

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Cláudia Rafaela Freitas Silva

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientada pelo Doutor Frederico Valido e pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2020



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Cláudia Rafaela Freitas Silva

Dissertação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Valido e pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora interna, Professora Sara Domingues, agradeço todos os conselhos e disponibilidade para esclarecimentos de dúvidas ao longo da realização deste relatório.

Ao Dr. Frederico Valido, meu orientador externo, pela oportunidade de estagiar no seu serviço, pela partilha de experiência de vida e pela confiança.

À Professora Ana Miguel, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela organização deste estágio.

Ao pessoal do IPO, em particular aos orientadores de cada setor, Dr. Nuno Cunha, Dra. Maria Alexandre Mendes, Dra. Ana Catarina Fonseca e Dra. Ana Paiva por todos os ensinamentos e conselhos úteis para a vida profissional.

À minha família e ao meu namorado, um especial obrigada por nunca me deixarem ir abaixo e pelo apoio demonstrado ao longo destes meses. Sem vocês nada disto era possível!



## ÍNDICE

INTRODUÇÃO .....	1
CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO .....	3
HEMATOLOGIA .....	5
MICROBIOLOGIA .....	6
1- Recepção e Exame macroscópico .....	6
2- Coloração de Gram.....	6
3- Coloração de Kinyoun.....	7
4- Meios de cultura.....	8
5- Processamento de amostras.....	13
o Urina .....	13
o Sangue.....	15
o Amostras respiratórias .....	16
o Fezes .....	18
o Exsudatos.....	20
o Gânglios e Biópsias .....	22
o Pontas de cateter .....	23
o Líquido Cefalorraquidiano.....	23
6- Exame Micológico (Dermatófitos) .....	24
7- Exame Micobacteriológico .....	24
8- Identificação dos Microrganismos .....	26
9- Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana .....	29
10- Mecanismos de Resistência Antimicrobianos .....	30
11- Controlo de Qualidade.....	31
IMUNOLOGIA.....	32
1- Recepção e Tratamento de Amostras.....	32

2-	Imunoensaios.....	32
3-	Marcadores Tumorais .....	36
o	Enolase Neuro-específica (NSE) .....	37
o	Cyfra 21.1 .....	38
o	Calcitonina.....	38
o	Tiroglobulina .....	39
o	Antigénio Carcinoembrionário (CEA) .....	39
o	Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas (SCC).....	40
o	Antigénio Hidrocarbonado 15.3 (CA 15.3).....	40
o	Antigénio Hidrocarbonado 19.9 (CA 19.9).....	40
o	$\alpha$ -Fetoproteína (AFP) .....	41
o	Antigénio Específico da Próstata (PSA).....	41
o	Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) .....	42
o	$\beta$ -2- Microglobulina (BMG).....	43
o	Antigénio Hidrocarbonado 72.4 (CA 72.4).....	43
o	Antigénio Hidrocarbonado 12.5 (CA 12.5).....	43
o	Proteína 4 do Epidídimo Humano (HE-4) .....	44
o	Peptídeo Libertador de Progastina (ProGRP) .....	44
o	Proteínas S100 .....	45
4-	Controlo de Qualidade.....	45
	BIOQUÍMICA CLÍNICA .....	47
	CONCLUSÃO.....	49
	BIBLIOGRAFIA.....	51

## ABREVIATURAS

AFP- Alfa-Fetoproteína

AINES- Anti-Inflamatórios Não Esteróides

ATCC- *American Type Culture Collection*

BAAR- Bacilo Ácido-Álcool Resistente

BHI- *Brain Heart Infusion*

BMG- Beta-2- Microglobulina

BPH- Hiperplasia Prostática Benigna, do inglês *Benign Prostatic Hyperplasia*

CA 12.5- Antígeno Hidrocarbonado 12.5, do inglês *Cancer Antigen 12.5*

CA 15.3- Antígeno Hidrocarbonado 15.3, do inglês *Cancer Antigen 15.3*

CA 19.9- Antígeno Hidrocarbonado 19.9, do inglês *Cancer Antigen 19.9*

CA 72.4- Antígeno Hidrocarbonado 72.4, do inglês *Cancer Antigen 72.4*

CAM- Gelose *Campylobacter*

CEA- Antígeno Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

CLED- Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos

CLIA- *Chemiluminescent Immunoassay*

CLSI- *The Clinical & Laboratory Standards Institute*

CNA- Colistina e Ácido Nalidíxico

COS- Gelose *Columbia* com sangue

ECLIA- *Electro-Chemiluminescent Immunoassay*

EPC- Enterobactéria Produtora de Carbapenemase

ESBL- Beta-Lactamase de Espectro Alargado, do inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

hCG- Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*

HDL- *High Density Lipoproteins*

HE-4- Proteína 4 do Epidídimo Humano, do inglês *Human Epididymis Protein 4*

INSA- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPOCFG- Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

IRMA- *Immunoradiometric Assay*

KCS- Meio de Schaedler com vitamina K3

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

LDH- Lactato Desidrogenase, do inglês *Lactate Dehydrogenase*

LDL- Low Density Lipoproteins

LJ- Meio de Löwenstein-Jensen

MHC-I- Complexo *major* de Histocompatibilidade I, do inglês *Major Histocompatibility Complex I*

