometricamente em termos da atividade enzimática.



Figura 4 – Esquema representativo do imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT). (Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/A-summary-of-the-most-commonly-employed-homogeneous-competitive-assays-in-TDM-Touw-et\\_fig1\\_273955785](https://www.researchgate.net/figure/A-summary-of-the-most-commonly-employed-homogeneous-competitive-assays-in-TDM-Touw-et_fig1_273955785))

## 6. Radioimunoensaio (RIA)

São técnicas manuais que abrangem radioimunoensaios competitivos, em que o antigénio análogo ao antigénio da amostra se encontra marcado com um radioisótopo, sendo o mais comum o radioisótopo de iodo ( $^{125}\text{I}$ ). A leitura da radioatividade gerada é depois feita num contador gama. Este método ainda é usado porque permite a quantificação de pequenas hormonas com uma grande sensibilidade e precisão, apesar de já se encontrar em desuso na rotina laboratorial e existirem alternativas mais ecológicas e menos nocivas.

## MARCADORES TUMORAIS

Tal como já referido, é no setor de Imunologia/Hormonologia que são determinados os marcadores tumorais séricos. Estes marcadores são definidos como substâncias produzidas pelos tumores e que podem ser encontradas no sangue, fluidos corporais ou tecidos (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Abrangem uma infinidade de variáveis moleculares, clínicas e/ou patológicas que refletem, parcial ou totalmente, o comportamento biológico de uma neoplasia maligna em diferentes regiões do corpo humano (Daniel e Lalitha, 2016). São várias as aplicações dos marcadores tumorais na doença oncológica, tais como: rastreio e deteção precoce, diagnóstico diferencial, estadiamento clínico, prognóstico, localização do tumor e monitorização da terapêutica (Molina *et al.*, 2011).

Idealmente, um marcador tumoral deve ser produzido pelas células tumorais e detetável nos fluidos corporais, assim como não deve estar presente em pessoas saudáveis ou em condições benignas (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Todavia, isto nem sempre se verifica, uma vez que estes marcadores nem sempre são específicos de um tipo de cancro. Por isso, a especificidade de um marcador tumoral não está propriamente relacionada com a sua presença, mas sim com a concentração detetada na corrente sanguínea (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

Os marcadores tumorais são na sua maioria proteínas, podendo abranger antigénios de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormonas (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). Na Figura 5 estão representados alguns marcadores tumorais e as neoplasias malignas associadas, no sexo masculino e feminino.

Atendendo à sua importância clínica, a deteção e a análise destes marcadores são uma peça-chave para a avaliação e monitorização do utente oncológico, com o intuito de se oferecer a terapêutica mais adequada.

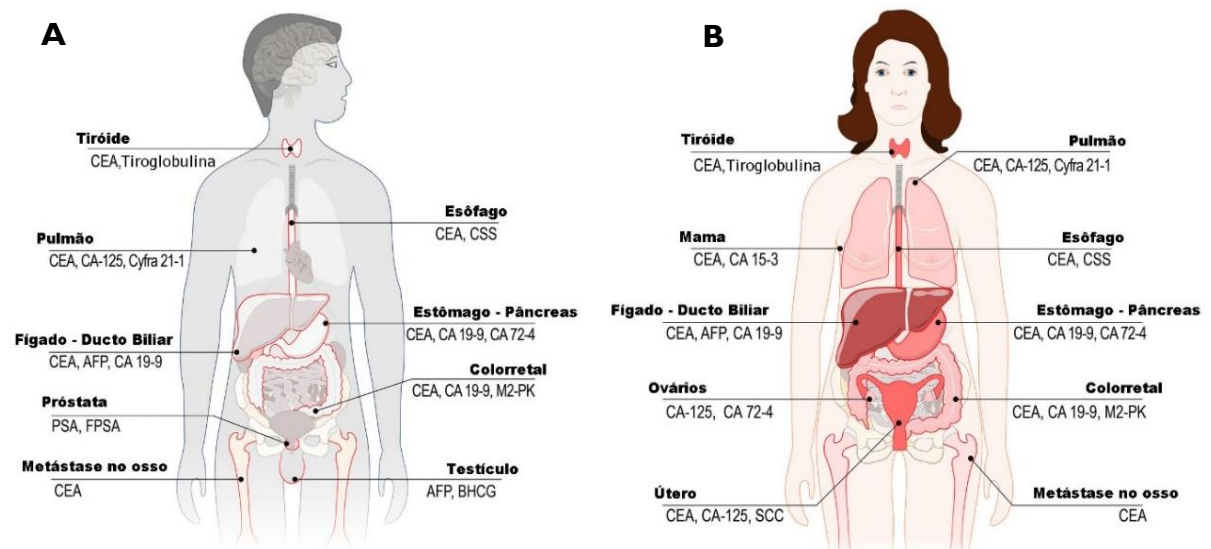


Figura 5 - Exemplos de marcadores tumorais que se podem determinar consoante o tipo de neoplasia maligna, no sexo masculino (A) e no sexo feminino (B). (Fonte: <https://conceitos.com/marcadores-tumorais/>)

## I. Antígenos oncofetais

### I.1. Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O CEA é uma glicoproteína intracelular pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Está presente em concentrações pouco significativas no intestino embrionário e fetal, e no sangue de adultos saudáveis (Borda *et al.*, 2016).

Valores elevados deste marcador tumoral estão por norma correlacionados com o carcinoma colorretal. Apesar de não ser um marcador específico, pode encontrar-se em concentrações elevadas em outros tipos de tumores, tais como: pulmão, mama, gástrico, pancreático, ovário e uterino (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Além do mais, há estudos que corroboram que o CEA participa ativamente no desenvolvimento de metástases em doentes com carcinoma colorretal (Jessup e Thomas, 1989).

A sua utilidade clínica prende-se com a avaliação do prognóstico, estadiamento e monitorização terapêutica.

### I.2. $\alpha$ -Fetoproteína (AFP)

A AFP é uma glicoproteína oncofetal (Seifert, Berry e Grundmann, 1987) cuja síntese é elevada durante o desenvolvimento embrionário do saco vitelino, fígado e intestino fetal (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Chamhum De Almeida *et al.*, 2007), sendo considerada a “albumina fetal”. Apesar da concentração elevada durante a gravidez, ela vai diminuindo à medida que vai sendo substituída pela albumina, sendo praticamente indetetável no indivíduo adulto (Seifert, Berry e Grundmann, 1987).

Todavia, alguns tecidos readquirem a capacidade de voltar a sintetizar a AFP quando sujeitos a alterações malignas (Dasgupta e Wahed, 2014). As causas mais comuns relacionadas com o aumento da AFP são o carcinoma hepatocelular e tumores nas células germinativas não-seminomatosas (testículos) (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Dasgupta e Wahed, 2014; Molina *et al.*, 2011). Com menor frequência, esta proteína pode também estar elevada em neoplasias gastrointestinais, o que por norma está associado a um pior prognóstico (Molina *et al.*, 2011).

Apesar da sua utilização como marcador tumoral, é importante ter em consideração que elevações da AFP podem surgir em situações patológicas não neoplásicas, como é o caso das hepatopatias benignas (p. ex. hepatite) (Molina *et al.*, 2011).

## **2. Antígenos tumorais**

### **2.1. Antígeno Carboidrato 15.3 (CA 15.3)**

O CA 15.3 é uma glicoproteína sintetizada pelas células epiteliais glandulares e é considerado um dos marcadores tumorais de excelência do cancro da mama. As suas concentrações variam consoante o estadiamento clínico do paciente (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). Para além do cancro da mama, este marcador também se apresenta em concentrações elevadas noutras doenças malignas, como é o caso do cancro do pâncreas, pulmão, ovário, colorretal e fígado (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

Tem bastante utilidade clínica na monitorização da terapêutica e estudo da doença em doentes com cancro da mama metastizado (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016), assim como no diagnóstico precoce de uma recidiva (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

### **2.2. Antígeno Carboidrato (CA 125)**

Sendo também uma glicoproteína, o CA 125 é sintetizado pelas células do carcinoma ovárico, tratando-se de um marcador tumoral usado na monitorização do cancro do ovário (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Apresenta uma sensibilidade significativa para o diagnóstico do cancro do ovário, apesar dessa sensibilidade variar com os diferentes estádios da doença.

A sua principal utilidade é o acompanhamento da resposta à terapêutica e a predição de recorrências nos casos de carcinoma do ovário (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2019). É também útil na diferenciação entre tumores malignos e benignos em mulheres (principalmente pós-menopáusicas) com massas anexiais suspeitas, uma vez que a intervenção cirúrgica para excisão dos tumores malignos é mais complexa que para os benignos (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

### **2.3. Antígeno Carboidrato (CA 19.9)**

O CA 19.9 trata-se de um antígeno carboidrato de superfície celular, que é libertado da superfície das células tumorais para a corrente sanguínea (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). É um marcador de tumores gastrointestinais, destacando-se a sua importância clínica em carcinomas do pâncreas (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Nesse tipo de carcinoma, este marcador tumoral é determinado em primeira linha para o diagnóstico diferencial com a pancreatite (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). Para além do cancro pancreático, o CA 19.9 também se encontra em níveis elevados no cancro colorretal, desempenhando um papel importante na avaliação do estadiamento e da monitorização da terapêutica no que toca a essas doenças malignas (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

A sua maior aplicabilidade a nível clínico reside na avaliação da resposta à quimioterapia instituída a pacientes com carcinoma do pâncreas (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

### **2.4. Antígeno Carboidrato (CA 72.4)**

O CA 72.4, apesar de se tratar de um marcador tumoral que não reflete uma sensibilidade característica para um determinado órgão, apresenta uma especificidade significativa para as doenças malignas (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

O aumento da concentração do CA 72.4 ocorre principalmente em pacientes com carcinoma gástrico ou mucinoso do ovário, assim como em outros tipos de carcinoma (mama, pulmão e próstata), porém em menor percentagem (Guadagni *et al.*, 1995).

Devido à sua elevada especificidade e quando associado a outros marcadores tumorais (CEA e CA 19.9 para o carcinoma gástrico e CA 125 para o carcinoma do ovário), o CA 72.4 permite um aumento da sensibilidade diagnóstica e no seguimento da terapêutica.

## **3. Citoqueratinas**

### **3.1. Fragmento da Citoqueratina 19 (CYFRA 21.1)**

As citoqueratinas são um grupo de proteínas que constituem o citoesqueleto dos filamentos que integram as células epiteliais (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Podem encontrar-se aumentos da expressão da citoqueratina 19 em tumores pulmonares em relação ao tecido normal, uma vez que após a lise celular, necrose ou apoptose, os fragmentos dessa citoqueratina atingem a circulação periférica, sendo depois eliminados por via renal (Ruibal *et al.*, 2002).

O marcador tumoral CYFRA 21.1 encontra-se elevado em todos os tipos de cancro pulmonar, embora apresente uma maior sensibilidade para o carcinoma pulmonar de não pequenas células (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

### **3.2. Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA)**

O SCCA compreende dois tipos de proteínas praticamente semelhantes, SCCA-1 e SCCA-2, que possuem propriedades inibitórias das proteinases (Gadducci *et al.*, 2008), o que reflete uma alteração na proliferação das células epiteliais (Strauss *et al.*, 2002).

Este marcador tumoral é detetado em níveis elevados no soro de doentes com carcinomas de células escamosas, tais como carcinoma do colo do útero, pulmão, cabeça e pescoço e esófago.

Tem sido demonstrado que o SCCA é um marcador útil no acompanhamento e monitorização da terapia e que os seus níveis de crescentes poderão antever recidivas, uma vez que a sua concentração reflete o prognóstico (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

## **4. Hormonas**

### **4.1. $\beta$ -Gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG)**

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) diz respeito uma hormona glicoproteica que é composta por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$  (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Dasgupta e Wahed, 2014; Molina *et al.*, 2011). A subunidade  $\beta$  é sintetizada em grandes quantidades pelas células embrionárias sinciciais da placenta e também pela hipófise e outros órgãos (testículos, fígado e cólon), mas em menores quantidades (Dasgupta e Wahed, 2014; Molina *et al.*, 2011).

Concentrações elevadas da  $\beta$ -hCG podem observar-se na gravidez, na doença trofoblástica e em tumores das células germinativas (testículos e ovários) (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). A deteção de níveis incrementados da  $\beta$ -hCG na ausência de gestação, fazem suspeitar da existência de um tumor maligno (Molina *et al.*, 2011). Contudo, é essencial excluir a possibilidade de falsos positivos, como é o caso da presença de anticorpos heterófilos, lúpus ou insuficiência renal; para que não se proceda a um diagnóstico incorreto que conduza a tratamentos desnecessários (Dasgupta e Wahed, 2014).

Deste modo, a aplicação desta hormona como marcador tumoral dirige-se para tumores trofoblásticos e neoplasias germinativas do testículo e do ovário (Molina *et al.*, 2011), assim como para a monitorização do tratamento e progressão da doença, uma vez que as suas concentrações se correlacionam com o volume do tumor (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).



## 4.2. Calcitonina

A calcitonina é uma hormona polipeptídica secretada pelas células C parafoliculares da tiroide, em resposta a aumentos de cálcio no soro (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). O seu papel fisiológico é de antagonista da hormona paratiroideia (PTH), levando à inibição da libertação de cálcio pelos ossos, de modo a reduzir a sua concentração sanguínea (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

Uma concentração elevada desta hormona (>100 pg/ml) está por norma associada ao carcinoma medular da tiroide (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Porém, podem ser detetados incrementos da calcitonina em doenças autoimunes da tiroide (tiroidite de Hashimoto e doença de Graves), assim como noutras situações não neoplásicas, como é o caso da insuficiência renal, hipercalcémia e hipergastrinémia (Molina *et al.*, 2011).

A maior utilidade clínica da calcitonina como marcador tumoral prende-se com o seguimento dos pacientes com carcinoma medular da tiroide, com vista à monitorização terapêutica e à deteção de recorrências (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Chamhum De Almeida *et al.*, 2007).

## 4.3. Tiroglobulina

A tiroglobulina é uma glicoproteína produzida pela glândula da tiroide e serve de precursora das hormonas triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tiroxina (T<sub>4</sub>) (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Evans, Tennant e Perros, 2015).

A sua quantificação é de elevada importância na monitorização de pacientes com diagnóstico de cancro diferenciado da tiroide sujeitos a tireoidectomia total e à terapia com iodo (<sup>131</sup>I). Nestes casos, espera-se que o valor pós-cirurgia seja indetetáveis. Valores doseáveis crescentes de tiroglobulina indicam a existência de recorrências ou metástases (Evans, Tennant e Perros, 2015; Molina *et al.*, 2011).

É aconselhável a determinação analítica conjunta dos anticorpos anti-tiroglobulina, uma vez que estes competem pelo mesmo local de ligação dos anticorpos do imunoensaio (Molina *et al.*, 2011). De salientar ainda que qualquer distúrbio relacionado com a tiroide irá afetar os valores da tiroglobulina, como por exemplo: gravidez, doença de Graves e tiroidite subaguda (Molina *et al.*, 2011), pelo que o doseamento da tiroglobulina em doentes com cancro diferenciado tiroide é inespecífico.

## 5. Enzimas

### 5.1. Antigénio Específico da Próstata (PSA)

O PSA é uma serina-protease produzida pela próstata e tem sido amplamente utilizada na deteção do cancro da próstata, bem como na resposta à terapêutica e na previsão de recidivas (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016). Esta proteína é secretada no lúmen dos ductos prostáticos, existindo em grandes quantidades no líquido seminal (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). Nesse líquido, o PSA pode ser inativado pela clivagem de dois resíduos de lisina, originando uma isoforma designada por PSA livre (Molina *et al.*, 2011).

O PSA total, em conjunto com o toque retal, são duas ferramentas que permitem o diagnóstico precoce do cancro da próstata (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007). Porém, o PSA não é exclusivamente específico deste tipo de cancro e não se devem descuidar as situações benignas em que este marcador também poderá surgir aumentado, como por exemplo na prostatite e hipertrofia benigna da próstata. Uma ferramenta que ajuda a distinguir o carcinoma da próstata das situações benignas é a razão PSA livre/PSA total. Esta razão encontra-se reduzida nos pacientes com cancro da próstata, porque possuem baixas concentrações de PSA livre no soro; ao passo que em condições normais os níveis de PSA livre no soro são maiores, aumentando a razão (Dasgupta e Wahed, 2014).

### 5.2. Enolase Neuro-específica (NSE)

A NSE é uma enzima glicolítica intracelular (Chung-Esaki *et al.*, 2018) que se encontra no tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016), estando envolvida na síntese de ATP na glicólise (Seifert, Berry e Grundmann, 1987). Níveis elevados deste marcador tumoral podem ser encontrados em vários tipos de tumores neuroendócrinos, como por exemplo: células pequenas do pulmão, feocromocitoma e neuroblastoma (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016).

A sua concentração sérica parece correlacionar-se com o estadiamento do cancro proporciona um prognóstico útil para a progressão da doença (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Chamhum De Almeida *et al.*, 2007; Seifert, Berry e Grundmann, 1987).

## 6. Proteínas

### 6.1. Proteína S-100 $\beta$

A proteína S-100 $\beta$  pertence a uma família das proteínas intracelulares (as S-100) que estão relacionadas com a ligação ao cálcio (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016) e encontram-se nas

células da glia e nas células de Schwann do sistema nervoso central e periférico, bem como nos adipócitos, melanócitos e condrócitos (Molina *et al.*, 2011).

Uma vez que em condições normais os seus níveis são praticamente indetetáveis, a proteína S-100 $\beta$  torna-se num marcador tumoral sensível e com elevada especificidade para os casos de melanoma maligno; para além de que permite o diagnóstico diferencial com outros melanomas não-malignos (Molina *et al.*, 2011).

A utilidade desta proteína na prática clínica remete para o diagnóstico de melanoma maligno (Burtis, Bruns e Sawyer, 2016; Seifert, Berry e Grundmann, 1987), tendo em conta que a sua concentração sérica se relaciona com o estadiamento tumoral, prognóstico e resposta ao tratamento (Molina *et al.*, 2011).

## **6.2. $\beta_2$ -microglobulina (BMG)**

A BMG é uma proteína pertencente ao complexo major de histocompatibilidade da classe I (MHC-I) e que se encontra em todas as células nucleadas (Dasgupta e Wahed, 2014; Stevenson *et al.*, 2014). As concentrações desta proteína surgem elevadas em situações de linfomas, mieloma múltiplo e leucemia linfocítica crónica (Dasgupta e Wahed, 2014). Porém, níveis elevados de BMG também podem aparecer em casos de hepatite, tuberculose e infeções por HIV (Dasgupta e Wahed, 2014).

A sua utilidade clínica prende-se com o diagnóstico e monitorização do mieloma múltiplo, visto que é um dos fatores de prognóstico independentes (quanto maior a sua concentração, pior o prognóstico); estando também relacionado com a disfunção renal tubular e com a massa/volume tumoral (Chamhum De Almeida *et al.*, 2007; Dasgupta e Wahed, 2014; Stevenson *et al.*, 2014).

Durante a minha passagem pelo setor de Imunologia/Hormonologia, pude realizar praticamente toda a rotina diária do laboratório, desde o registo das amostras e o seu processamento. Também tive a oportunidade de executar a eletroforese de proteínas, eletroforese de hemoglobinas, imunofixações e algumas técnicas manuais (testosterona livre, aldosterona, metanefrinas/normetanefrinas urinárias, ácido vanilmandélico, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona e dehidroepiandrosterona).

## IV. MICROBIOLOGIA

O setor de Microbiologia do SPC no IPOCFG encontra-se sob a responsabilidade da Dr.<sup>a</sup> Maria Alexandre Mendes, Farmacêutica especialista em Análises Clínicas e Genética Humana. Trata-se de um setor com alguma relevância, uma vez que os doentes deste hospital são essencialmente pacientes imunocomprometidos e cujas defesas, ao estarem diminuídas, proporcionam o aparecimento de infeções. A importância deste setor prende-se então com a identificação do microrganismo que está a causar a infeção, de modo a poder-se instituir uma terapêutica antimicrobiana eficaz o mais rápido possível.

São diversas as análises microbiológicas que se efetuam neste setor, que englobam as análises bacteriológicas, micológicas, parasitológicas e também micobacteriológicas. Consoante o tipo de produto biológico e análises requeridas, existem procedimentos específicos para o seu processamento. Atualmente, a área da Microbiologia é ainda uma das áreas que mais depende de procedimentos/técnicas manuais, assim como da experiência laboratorial dos profissionais e também dos modos de colheita e transporte de amostras.

Os produtos biológicos mais analisados neste setor são, entre outras, urina, sangue, exsudados purulentos e secreções respiratórias; apesar de surgirem outros produtos com menor frequência, como é o caso de fezes, pontas de cateter, líquidos pleurais, líquidos cefalorraquidianos e exsudados vaginais.

Para uma boa manipulação dos produtos biológicos, estes precisam de ser colhidos de forma adequada, com o objetivo de se obter uma amostra com quantidade suficiente, de boa qualidade e devidamente acompanhada pela informação clínica (Fonseca *et al.*, 2004). Isto nem sempre se verifica, o que leva à sua rejeição. Tanto a análise macroscópica como microscópica são importantes na prática clínica, na medida em que podem levar à rejeição dos produtos, em casos de má colheita.

Além do mais, existem normas de segurança no que toca ao manuseamento das amostras, tais como: uso de luvas e de bata, uso de materiais e contentores esterilizados e manipulação dos produtos em condições próprias à sua não contaminação. Todas estas condições, em conjunto com uma boa colheita das amostras, são fulcrais para que não aconteça a contaminação das mesmas e para que não se emitam falsos resultados.

## PROCESSAMENTO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS

Regra geral, para se obter a identificação de um microrganismo é fundamental realizar certos procedimentos, como visualizar a morfologia dos microrganismos ao microscópio ótico após a execução de técnicas de coloração, observar o aspeto macroscópico das colónias obtidas nos exames culturais, e realizar provas específicas de identificação (Fonseca *et al.*, 2004).

### I. Sangue (hemoculturas)

A invasão da corrente sanguínea por microrganismos constitui uma das situações mais graves no que diz respeito às doenças infecciosas (Tille, 2017). Bacteriemia é o termo que traduz a existência de bactérias no sangue e, dado que este se trata de um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo coincide com o isolamento do agente etiológico da infeção (Fonseca *et al.*, 2004). Este tipo de infeções sistémicas são bastante preocupantes em pacientes imunocomprometidos que estão sob intervenção terapêutica ou quimioterapia, uma vez que podem ser fatais (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

No contexto do IPOCFG, os microrganismos que causam este tipo de infeção mais frequentemente são: *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Candida spp.*

#### I.1. Colheita

A colheita do sangue para hemocultura é efetuada por punção venosa de veias periféricas ou de cateter, sendo que devem fazer-se colheitas em diferentes veias e realizar-se mais que uma hemocultura (Fonseca *et al.*, 2004). A assepsia da pele antes de se efetuar a colheita de sangue é de extrema importância, para evitar que microrganismos da microbiota da pele cresçam nos meios de cultura. O processo de desinfeção implica desinfetar o local da punção com clorexidina, sempre com movimentos circulares, do interior para a periferia (Fonseca *et al.*, 2004).

Para além da desinfeção, o volume de sangue colhido também é um fator crucial. Existe uma correlação direta entre o volume e a probabilidade de se detetar o microrganismo responsável pela infeção, logo, a colheita de um volume adequado de sangue é crítica para o sucesso da deteção da bacteriemia (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). O volume apropriado ronda os 8 a 10 ml de sangue, não devendo ser menor ou maior que estes valores, de modo a evitar resultados falsos positivos.

Neste setor encontram-se três tipos de frascos para hemocultura: aeróbios, anaeróbios e micobactérias. Os frascos para aeróbios são constituídos por um meio líquido de tripticase de soja, com resinas que quelam os antibióticos administrados ao paciente, permitindo o crescimento da maioria dos microrganismos. Nestes frascos também se verifica o desenvolvimento de fungos leveduriformes. Os frascos de hemocultura para anaeróbios possuem agentes lisantes, sendo utilizados para o isolamento não só de anaeróbios, como também de microrganismos fastidiosos e intracelulares. Os frascos para micobactérias são compostos por um caldo de Middlebrook 7H9.

## 1.2. Processamento laboratorial

Após a colheita, os frascos de hemocultura são armazenados a 37°C num sistema automatizado (BD Bactec™ 9050 Blood Culture System) que deteta o crescimento bacteriano/fúngico. Este crescimento é detetado por fluorescência e resulta da produção de dióxido de carbono pelos microrganismos, como consequência da metabolização dos substratos presentes nos meios.

Quando positiva uma hemocultura, é efetuada uma repicagem para gelose de sangue Columbia (COS) pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido (ilustrada na Figura 6), que é incubada a 37°C durante 24 a 48 horas.



Figura 6 - Técnica da sementeira por esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido.

A gelose COS tem como objetivo principal o crescimento de uma vasta gama de microrganismos (bactérias e leveduras) (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014). Trata-se de um meio de enriquecimento composto por 5% de sangue de carneiro, o que o torna num meio muito nutritivo. A presença de sangue confere a este meio a característica de diferencial, uma vez que possibilita a deteção de hemólise ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015), discriminando as bactérias hemolíticas das não hemolíticas.

Para além da sementeira, preparam-se também dois esfregaços para posterior coloração de Gram para avaliar a morfologia do microrganismo.

A coloração de Gram é dos métodos que mais se utiliza para iniciar a caracterização de uma bactéria recentemente isolada (Madigan et al., 2016). Trata-se de uma coloração

diferencial que permite a divisão das bactérias em dois grupos, as que coram de Gram positivo e as que coram de Gram negativo. Na Figura 7 está representada a natureza química da parede celular das bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, sendo ela o fator determinante no resultado da coloração de Gram. As bactérias de Gram positivo possuem uma parede celular composta por uma espessa camada de peptidoglicano, ao passo que as bactérias de Gram negativo têm uma camada fina de peptidoglicano. Porém, a estrutura da parede celular das bactérias de gram negativo é mais complexa devido à existência de uma membrana celular externa, constituída por lipoproteínas, lipopolissacarídeos (lípidio A) e fosfolípidos.

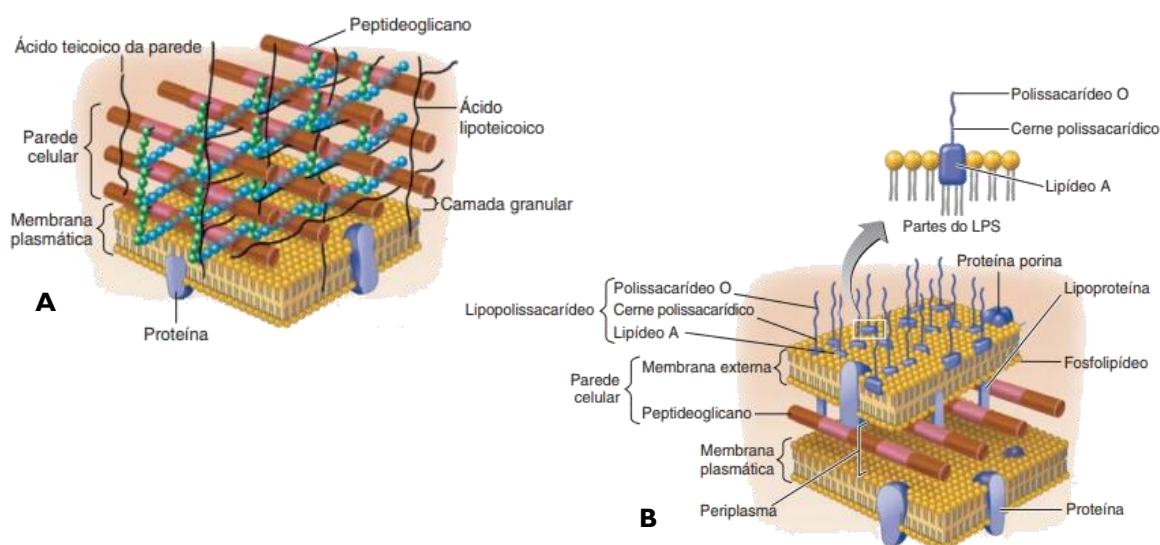


Figura 7 - Estrutura e constituintes da parede celular de bactérias de gram positivo (A) e de gram negativo (B). (Retirado do livro *Microbiologia* (12ª edição) – G. Tortora, B. Funke, C. Case).

O primeiro passo é a aplicação do corante violeta de genciana, que vai penetrar na parede celular bacteriana. De seguida, adiciona-se o mordente (soluto de Lugol), que aumenta a afinidade do violeta de genciana para a parede celular ao formar complexos insolúveis com ele. Nas bactérias de Gram positivo estes complexos insolúveis ficam retidos no interior da parede, razão pela qual o diferenciador (álcool-acetona) não os consegue remover. Deste modo, estas bactérias adquirem uma coloração roxa quando visualizadas ao microscópio ótico (Figura 8-A). Já nas bactérias de Gram negativo, o diferenciador remove os complexos formados pelo violeta de genciana e iodo. Por esta razão, as bactérias de Gram negativo ficam descoradas. A adição de fucsina diluída vai então fornecer uma cor contrastante ao corante primário, pelo que estas bactérias vão apresentar uma coloração rosa (Figura 8-B).

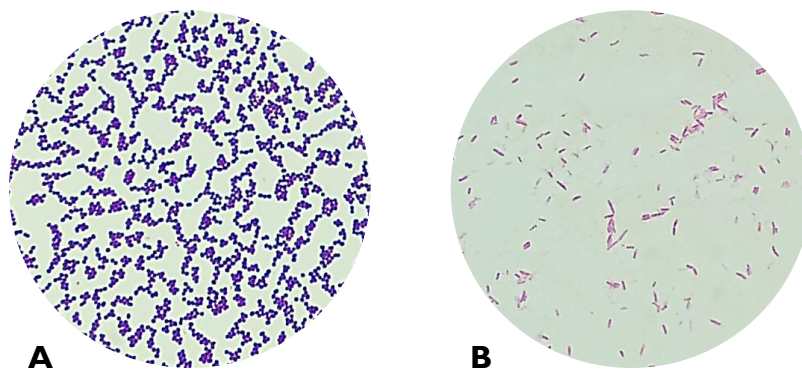


Figura 8 - Observação ao microscópio (objetiva 50x) de microrganismos corados pela Coloração de Gram. **A** - Cocos de gram positivo (coloração roxa). **B** - Bacilos de gram negativo (coloração rosa). (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

Consoante a morfologia observada nos esfregaços de sangue corados pela técnica de Gram e a leitura macroscópica da gelose COS, procede-se à identificação do microrganismo responsável pela bacteriemia, assim como para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), que serão discutidos mais adiante.

## 2. Secreções respiratórias

Quando se suspeita de uma infeção do trato respiratório inferior, podem colher-se diferentes tipos de amostras, sendo as mais comuns a expetoração e os aspirados/lavados brônquicos.

Neste tipo de infeções, é crucial ter em consideração a microbiota das vias respiratórias superiores e da microbiota oral nas amostras de expetoração, visto que podem dificultar o diagnóstico laboratorial (Fonseca *et al.*, 2004).

Os microrganismos que mais causam este tipo de infeções no IPOCFG são: *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) e meticilina sensíveis (MSSA), *Pseudomonas* spp. e Enterobacteriaceae.

### 2.1. Colheita

No caso da expetoração, o utente deve ser instruído para colher a primeira amostra da manhã (Fonseca *et al.*, 2004) para um contentor estéril, após a lavagem da boca e evitando ao máximo a contaminação com saliva. Em situações em que o paciente não consiga expetorar voluntariamente, a expetoração pode ser induzida por soro fisiológico (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014). Quanto às amostras de aspirados e lavados brônquicos, a sua colheita é efetuada pelo clínico.



É muito importante a colheita correta de amostras de expetoração, para que sejam de boa qualidade. A qualidade é avaliada pela coloração de Gram, observando com a objetiva de 10x a quantidade existente de células epiteliais e leucócitos, que apesar de confirmarem a existência de um processo inflamatório, também podem ser indicativas de contaminação. A presença de numerosas células epiteliais indica contaminação da amostra com saliva, ao passo que a observação de um grande número de leucócitos traduz a existência de um exsudado purulento (Brooks *et al.*, 2014).

A relação entre o número de células epiteliais e de leucócitos é avaliada pelos critérios de Murray-Washington, representados na Tabela 8. São consideradas amostras de expetoração de boa qualidade as que se inserem no grupo 4 ou 5. As amostras que se inserem nos restantes grupos são clinicamente irrelevantes, uma vez que se encontram contaminadas com secreções da orofaringe, devendo requisitar-se a colheita de uma nova amostra.

Tabela 8 - Sistema de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expetoração.

	Células epiteliais/campo	Leucócitos/campo
Grupo 1	> 25	< 10
Grupo 2	> 25	10 a 25
Grupo 3	> 25	> 25
Grupo 4	10 a 25	> 25
Grupo 5	< 10	> 25

## 2.2. Processamento laboratorial

### EXAME BACTERIOLÓGICO E MICOLÓGICO

Rotineiramente, as amostras de secreções respiratórias (porção purulenta) são sempre semeadas em gelose COS, gelose de chocolate com *PolyVitex*<sup>TM</sup> (PVX) e gelose *Sabouraud* com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC) pela técnica do esgotamento do produto à superfície do meio sólido e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas. Preparam-se também dois esfregaços a partir da amostra para serem corados pela coloração de Gram.

A gelose PVX trata-se de um meio de enriquecimento não seletivo que permite o crescimento da maioria das bactérias, incluindo algumas que não são capazes de crescer na gelose COS, como é o caso dos géneros *Neisseria* e *Haemophilus* (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014). Estes microrganismos crescem nesta gelose porque esta se encontra suplementada com

sangue aquecido a 80°C e *PolyViteX*<sup>™</sup> (Fonseca *et al.*, 2004), que concedem os fatores X (hemina) e V (NAD) necessários ao seu desenvolvimento.

A gelose SGC é usada para o isolamento seletivo de fungos (filamentosos e leveduras). Tendo em conta que maioria das amostras clínicas é polimicrobiana, o crescimento de fungos é favorecido pela adição de antibióticos (gentamicina e cloranfenicol), que vão impedir o crescimento de bactérias associadas (Tille, 2017); e também pela elevada concentração de glicose e pH ligeiramente ácido, que muitas bactérias não toleram. As condições de incubação variam consoante o tipo de fungo, mas nestes casos são usadas as temperaturas de 30°C e 37°C. Perante amostras respiratórias, o crescimento de fungos leveduriformes em meio SGC só é valorizado na ausência de crescimento bacteriano e as placas são incubadas durante 1 mês para pesquisa de fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* ou outros).

Se tanto no Gram como nas culturas surgir um predomínio evidente de uma morfologia, esta deve ser valorizada, uma vez que há a possibilidade de se tratar do agente etiológico da infeção. Contrariamente, se existirem diversos microrganismos nas mesmas proporções, a amostra é dada como polimicrobiana.

#### EXAME MICOBACTERIOLÓGICO

Sempre que existe suspeita clínica para este tipo de amostras, é solicitada a pesquisa de *Mycobacterium* spp.. Devem ser colhidas três amostras em dias distintos, visto que a emissão das micobactérias pode não ser contínua. Se requisitado pelo clínico, realizam-se testes de Biologia Molecular através do protocolo Xpert MTB/RIF do GeneXpert<sup>®</sup>, que será explicado mais adiante.

Em primeiro lugar, é efetuado um esfregaço da amostra para ser corado pela técnica de Kinyoun e fazer-se uma pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). As micobactérias possuem na composição da parede celular ácidos micólicos de cadeia longa e ácidos gordos ramificados. Estes constituintes tornam a superfície da parede impermeável aos corantes utilizados na técnica de Gram, bem como ao diferenciador. Desta forma, na coloração de Kinyoun é usada a carbolfucsina (fucsina básica e fenol), que ao conter fenol na sua composição permite reter a fucsina básica na parede celular das micobactérias. A adição do descorante (ácido clorídrico e etanol) faz com que a carbolfucsina seja retirada de todos os elementos da amostra exceto dos BAAR. De seguida é usado um corante de contraste, o azul de metileno, que irá corar o fundo e os microrganismos não ácido-álcool resistentes de azul. Na Figura 9 estão exemplos de esfregaços corados pelo método de Kinyoun e onde se observa a presença de BAAR.



Figura 9 - Bacilos ácido-álcool resistentes após a coloração de Kinyoun. **A** – Exame direto. **B** – Após homogeneização. **C** – Após sementeira em meio LJ. (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

De seguida, a amostra é sujeita a um processo de homogeneização, que envolve a descontaminação (uso de hidróxido de sódio (NaOH) para eliminar outras bactérias associadas), fluidificação (NaOH e N-acetil-L-cisteína são agentes mucolíticos que destroem a rede de mucina) e concentração (centrifugação para concentrar os BAAR da amostra). Assim que se obtém o sedimento, prepara-se um nova lâmina (também corada pela técnica de Kinyoun) para observação ao microscópio e procede-se à no meio Löwenstein-Jensen (LJ).

O meio LJ, inclinado em tubo de vidro, é utilizado para a cultura de *Mycobacterium* spp., visto que a grande maioria dos meios de cultura possui compostos que inibem o seu crescimento (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). A sua constituição em fécula de batata, ovo e glicerol sustenta o desenvolvimento das micobactérias e a presença de verde-malaquite impede o crescimento de outras bactérias que estejam presentes na amostra. As culturas em LJ são incubadas durante 2 meses a 37°C e em aerobiose, dado que as micobactérias são microrganismos estritamente aeróbios. Dizem-se positivas quando surgem colónias rugosas com aspeto em “couve-flor”.

Sempre que uma cultura é positiva para colónias suspeitas é feito um esfregaço para coloração de Kinyoun. Se se tratarem de BAAR, é efetuada a sua identificação por técnicas de Biologia Molecular e enviada a amostra ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra para realização do TSA.

### 3. Urina

As infeções do trato urinário (ITU) são uma das infeções mais frequentes no Homem e são geralmente causadas por bactérias da microbiota intestinal, que atingem o trato urinário por via ascendente através da uretra (Fonseca *et al.*, 2004). Devido a razões fisiológicas e anatómicas, tais como a ação bactericida dos fluidos prostáticos e as diferenças de pH e

osmolaridade, este tipo de infecção é mais comum nas mulheres em comparação com o sexo masculino (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

As ITU podem ser distinguidas pela sua localização em superiores ou inferiores. As superiores envolvem o parênquima renal (pielonefrite) ou os ureteres (ureterite), ao passo que as inferiores estão relacionadas com infecções na bexiga (cistite), na uretra (uretrite), no caso dos homens, na próstata (prostatite) (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

Os microrganismos mais associados às ITU no IPOCFG são: *Escherichia coli*, *Klesiella pneumoniae*, *Proteus spp.* e *Enterococcus faecalis*.

### **3.1. Colheita**

A forma correta de obter uma amostra de urina para exame bacteriológico consiste na obtenção da primeira urina da manhã após lavagem da região genital e desprezando o primeiro jato, de modo a recolher o jato intermédio diretamente para um recipiente estéril, uma vez que tem uma menor probabilidade de estar contaminado com microrganismos da pele. Existem outros tipos de colheita que também são válidos como amostras de urina para o diagnóstico de ITU, entre os quais a punção de cateter urinário, punção supra-púbica, drenagem de nefrostomia ou saco coletor (Fonseca *et al.*, 2004).

O recipiente deve ser transportado de imediato para o laboratório e deve estar devidamente identificado. A urina deve ser processada até uma hora após a colheita, caso contrário deverá ser refrigerada a 4°C (Fonseca *et al.*, 2004).

### **3.2. Processamento laboratorial**

O diagnóstico bacteriano de uma ITU compreende duas etapas: a urocultura, para quantificação e identificação dos microrganismos presentes na urina e a análise sumária da urina, para avaliar os parâmetros bioquímicos e observar o sedimento urinário. De notar que é crucial um bom conhecimento da microbiota existente, de modo a distinguir um microrganismo patogénico de uma contaminação.

#### UROCULTURA

A urocultura é o primeiro passo a realizar após a chegada da amostra, de modo a evitar a sua contaminação. Com uma ansa calibrada de 10 µl procede-se à homogeneização prévia da urina, seguida de uma sementeira em gelose cistina-lactose com défice em eletrólitos (CLED) e gelose de sangue com colistina e ácido nalixílico (CNA) através da técnica quantitativa (ilustrada na Figura 10-A), que vai permitir a quantificação dos microrganismos. Caso exista uma suspeita de fungos na urina, esta também deve ser semeada em meio SGC.

A gelose CLED é um meio não seletivo e diferencial que possibilita a distinção entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose (Fonseca *et al.*, 2004), ao possuir na sua constituição lactose e azul de bromotimol (indicador de pH), que vai diferenciá-las através da alteração da cor do meio. As bactérias fermentadoras da lactose alteram a cor do meio para amarelo e as suas colónias também possuem essa cor. Já as bactérias não fermentadoras da lactose formam colónias azuis/verdes ou incolores e não mudam a cor do meio. A grande vantagem do défice em eletrólitos é que inibe o efeito “swarming” das bactérias do género *Proteus*, impedindo a inviabilização da placa.

O meio de cultura CNA consiste num meio seletivo para bactérias de Gram positivo, visto que possui na sua composição os antibióticos colistina e ácido nalixídico que inibem o crescimento de maioria das bactérias de Gram negativo (Brooks *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2004). Este meio, similarmente ao meio COS, permite a deteção de hemólise devido à presença de sangue, o que também o torna um meio diferencial.

Após a sementeira, incubam-se as placas a 37°C e em aerobiose, durante 18 a 24 horas.

Nas amostras de jatos intermédios, quando estão presentes mais de  $10^5$  unidades formadoras de colónicas (UFC) por mililitro (mais de 1000 colónias por placa), consideram-se positivas as culturas. Contudo, em indivíduos imunodeprimidos ou em controlo de infeções anteriores valoriza-se uma contagem entre as  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml. Em amostras de colheitas supra-púbicas ou de cateteres urinários, são positivas todas as culturas que apresentem crescimento. Nas Figuras 10-B e 10-C estão exibidos dois dos microrganismos que mais causam este tipo de infeção, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, respetivamente.

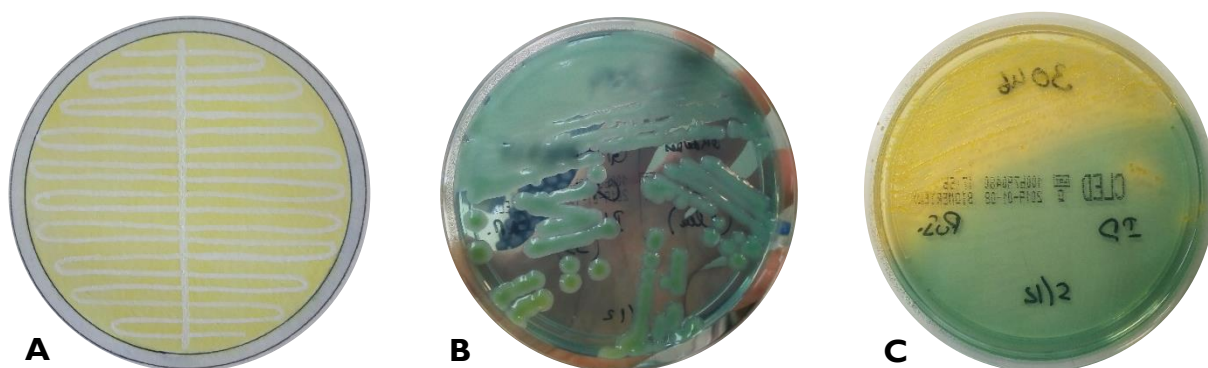


Figura 10 - **A** – Técnica da sementeira quantitativa. (Desenho de Marina Tomás). **B** – *Klebsiella pneumoniae*. (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG). **C** – *Escherichia coli*. (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

Se surgirem três ou mais tipos de colónias distintas, é reportado ao clínico que a cultura é polimicrobiana e deverá ser enviada uma nova amostra se clinicamente justificado.

Os meios CLED e CNA permitem ainda orientar o diagnóstico na medida em que nos informam acerca da morfologia bacteriana. O meio CLED favorece o crescimento de bactérias de Gram negativo, ao passo que o CNA apenas seleciona bactérias de Gram positivo. Após uma análise da morfologia das colónias, pode então prosseguir-se para os testes de identificação bacteriana e respetivo TSA.

### ANÁLISE SUMÁRIA DA URINA

A análise sumária da urina compreende 3 fases: a análise física, análise química e análise microscópica.

- ◆ **Análise física:** diz respeito à observação macroscópica da urina, analisando o aspeto (límpida ou turva) e a cor (âmbar, amarelo pálido, etc.).
- ◆ **Análise química:** engloba a avaliação dos parâmetros bioquímicos (glicose, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio, proteínas, pH, densidade, corpos cetónicos, leucócitos e eritrócitos) através de tiras de papel com reagentes, que são embebidas em 10 ml de urina não centrifugada.
- ◆ **Análise microscópica:** consiste em analisar o sedimento urinário ao microscópio ótico, obtido a partir de urina centrifugada e rejeitando o sobrenadante. Esta análise permite detetar, na objetiva de 40x, a presença de elementos celulares, tais como células epiteliais, cristais, leucócitos, eritrócitos, fungos ou parasitas (Fonseca *et al.*, 2004).

## 4. Fezes

As infeções do trato gastrointestinal em indivíduos imunocomprometidos são de diagnóstico muito cauteloso para os clínicos e microbiologistas, visto que são vários os microrganismos que podem causar este tipo de infeções (Tille, 2017). Por exemplo, quando se encontram sob quimioterapia ou antibióticos, estes indivíduos têm uma maior probabilidade de virem a desenvolver infeções por *Clostridium difficile* (Tille, 2017). Posto isto, os indivíduos imunocomprometidos encontram-se mais suscetíveis a infeções provocadas por microrganismos oportunistas (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015), dado que a sua microbiota normal está alterada (Madigan *et al.*, 2016).

Para além de *C. difficile*; *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. também podem causar este tipo de infeções no âmbito do IPOCFG.

Os antecedentes epidemiológicos, a existência de fatores predisponentes, a presença de sinais e sintomas clínicos (náuseas, vômitos e diarreia), assim como o tipo de diarreia devem orientar na pesquisa do agente etiológico (Fonseca *et al.*, 2004).

#### **4.1. Colheita**

As amostras de fezes devem ser obtidas até um total de 3 amostras e em dias diferentes (Fonseca *et al.*, 2004), sendo transportadas em contentores estéreis devidamente identificados.

#### **4.2. Processamento laboratorial**

Consoante as análises requisitadas pelo clínico, as amostras de fezes podem ser submetidas a diferentes processamentos: exame bacteriológico, exame micológico e/ou exame parasitológico.

##### EXAME BACTERIOLÓGICO

O exame bacteriológico pesquisa espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, uma vez que são as bactérias mais comumente associadas a gastroenterites (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

Quando se suspeita de infeções por *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp., semeia-se uma porção das fezes em gelose Hektoen (HEK) e em gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), meios seletivos e diferenciais que permitem a distinção destas bactérias (Figura 11). Estas placas devem ser incubadas em aerobiose e a 37°C de 18 a 24 horas.

A presença de desoxicolato de sódio na gelose XLD elimina as bactérias de Gram positivo pertencentes à microbiota normal e é o indicador de pH (vermelho de fenol) que irá distinguir as colónias. A gelose XLD possui na sua constituição três açúcares: xilose, lactose e sacarose. *Shigella* não fermenta estes açúcares, formando colónias incolores/vermelhas. *Salmonella* fermenta a xilose originando colónias amarelas. Porém, como a xilose existe em menor quantidade, *Salmonella* passa a descarboxilar a lisina, alcalinizando o pH do meio e formando colónias incolores/vermelhas (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Além disto, a existência de tiosulfato de sódio no meio detetar as bactérias que produzam ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) através da enzima tiosulfato redutase (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Quando isto acontece as colónias surgem com um centro negro, revelado pelo citrato férrico amoniacal.

O meio HEK possui uma elevada concentração de sais biliares que inibem o crescimento de bactérias de Gram positivo, assim como o crescimento de bactérias de Gram negativas pertencentes à flora intestinal (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). A presença de sacarose, salicina e lactose determina os padrões de fermentação, com o auxílio do indicador de pH (fucsina ácida e azul de bromotimol). Quando os açúcares são fermentados surgem colónias rosa-salmão e quando não há fermentação as colónias são verdes, como é o caso das colónias de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.. Esta gelose também possibilita a deteção da enzima tiosulfato redutase que algumas bactérias utilizam para a produção de H<sub>2</sub>S.

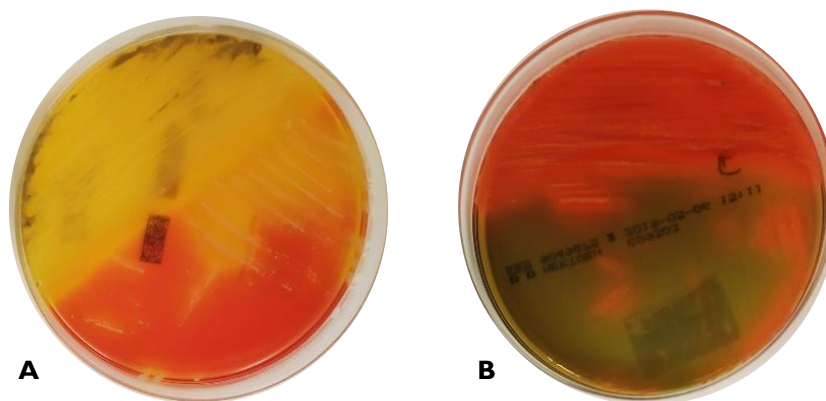


Figura 11 - Meios de cultura XLD (A) e Hektoen (B). (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

Em adição, também se coloca uma porção das fezes em caldo Selenito e caldo Gram-negativo (GN), nas mesmas condições de incubação e durante 12 horas. O caldo Selenito trata-se de um meio de enriquecimento para o isolamento de *Salmonella* spp. e de algumas espécies de *Shigella* em vários tipos de amostras, mas neste setor é utilizado em amostras fecais. A presença de selenito de sódio na sua composição impede o crescimento de bactérias pertencentes à flora intestinal (Zimbro *et al.*, 2009), prevalecendo desta forma a cultura das espécies de *Salmonella/Shigella*. A presença de crescimento bacteriano é revelada pela turvação do meio.

O objetivo do caldo GN é também o isolamento seletivo de bactérias gram-negativo (*Salmonella* spp. e *Shigella* spp.). Esta seleção é conseguida pela composição em desoxicolato e citrato de sódio, que impedem o desenvolvimento de bactérias de Gram positivo, favorecendo o crescimento das bactérias de Gram negativo (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). A composição em manitol também favorece a cultura de *Salmonella* e *Shigella*, que o metabolizam.

Decorrido o tempo de incubação destes meios líquidos, repicam-se para meio HEK e XLD para avaliar o desenvolvimento das colónias não fermentadoras da lactose e/ou com centro negro.



Sempre que se desconfia de uma infecção causada por espécies de *Campylobacter*, o primeiro passo é a execução de um teste imunocromatográfico, com a finalidade de pesquisar antígenos de *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*. Se o resultado for positivo, procede-se à sua sementeira em gelose Campyloset, um meio de enriquecimento seletivo que permite o crescimento das campilobactérias (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015) em microaerofilia a 42°C e também à realização de um esfregaço corado pela técnica de Gram para observar a morfologia típica em “asa de gaivota” ou em “S”.

Em casos que se desconfie que seja *Clostridium difficile* a provocar a infecção, procede-se à realização de um teste imunocromatográfico para a pesquisa da enzima glutamato desidrogenase. Se o resultado for positivo, faz-se a confirmação da produção da toxina B através de Biologia Molecular.

#### EXAME MICOLÓGICO

A pesquisa de fungos leveduriformes em amostras fecais é realizada em casos de ausência de crescimento bacteriano. Isto pode resultar do facto da antibioterapia ter eliminado por completo a microbiota intestinal, o que favoreceu o crescimento de leveduras.

Assim sendo, procede-se à sementeira das fezes em gelose SGC e incuba-se em aerobiose a 37°C, valorizando somente o crescimento de leveduras na ausência de crescimento bacteriano.

#### EXAME PARASITOLÓGICO

Este exame inicia-se com uma análise macroscópica das fezes para avaliar a consistência, odor, presença de restos alimentares e de outros elementos anormais, tais como sangue, muco ou vermes adultos.

Segue-se o exame direto a fresco com Lugol, que consiste na observação direta da amostra ao microscópio ótico para se pesquisarem estruturas parasitárias e efetua-se o exame microscópico após concentração, que tem como intuito concentrar os parasitas e que engloba a sedimentação. A sedimentação é executada pelo Método de Richie, que consta em diferentes processos de centrifugação até que se obtenha um sedimento que poderá conter ovos e quistos a observar.

Em pequena ampliação (objetiva 10x) averigua-se a presença de parasitas, ovos e larvas; e com a objetiva de 40x pesquisam-se ovos e quistos.

## 5. Exsudados purulentos superficiais e profundos

Muitas são as situações clínicas e muitos são os respectivos microrganismos responsáveis por infecções localizadas que conduzem à formação de exsudados purulentos (Fonseca *et al.*, 2004). Estes exsudados podem ser divididos em superficiais (feridas abertas da pele) ou profundos (feridas fechadas).

No IPOCFG, os microrganismos que mais se observam nestes casos são: enterobactérias, *Pseudomonas* spp. e *S. aureus*.

### 5.1. Colheita

Os exsudados de feridas abertas deverão ser colhidos com uma zaragatoa e esta deverá ser colocada em meio de transporte adequado (*Stuart* ou *Amies*) (Fonseca *et al.*, 2004).

Quanto aos exsudados de feridas fechadas, a sua colheita não deverá ser através de uma zaragatoa, mas sim por punção e aspiração com agulha e seringa (Fonseca *et al.*, 2004) e com a devida assepsia da pele, para que não ocorra a contaminação com microrganismos pertencentes à flora da pele. Este modo de colheita tem como objetivo a pesquisa de anaeróbios, pelo que a seringa deve ser transportada em ambiente fechado e sem ar.

### 5.2. Processamento laboratorial

Por rotina, os exsudados purulentos superficiais são semeados em meios COS, PVX e SGC para a pesquisa de bactérias aeróbias e fungos leveduriformes, sendo incubados a 37°C durante 24 horas. Efetua-se ainda um esfregaço para posterior coloração de Gram, onde se irá ter em atenção a presença de leucócitos polimorfonucleares e a morfologia dos microrganismos existentes.

Se os exsudados purulentos profundos forem colhidos nas condições apropriadas para anaerobiose, o seu processamento é feito através da sementeira em gelose de sangue Schaedler (SCS) e caldo Schaedler (KCS) e incubados a 37°C durante 48 horas, o que permite a recuperação de bactérias anaeróbias.

Tanto a gelose SCS como o caldo KCS se tratam de meios de enriquecimento não seletivos, destinados à pesquisa de bactérias anaeróbias estritas e anaeróbias facultativas (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015), uma vez que se encontram suplementados com vitamina K, 5% de sangue de carneiro, fator X e ainda com um agente redutor que vai impedir a formação de espécies reativas de oxigénio, suportando a anaerobiose.

Dependendo do tipo de bactéria, as condições de incubação podem variar. No caso de bactérias anaeróbias estritas, estas têm de ser incubadas em condições de anaerobiose

(conseguida com o uso de um GENBag<sup>1</sup>), ao passo que as bactérias anaeróbias facultativas podem crescer em aerobiose.

A valorização provisória dos resultados é feita consoante o que se observou no exame direto e a morfologia das colónias, sendo crucial um bom conhecimento para saber avaliar se há colónias de microrganismos patogénicos ou se se trata apenas da microbiota da pele. Por fim, procede-se aos testes de identificação automatizados e respetivo TSA.

## **6. Exsudados vaginais**

A inflamação e irritação da mucosa vaginal, denominada vaginite, é das situações clínicas mais comuns entre as mulheres (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015; Tille, 2017). As três causas mais comuns de vaginite são a candidíase vaginal, a vaginose bacteriana e a tricomoníase (Tille, 2017). Existe uma maior prevalência para desenvolver este tipo de infeções quando um indivíduo se encontra sob antibioterapia, dado que os antibióticos induzem um desequilíbrio da microbiota vaginal (Champer *et al.*, 2017).

Os microrganismos que mais induzem este tipo de infeção no IPOCFG são: *Gardenerella vaginalis*, *Candida spp.* e *Trichomonas vaginalis*.

### **6.1. Colheita**

Os fluidos vaginais são colhidos com uma zaragatoa que é posteriormente colocada em meio de transporte *Amies* e mantida à temperatura ambiente até ao processamento nos meios de cultura (Tille, 2017), de modo a se preservar a mobilidade de parasitas.

### **6.2. Processamento laboratorial**

A análise de rotina destas amostras engloba a análise bacteriológica, micológica e parasitológica.

O processamento das zaragatoas começa a sementeira da zaragatoa nos meios COS, PVX e SGC, que serão incubados a 37°C durante 18 a 24 horas.

Efetua-se um esfregaço que será corado pela coloração de Gram, permitindo diferenciar a vaginose bacteriana pela presença de *clue cells* (Figura 12), que são células epiteliais revestidas por *Gardenerella vaginalis* (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). O teste de *Whiff* deve ser realizado para complementar o diagnóstico da vaginose bacteriana e consiste na adição de

---

<sup>1</sup> GENBag é uma bolsa hermética que em conjunto com um gerador consegue criar vários tipos de atmosferas para o crescimento bacteriano, podendo ela ser anaeróbica, capnofílica ou microaerofílica.

hidróxido de potássio (KOH 10%) ao exsudado vaginal. Um odor característico a “peixe podre” evidencia um resultado positivo (Cohrssen *et al.*, 2005).

Por fim, executa-se um exame direto a fresco com soro fisiológico, que tem como finalidade o diagnóstico de tricomoníase (pesquisa de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* e respetiva mobilidade) e também de candidíase vaginal (pesquisa de *Candida* spp.).

Na leitura macroscópica das placas deve ter-se em atenção à microbiota vaginal para se valorizarem os microrganismos causadores da infeção de acordo com a informação clínica e também com os resultados dos exames diretos (Fonseca *et al.*, 2004).



Figura 12 – *Clue cells* em microscopia ótica (objetiva de 50x). (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

## 7. Pontas de cateter

As infeções da corrente sanguínea associadas ao uso de cateter central são um dos tipos mais frequentes de infeções associadas aos cuidados de saúde, resultando no internamento prolongado do doente, elevada morbidade e mortalidade (Goulão, 2014). A principal consequência destes dispositivos médicos é a colonização por bactérias ou fungos, o que pode conduzir à infeção do cateter ou a uma infeção da corrente sanguínea (Tille, 2017).

As pontas de cateter são enviadas para análise quando se suspeita que o cateter é a origem do quadro clínico (Fonseca *et al.*, 2004), avaliando a relação entre a colonização do cateter e a infeção do mesmo.

### 7.1. Colheita

Com as condições de assepsia da pele adequadas, retira-se o cateter e cortam-se 5 cm da zona mais distal (a que fica mais profundamente introduzida na pele). Coloca-se esta porção num frasco estéril e sem meio de cultura, sendo transportado o mais rápido possível para o laboratório para evitar a desidratação.

### 7.2. Processamento laboratorial

Quando possui o tamanho apropriado, a ponta do cateter deve ser rodada sobre a placa de COS segundo a técnica semiquantitativa de Maki, que avalia o crescimento dos

microrganismos presentes no exterior do cateter. Depois, a ponta é colocada em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) com o objetivo de possibilitar o crescimento de microrganismos que se encontrem no interior/exterior do cateter. Ambos são incubados a 37°C durante 18 a 24 horas.

O caldo BHI é um meio de enriquecimento utilizado para a cultura de diversos microrganismos não fastidiosos e moderadamente fastidiosos (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015; Tille, 2017), podendo estes ser aeróbios ou anaeróbios. Quando ocorre a turvação deste meio, significa que existe crescimento bacteriano.

No momento da observação das placas, um número de colónias superior a 15 sugere a infeção pelo cateter. Se esse número for inferior a 15, é sugestivo da colonização do cateter.

Ao comparar as culturas obtidas através da técnica de Maki e a partir do caldo BHI (repicado para gelose COS se houver crescimento), é possível averiguar se o microrganismo que existe no interior do cateter é o mesmo que existe no seu exterior, assim como concluir se são os causadores da infeção.

## **8. Líquido cefalorraquidiano (LCR)**

Tendo em conta que estamos perante doentes oncológicos e imunocomprometidos, existe a possibilidade de surgirem dois tipos de meningite: a meningite carcinomatosa e a meningite microbiana. A meningite carcinomatosa trata-se de uma complicação rara (Lima et al., 2003) que resulta do facto dos tumores sólidos conseguirem ultrapassar a barreira hematoencefálica, atingindo o LCR. Quanto à meningite microbiana, é causada pelo acesso de microrganismos ao LCR, podendo estes ser bactérias, vírus, parasitas ou fungos.

O LCR trata-se de um fluido biológico incolor e estéril, pelo que não possui microbiota endógena. Assim sendo, a presença de qualquer microrganismo neste fluido é de valorizar.

### **8.1. Colheita**

As amostras de LCR são colhidas por punção lombar e devem ser transportadas para o laboratório sem demora, de forma a serem processadas o mais rápido possível para evitar perda de viabilidade do agente infeccioso (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015). Se não for possível o seu transporte imediato, as amostras devem permanecer à temperatura ambiente, nunca refrigeradas.

## 8.2. Processamento laboratorial

A meningite bacteriana é considerada uma emergência médica dada a sua fatalidade se não for tratada o mais rápido possível. Por isso, o seu diagnóstico requer um processamento imediato (Fonseca *et al.*, 2004). Os agentes etiológicos mais comuns neste tipo de meningite e em adultos/idosos são *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (Fonseca *et al.*, 2004).

Se for colhido um bom volume de amostra, a sua centrifugação permite concentrar a pouca quantidade de microrganismos existentes.

É mandatário realizar um esfregaço para coloração de Gram a partir do sedimento, para se observar a morfologia do microrganismo. Um mau prognóstico implica a predominância de bactérias em relação ao número de leucócitos, ao passo que num bom prognóstico acontece o oposto.

Estas amostras são também semeadas em meios COS e PVX pela técnica da inundação (cerca de 3 gotas), incubando posteriormente a 37°C durante 24 horas (Fonseca *et al.*, 2004). Se houver crescimento bacteriano, deve proceder-se à sua rápida identificação e respetivo TSA, informando o clínico.

Em pacientes imunodeprimidos, a levedura *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico mais comum neste tipo de infeção (Fonseca *et al.*, 2004). Quando se suspeita de uma meningite fúngica, semeia-se em gelose SGC e prepara-se uma lâmina com umas gotas de amostra e de tinta da china, que facilita a visualização da sua cápsula.

## 9. Raspados de fâneros

Apesar de pouco frequente, por vezes são recebidas no setor de Microbiologia amostras de raspados de fâneros (pele, unhas ou cabelos) entre outros, para a pesquisa de fungos filamentosos, incluindo os fungos dermatófitos (p. ex. *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*).

### 9.1. Processamento laboratorial

Este exame inicia-se com a sementeira das amostras em pelo menos dois meios SGC para que possam incubar a diferentes temperaturas (25°C e 30°C), semeando também em meio Mycoline® (25°C). Quando a cultura e o exame direto são negativos, o tempo de incubação é de 4 semanas e sempre que a cultura seja negativa e o exame direto positivo, a incubação decorre durante 8 semanas.

O meio Mycoline® possui dois tipos diferentes de gelose: Sabouraud-Gentamicina-Cloranfenicol de um lado e Sabouraud-Cloranfenicol-Actidiona do outro. O primeiro meio

permite o aparecimento de leveduras e fungos filamentosos, enquanto no segundo a actidiona inibe o crescimento de fungos não dermatófitos, sendo seletivo para estes últimos. O objetivo do antifúngico actidiona é limitar o desenvolvimento de fungos contaminantes e o dos antibióticos, como já referido para a gelose SCG, é evitar o crescimento bacteriano.

A análise macroscópica das colónias em SGC é de larga importância, uma vez que os fungos filamentosos possuem características específicas, tais como a pigmentação e a textura, que auxiliam na identificação do possível agente patogénico.

Quando surge crescimento de fungos filamentosos nos meios SGC ou Mycoline<sup>®</sup>, recorre-se à técnica da fita-cola e observa-se ao microscópio ótico (objetiva 40x) por contraste com o corante azul de lactofenol, de modo a analisarem-se as estruturas fúngicas (tipo de hifas, conidiogénese, etc.).

Prepara-se ainda uma lâmina da amostra com NaOH (a 10% para pele e a 30% para cabelos/unhas) para observação direta ao microscópio, de modo a se detetarem elementos fúngicos que possam estar presentes nas amostras de fâneros, dado que o NaOH dissolve os queratinócitos, de modo a permitir uma fácil visualização dos elementos fúngicos.

## **IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS E TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

Assim que se obtém uma identificação presuntiva de uma bactéria através dos métodos fenotípicos, pode iniciar-se o procedimento que vai levar à identificação definitiva dos microrganismos e respetiva suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.

Por vezes podem surgir microrganismos cuja identificação é mais complexa, pelo que se recorrem a provas bioquímicas auxiliares e testes de suscetibilidade auxiliares de identificação para a orientação do diagnóstico definitivo, feito de forma automatizada.

### **I. Técnicas de identificação**

#### **I.1. Provas bioquímicas auxiliares de identificação**

**Teste da Catalase:** A enzima catalase converte o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água, levando à libertação de bolhas de oxigénio e permitindo a distinção entre *Staphylococcus* (catalase positiva) e *Sreptococcus/Enterococcus* (catalase negativa).

**Teste da Oxidase:** A atividade da citocromo oxidase é verificada pela oxidação do tetrametil-p-fenilenodiamina, observando-se uma coloração roxa. Possibilita detetar a presença de Enterobacteriaceae (oxidase negativa) ou de Pseudomonadaceae (oxidase positiva).

**Teste da Urease:** Determina a produção da enzima urease, que hidrolisa a ureia em amónia e CO<sub>2</sub>, verificando-se o aumento do pH do meio, com viragem da cor do indicador. A coloração rosa do meio indica a presença da urease, ao passo que a coloração laranja traduz a sua ausência.

## **1.2. Testes de suscetibilidade auxiliares à identificação**

Através da colocação de um disco de antibiótico (vancomicina, metronidazol ou optoquina) em gelose COS, que vai difundir no meio, a suscetibilidade aos antibióticos é avaliada pela presença de halos de inibição.

**Teste de suscetibilidade à Vancomicina:** a vancomicina é um antibiótico anti-parietal que interrompe a formação da parede celular, sendo apenas eficaz contra bactérias de Gram positivo. Deste modo, avalia a presença de uma bactéria de Gram positivo (sensível) ou de Gram negativo (resistente).

**Teste de suscetibilidade ao Metronidazol:** o metronidazol trata-se de um antibiótico que atua nos ácidos nucleicos. Quando reduzido, associa-se ao DNA e induz a perda da sua estrutura, ajudando a esclarecer se a bactéria é anaeróbia estrita (sensível) ou aeróbia estrita/facultativa (resistente).

**Teste de suscetibilidade à Optoquina:** a optoquina é um antibiótico que interfere com a ATPase (inibindo a produção de ATP), permitindo diferenciar *Streptococcus pneumoniae* (sensível) de outros estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos (resistentes).

## **1.3. Galeria de identificação BD BBL™ Crystal™**

Recorre-se ao sistema BD BBL™ Crystal™ quando se pretende obter a identificação de bactérias de Gram positivo de difícil identificação com os métodos automatizados. A partir de substratos cromogénicos e fluorogénicos, desenvolvem-se reações com a amostra que



induzem a degradação desses substratos, alterando o pH e a coloração dos meios. Após a incubação, a interpretação dos resultados é efetuada através de um software informático que nos indica qual a espécie presente a partir do bionúmero obtido.

#### 1.4. Testes de Biologia Molecular

O equipamento GeneXpert® consiste num sistema fechado e automatizado que permite o diagnóstico molecular bacteriano através de ensaios de PCR em tempo real, em que decorre a amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção de sequências-alvo, proporcionando resultados em pouco tempo (1-2 horas). Esta metodologia permite a redução do risco de contaminação, visto que requer a utilização de cartuchos descartáveis e de utilização única que contêm os reagentes necessários ao processo. A Tabela 9 refere os diferentes ensaios realizados por Biologia Molecular.

Tabela 9 - Ensaios realizados por PCR em tempo real no setor de Microbiologia do IPOCFG.

Protocolo	Amostra	Objetivo
<b>Xpert Clostridium difficile®</b>	Fezes	Pesquisa dos genes codificantes das toxinas B e binária ( <i>tcdA</i> ) e deleção no gene <i>tcdC</i> .
<b>Xpert Carba-R Assay®</b>	Zaragatoas retais	Deteção de estirpes de enterobactérias produtoras carbapenemases (KPC, OXA48, NDM, VIM, IMP).
<b>Xpert MTB/RIF®</b>	Expetoração	Deteção de DNA do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e mutações do gene <i>rpoB</i> associadas a resistências à rifampicina.
<b>Xpert MRSA/SA BD®</b>	Sangue (hemoculturas)	Deteção de DNA de <i>S. aureus</i> e MRSA em hemoculturas positivas.

#### 1.5. Identificação definitiva

Consoante as características morfológicas das colónias e os resultados das provas bioquímicas, procede-se à realização da identificação definitiva a partir de um sistema automatizado, o Vitek® 2, que se baseia na utilização de cartas para identificação (cartas ID).

Cada carta é constituída por 64 poços e cada um deles contém substratos que vão ser preenchidos com o inóculo, onde irão decorrer as reações metabólicas. Estas reações são colorimétricas, permitindo a leitura através de diferentes comprimentos de onda no espectro

do visível; cada poço é lido de 15 em 15 minutos de modo a verificar a existência de turvação ou de produtos corados.

Antes de se utilizarem as cartas ID é necessário preparar num tubo uma suspensão bacteriana/fúngica com 3 ml de solução salina e consoante as densidades *McFarland* indicadas na Tabela 10. Põe-se a carta ID em contacto com a suspensão preparada e coloca-se no Vitek® 2, que vai proceder ao inóculo e leitura da carta de forma automática.

## 2. Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O Vitek® 2 também se encontra apto para avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos através de cartas TSA, estando as que se utilizam neste setor referenciadas na Tabela 11.

A partir da suspensão preparada para as cartas ID, transfere-se parte para o tubo da suspensão para o TSA, já com 3 ml de solução salina, sendo que a quantidade a transferir depende do tipo de microrganismo e encontra-se referido na Tabela 10. Colocam-se então as cartas TSA em contacto com as respetivas suspensões.

Além disto, executa-se um controlo de identificação, que consiste em semear numa placa 10 µl da suspensão bacteriana da carta ID e que tem como finalidade avaliar a pureza dessa suspensão. Os meios utilizados para este controlo dependem do microrganismo: COS para bactérias de Gram positivo, CLED para bactérias de Gram negativo, SGC para leveduras, PVX para bactérias fastidiosas e SCS para bactérias anaeróbias.

Posto isto, colocam-se os suportes com as cartas TSA e respetivas suspensões no sistema Vitek® 2, que vai proceder ao seu inóculo e leitura automáticos.

Tabela 10 - Respetivas densidades *McFarland* e volumes a transferir para o TSA, de acordo com o tipo de carta ID.

Carta ID	Densidade <i>McFarland</i>	Volume a transferir para TSA
<b>GP (cocos Gram-positivo)</b>	0,6 – 0,63	280 µl
<b>GN (bacilos Gram-negativo)</b>	0,6 – 0,63	145 µl
<b>YST (leveduras)</b>	1,8 – 2,20	280 µl
<b>ANC (anaeróbios e corinebactérias)</b>	2,70 – 3,30	TSA manual
<b>NH (fastidiosos)</b>	2,70 – 3,30	TSA manual

Tabela 11 - Cartas TSA usadas em conjunto com o microrganismo para o qual se realiza o antibiograma.

Cartas TSA	Microrganismo
<b>AST-P648</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>AST-P586</b>	<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos e <i>Enterococcus</i> (γ-hemolíticos)
<b>AST-ST03</b>	<i>Streptococcus</i> (hemólise α)
<b>AST-N355</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>AST-N373</b>	<i>Pseudomonadaceae</i>
<b>AST-YS08</b>	Leveduras

A identificação final do microrganismo, bem como a suscetibilidade aos antimicrobianos são realizadas com o auxílio de um software informático que analisa as leituras das cartas ID e TSA e as compara com bases de dados, indicando a espécie e as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para cada antibiótico, de acordo com as normas EUCAST.

## 2.1. Testes de suscetibilidade manuais

Existem antibióticos que não estão incluídos nas cartas TSA do sistema Vitek® 2, e portanto, o TSA não é efetuado de forma automatizada, mas sim manualmente através do método de *Kirby-Baüer*. O mesmo sucede para casos em que houve crescimento de microrganismos fastidiosos ou anaeróbios no exame cultural, como por exemplo *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium* spp., *Neisseria* spp. e *Moraxella catarrhalis*.

Em primeiro lugar, prepara-se uma suspensão bacteriana a partir das colónias (com menos de 48 horas de incubação) em solução salina com uma densidade de 0,5 *McFarland*. De seguida, a suspensão deve ser inoculada numa gelose Mueller-Hinton (MH) ou Mueller-Hinton *Fastidious* (MHF), para bactérias fastidiosas, segundo a técnica da sementeira em toalha. A gelose MH é um meio não seletivo que tem como propósito o estudo da sensibilidade aos agentes antimicrobianos por difusão. Quando adicionada de sangue de cavalo aquecido (gelose MHF) permite a realização do antibiograma em microrganismos fastidiosos, como *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. ou anaeróbios.

Por fim, segue-se a aplicação dos discos de antibióticos, que devem ser aplicados com firmeza. Assim que o disco entra em contato com o meio, o antibiótico vai difundir e após o tempo de incubação (37°C durante 16 a 20 horas), avalia-se a existência de halos de inibição. O diâmetro dos halos é medido em milímetros e a sua interpretação é feita por consulta do *breakpoint* das normas EUCAST. Na ausência de halo ou quando o diâmetro do mesmo é

menor que o *breakpoint* “resistente”, significa que o microrganismo é resistente ao agente antimicrobiano. Quando é maior que o *breakpoint* “suscetível”, traduz a suscetibilidade do microrganismo ao antibiótico.

## **2.2. Detecção de $\beta$ -lactamases de espectro estendido e de carbapenemases**

Nas últimas décadas, tem-se observado a expansão a nível global da existência de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, incluindo as bactérias produtoras de carbapenemases.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (BLSE) e as carbapenemases dizem respeito a enzimas adquiridas pelas bactérias como mecanismo de resistência, para evitar a ação dos antibióticos e continuarem a proliferar. No IPOCFG a detecção destas enzimas é realizada para todas as Enterobacteriaceae.

As BLSE possuem a capacidade de hidrolisar e causar resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, através da produção de enzimas denominadas  $\beta$ -lactamases (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012; Pitout e Laupland, 2008). Porém, existem moléculas inibidoras (p. ex. ácido clavulânico) que interagem covalentemente com as  $\beta$ -lactamases (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012), inibindo-as e fazendo com que os  $\beta$ -lactâmicos consigam exercer a sua atividade bactericida.

A resistência aos carbapenemos pode ocorrer consoante os seguintes mecanismos: (I) através da produção de carbapenemases, enzimas que vão hidrolisar os antibióticos e (II) mutações nos canais de porinas da membrana externa que reduzem a entrada dos carbapenemos (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012).

A detecção das carbapenemases é feita por métodos fenotípicos e com recurso ao método de difusão em disco, colocando-se um disco de faropenemo em gelose MH, antibiótico muito específico e sensível para carbapenemases. Após incubação, examina-se a formação de um halo de inibição. Na ausência de halo significa que a bactéria é produtora de carbapenemases, ao passo que a presença de halo indica suscetibilidade aos carbapenemos (Figura 13-B).

Para a detecção de BLSE recorre-se também ao método fenotípico, com base no facto de que todas as BLSE hidrolisam as cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração e que são inibidas pelo ácido clavulânico (Pitout e Laupland, 2008). Deste modo, são posicionados numa gelose MH e com um espaçamento de 20 mm os discos de cefotaxima, ceftriaxona e amoxicilina com ácido

clavulânico. Quando se verifica a existência de sinergismo (Figura 13-A) entre os discos de antibióticos, presume-se a existência de BLSE (Mahon, Lehman e Manuselis, 2015).

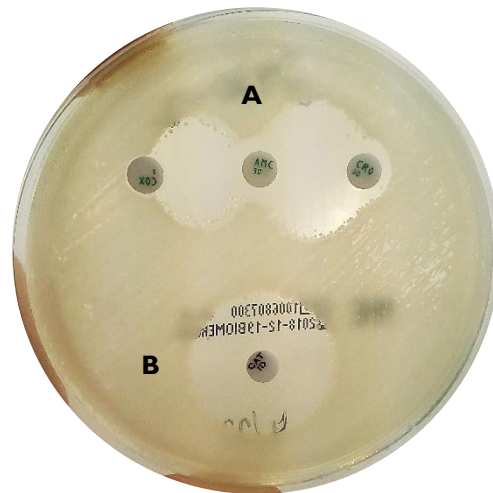


Figura 13 - Método fenotípico para a detecção de BLSE. **A** – Presença de BLSE (sinergismo); **B** – Suscetibilidade ao faropenemo. (Fonte: Setor de Microbiologia do IPOCFG).

Durante o estágio neste setor pude experienciar o processamento das diversas amostras recebidas, incluindo a sementeira nos meios de cultura e a execução de esfregaços para as técnicas de coloração (Gram e Kinyoun), incluindo a visualização dos mesmos ao microscópio ótico. Particpei também na execução de técnicas de identificação e TSA e acompanhei a validação biopatológica dos resultados.

## CONTROLO DE QUALIDADE

A execução de um bom controlo de qualidade é um aspeto crucial para que os resultados analíticos processados por um laboratório sejam fidedignos. Sabendo que os valores da amostra dos utentes são desconhecidos, é de extrema importância elaborar o controlo de qualidade, interno e externo, de modo a que os resultados sejam precisos e correspondam à clínica do utente.

Nos setores de Hematologia, Bioquímica Clínica e Imunologia/Hormonologia, todos os dias se realiza o controlo de qualidade interno antes de se iniciar o processamento das amostras. No setor de Microbiologia, ainda muito depende do trabalho manual, o controlo interno é feito de forma distinta. Contudo, todos os setores participam em programas de controlo de qualidade externo.

### I. Controlo de Qualidade Interno

O objetivo da execução do controlo de qualidade interno (CQI) é avaliar diariamente a precisão e reprodutibilidade dos métodos analíticos. Isto é conseguido pela utilização de controlos de firmas comerciais, que são processados como uma amostra e cujos resultados são posteriormente analisados consoante as regras de *Westgard*. Os controlos das firmas comerciais utilizados nos diversos equipamentos podem ser de 2 níveis (alto e baixo) ou de 3 níveis (alto, normal e baixo), como representado na Tabela 12.

Tabela 12 - Níveis do Controlo de qualidade interno para os diferentes setores do IPOCFG.

Setor	Controlo	Níveis de controlo
<b>Imunologia &amp; Hormonologia</b>	Todos os parâmetros	2 (normal e patológico alto)
<b>Bioquímica Clínica</b>	Ionograma	3 (normal, patológicos alto e baixo)
	Parâmetros bioquímicos	2 (normal e patológico alto)
<b>Hematologia</b>	Hemograma	3 (normal, patológicos alto e baixo)
	Velocidade de sedimentação	
	Provas da coagulação	

Caso os resultados obtidos para os diferentes controlos se insiram nas normalidades que constituem as regras de *Westgard*, significa que existe uma boa precisão e reprodutibilidade dos mesmos, pelo que é seguro proceder ao processamento das amostras dos utentes. Quando os controlos fogem às regras de *Westgard*, é necessário aplicar medidas corretivas, como a calibração, e também repetição dos controlos, para que estes voltem a estar de acordo com as regras.

No setor de Imunologia/Hormonologia, o controlo das técnicas manuais é efetuado em simultâneo com a amostra. Cada lote possui limites de referência nos quais os controlos se devem inserir para que os resultados e calibradores da amostra possuam valores fidedignos. Quando os controlos não se enquadram nesses limites, todo o processo da técnica manual deve ser repetido, para garantir os resultados.

No que diz respeito ao setor de Microbiologia, o CQI engloba outras metodologias: o controlo estéril das placas, o controlo estéril dos reagentes e o controlo do crescimento das placas e do Vitek® 2 a partir de estirpes de referência ATCC.

As placas dos meios cultura querem-se estéreis e em boas condições para que o crescimento microbiológico das amostras dos utentes não seja influenciado. O controlo microbiológico dos meios de cultura é feito sempre que abre um novo lote, incubando uma das placas a 37°C durante 48h e sem qualquer inoculação, registando os resultados passado as 24h e as 48h.

O controlo microbiológico da solução salina, é realizado a partir da sua inoculação numa gelose COS, que se põe a incubar a 37°C durante 48h.

De modo a garantir a qualidade do sistema Vitek® 2, bem como das cartas ID e TSA, recorre-se a estirpes de referência ATCC (*American Type Culture Collection*). Estas estirpes são sujeitas ao processamento normal para as cartas ID e TSA, cuja identificação e antibiograma vão permitir confirmar a qualidade das cartas.

## **2. Controlo de Qualidade Externo**

A finalidade do controlo qualidade externo (CQE) é avaliar a exatidão dos resultados laboratoriais obtidos, permitindo a sua comparação com os resultados laboratoriais de todos os laboratórios de análises que participaram no mesmo programa.

Os programas de CQE em que o SPC participa são o programa nacional do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), que se realiza em todos os setores e o

programa internacional *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), que se realiza nos setores de Hematologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia.

Com uma periodicidade definida, os diferentes setores recebem amostras destes programas, cuja concentração dos analitos é desconhecida. Após realização do CQI, estas amostras do CQE podem então ser processadas e os resultados são posteriormente reportados às entidades responsáveis (INSA ou RIQAS). Quando, por fim, é emitido o relatório final, é possível comparar os resultados obtidos no laboratório com os outros laboratórios que também participaram no mesmo programa. Esta comparação pode ser avaliada por parâmetro, método e equipamento.

Para o setor de Microbiologia, o CQE engloba o programa do INSA, em que são enviadas amostras com microrganismos para posterior identificação. Por norma, cada amostra apenas contém um microrganismo. Realizam-se ensaios de Bacteriologia (4 por ano), Micologia (4 por ano) e Parasitologia (3 por ano) e por cada ensaio são enviados diferentes números de amostras, 4 para Bacteriologia e 3 para Micologia, por exemplo, que serão processadas de acordo com a informação clínica que vem no programa do INSA. Assim que o microrganismo é identificado, este é reportado ao INSA e no relatório final pode verificar-se a taxa de sucesso da identificação, de acordo com as metodologias utilizadas.



## CONCLUSÃO

A realização deste relatório de estágio representa o final de uma etapa muito importante no meu percurso acadêmico, a conclusão do Mestrado em Análises Clínicas. Este mestrado superou em muitos aspectos as minhas expectativas, pois através dele consegui entender a importância das Análises Clínicas no mundo da medicina atual, sendo ela, sem margem para dúvidas, uma “peça-chave” na orientação do diagnóstico, monitorização da terapêutica e estabelecimento de prognósticos.

Ficarei eternamente grata pela possibilidade de efetuar o Estágio Curricular no SPC do IPOCFG. Iniciei esta etapa de estagiária bastante nervosa, pois nunca tinha presenciado o mundo da prática clínica profissional, mas terminei-a satisfeita e ansiosa por poder praticá-la o mais brevemente possível. Os profissionais de saúde do SPC foram cruciais na aquisição de novos conhecimentos e também na consolidação de conceitos lecionados nas aulas teóricas.

Esta oportunidade de estágio permitiu-me ainda obter uma perspectiva da realidade quotidiana das doenças oncológicas, da importância de uma boa interpretação de resultados e da necessidade de descobrir novas tecnologias que permitam o rastreio e diagnóstico precoce, bem como a existência de terapêuticas menos agressivas para os pacientes oncológicos. É deveras marcante o impacto que uma simples determinação analítica pode causar na vida de uma pessoa, pelo que não devemos esquecer que estamos a trabalhar em prol do bem de alguém.

Posso então concluir que tanto o Estágio Curricular como o Mestrado em Análises Clínicas foram experiências fulcrais na minha jornada, dando um rumo à minha próxima fase na vida, pois a prática clínica laboratorial e a constante necessidade de obter novos conhecimentos fazem-me querer integrar uma profissão nesta área da saúde.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPHA-BAZIN, Béatrice *et al.* - **Europium cryptate-tethered ribonucleotide for the labeling of RNA and its detection by time-resolved amplification of cryptate emission.** *Analytical Biochemistry.* 286:2000) 17–25.

BORDA, Ana *et al.* - **Prognostic value of preoperative carcinoembryogenic antigen: Is it useful in all stages of colorectal cancer?** *Gastroenterología y Hepatología (English Edition).* 39:3 (2016) 191–198.

BROOKS, Geo. F. *et al.* - **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg.** 26<sup>a</sup> ed. [S.l.] Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2014. ISBN 978-85-8055-335-2.

BURTIS, Carl; BRUNS, David; SAWYER, Barbara - **Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular.** 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Saunders, Elsevier, 2016. ISBN 978-85-352-8166-8.

CHAMHUM DE ALMEIDA, José Ricardo *et al.* - **Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura.** *Revista Brasileira de Cancerologia.* 53:3 (2007) 305–316.

CHAMPER, M. *et al.* - **The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer.** *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 125:3 (2017) 309–315.

CHUNG-ESAKI, Hangyul M. *et al.* - **The neuron specific enolase (NSE) ratio offers benefits over absolute value thresholds in post-cardiac arrest coma prognosis.** *Journal of Clinical Neuroscience.* 57:2018) 99–104.

COHRSEN, Andreas *et al.* - **Reliability of the Whiff Test in Clinical Practice.** *The Journal of the American Board of Family Practice.* 18:6 (2005) 561–562.

DANIEL, Diana; LALITHA, R. M. - **Tumor markers – A bird’s eye view.** *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.* . ISSN 2212-5558. 28:6 (2016) 475–480.

DASGUPTA, Amitava; WAHED, Amer - **Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control**. Oxford: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-407821-5.

DATTA, Pradip - **Immunoassay Design for Screening of Drugs of Abuse**. Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, 2019 ISBN 978-0-12-815607-0. p. 121–128.

EVANS, Carol; TENNANT, Sarah; PERROS, Petros - **Thyroglobulin in differentiated thyroid cancer**. Clinica Chimica Acta. 444:(2015) 310–317.

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

GADDUCCI, Angiolo *et al.* - **The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: A review of the literature**. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 66:1 (2008) 10–20.

GOULÃO, Inês - **Infeções associadas aos cuidados de saúde**. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 62 pp. 2014.

GUADAGNI, Fiorella *et al.* - **CA 72-4 Serum Marker—A New Tool in the Management of Carcinoma Patients**. Cancer Investigation. 13:2 (1995) 227–238.

HARRIS, Daniel C. - **Quantitative Chemical Analysis**. 8<sup>a</sup> ed. New York : W. H. Freeman and Company, 2010. ISBN 978-1-4292-1815-3.

JESSUP, Milburn; THOMAS, Peter - **Carcinoembryonic antigen: Function in metastasis by human colorectal carcinoma**. Cancer and Metastasis Reviews. 8:3 (1989) 263–280.

LEE, Yong Jae *et al.* - **Prognostic significance of CA-125 re-elevation after interval debulking surgery in patients with advanced-stage ovarian cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy**. European Journal of Surgical Oncology. 45:4 (2019) 644–649.

LIMA, Volney *et al.* - **Carcinomatose menígea nos tumores sólidos**. Revista Brasileira de Cancerologia. Brasil. 2003) 49(4): 245-251.

MADIGAN, Michael T. *et al.* - **Microbiologia de Brock**. 14<sup>a</sup> ed. Porto Alegre : Artmed Editora, Ltda, 2016. ISBN 9780321897398.

MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; MANUSELIS, George - **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5th. ed. Missouri : Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.

MOLINA, Rafael *et al.* - **Utilidad clínica de los marcadores tumorales [Estado actual y perspectivas de futuro III]**. Sant Cugat del Vallès : Roche Diagnostics S.L., 2011

MONTERO, Claudio - **The Antigen-Antibody Reaction in Immunohistochemistry**. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. . ISSN 0022-1554. 51:1 (2003) 1–4.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Microbiologia Médica**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro : Elsevier Editora Ltda., 2014. ISBN 978-85-352-7106-5.

NORDMANN, Patrice; DORTET, Laurent; POIREL, Laurent - **Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm!** Trends in Molecular Medicine. . ISSN 14714914. 18:5 (2012) 263–272.

PITOUT, Johann D. D.; LAUPLAND, Kevin B. - **Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern**. Lancet Infectious Diseases. 8:March (2008) 159–166.

RICHTER, Mark M. - **Electrochemiluminescence (ECL)**. Chemical Reviews. 104:6 (2004) 3003–3036.

RUIBAL, A. *et al.* - **Estudio de las concentraciones citosólicas de CYFRA 21.1 en adenocarcinomas de pulmón, correlación con otros parámetros clinicobiológicos**. Revista Española de Medicina Nuclear. 21:5 (2002) 333–337.

SEIFERT, G.; BERRY, C. L.; GRUNDMANN, E. - **Morphological Tumor Markers - General Aspects and Diagnostic Relevance**. Berlin : Springer-Verlag, 1987. ISBN 978-3-642-71358-3.

STEVENSON, J. D. *et al.* - **Multiple myeloma: a review**. Orthopaedics and Trauma. 28:2014) 187–193.

STRAUSS, H. G. *et al.* - **SCC antigen in the serum as an independent prognostic factor in operable squamous cell carcinoma of the cervix**. European Journal of Cancer. 38:15 (2002) 1987–1991.

TILLE, Patricia - **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (14th edition)**. 14<sup>a</sup> ed. Missouri : [s.n.]. ISBN 978-0-323-35482-0.

ZHAO, Lixia; SUN, Li; CHU, Xiaogang - **Chemiluminescence immunoassay**. Trends in Analytical Chemistry. 28:4 (2009) 404–415.

ZIMBRO, Mary Jo *et al.* - **Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media**. 2<sup>a</sup> ed. Maryland : Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN 0-9727207-1-5.