MRSA- *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MT- Marcador Tumoral

NSCLC- Carcinoma de Células Não Pequenas do Pulmão, do inglês *Non Small Cell Lung Carcinoma*

NSE- Enolase Neuro-específica, do inglês *Neuron-specific enolase*

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PSA- Antígeno Específico da Próstata, do inglês *Prostate-Specific Antigen*

ProGRP- Peptídeo Libertador de Progastrina, do inglês *Pro-Gastrin-Releasing Peptide*

PTH- Hormona Paratiroide, do inglês *Parathyroid Hormone*

PVX- Gelose chocolate com Polyvitex

RIA- *Radioimmunoassay*

RIQAS- *Randox International Quality Assessment Scheme*

SCC- Carcinoma das Células Escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinoma*

SCLC- Carcinoma de Células Pequenas do Pulmão, do inglês *Small Cell Lung Cancer*

SCS- Meio de Schaedler

SGC2- Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol

SPC- Serviço de Patologia Clínica

TRACE- *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

TSA- Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSH- Hormona Estimuladora da Tiróide, do inglês *Thyroid-Stimulating Hormone*

UFC- Unidades Formadoras de Colónias

XLD- Xilose-Lisina-Desoxicolato



## RESUMO

As análises clínicas têm uma grande importância na área da saúde, especialmente em doentes oncológicos onde existe uma fase de rastreio, diagnóstico e monitorização da doença, nas quais certos parâmetros são fundamentais para o efeito.

No presente relatório, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, descrevo as atividades desenvolvidas nos 6 meses de estágio no Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, dando ênfase às áreas de Microbiologia e Imunologia e uma breve descrição da rotina dos setores de Hematologia e Bioquímica Clínica.

Neste período tive a oportunidade de integrar no serviço dos vários setores mencionados, sendo um importante marco na consolidação de todos os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.

## ABSTRACT

The Clinical Analysis are very important in the health area, especially in cancer patients where there is a phase of screening, diagnosis and monitoring of the disease, in which certain parameters are fundamental.

In this report, fulfilled within the framework of the Master`s in Clinical Analysis of Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, I describe the activities developed during the 6 months of internship at the Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, emphasizing the areas of Microbiology and Immunology and a brief description of the routine of the Hematology and Clinical Biochemistry sectors.

During this period, I had the opportunity to integrate into the service of the mentioned sectors, being an important milestone in the consolidation of all the knowledge acquired during the master`s degree.



## INTRODUÇÃO

Numa instituição como o Instituto Português de Oncologia, as análises clínicas são uma ferramenta fundamental no rastreio, no diagnóstico assim como no tratamento do cancro, e sendo este um hospital “*follow up*” estas análises fazem parte da rotina destes doentes.

Este estágio curricular ocorreu ao longo de 6 meses no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), teve início em dezembro de 2019 terminando em agosto de 2020 devido à interrupção pelo Estado de Emergência decretado associado à pandemia de Covid-19. Esta nova realidade fez com que nos tivéssemos de adaptar às novas regras do laboratório de modo a garantir toda a segurança durante o serviço.

Durante este período desenvolvi competências na área de Microbiologia, Hematologia, Imunologia e Bioquímica Clínica onde pude colaborar na rotina do serviço de cada um destes setores. Isto teve uma grande importância na minha formação profissional pois consistiu no primeiro contacto com a realidade de um laboratório sendo um culminar de 2 anos de aprendizagem.

Neste relatório vão ser abordadas com maior detalhe as áreas de Microbiologia e Imunologia, onde estive a colaborar aproximadamente 2 meses em cada uma, uma vez que são áreas de grande interesse para mim. A Microbiologia é o setor menos automatizado do SPC, sendo o de Imunologia, por outro lado, maioritariamente automatizado e com poucas técnicas manuais. Estas duas áreas estão bastante interligadas, pois os doentes oncológicos frequentemente o seu sistema imunológico afetado criando uma maior suscetibilidade às infeções bacterianas e fúngicas.

É também feita uma pequena descrição dos restantes setores, Hematologia e Bioquímica Clínica onde colaborei no serviço aproximadamente 1 mês em cada um, referindo os parâmetros determinados e técnicas realizadas nas respetivas áreas.



## CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O IPOCFG é uma unidade hospitalar pertencente ao Serviço Nacional de Saúde e considerado uma referência no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento da doença oncológica prestando estes serviços à região centro do país.

Nesta instituição existe o SPC, situado no piso 0 do edifício de Oncologia Médica, tendo como diretor o Dr. Frederico Valido que presta serviço ao SPC desde 1987 e onde cessou as suas funções em agosto de 2020 por motivos de aposentação. Aqui trabalham mais de 30 profissionais desde médicos, farmacêuticos, técnicos de diagnóstico e terapêutica, bioquímicos, biólogos, administrativos e ainda auxiliares de saúde.

Diariamente são registadas cerca de 300 a 400 amostras, incluindo internamento e ambulatório, sendo este registo feito na secretaria pelos administrativos no software informático *Modulab*. Cada doente tem um número de processo, e a cada amostra é atribuído automaticamente um número de identificação.

A colheita das amostras é realizada maioritariamente pelos técnicos de diagnóstico e terapêutica, o que permite acompanhar a fase pré-analítica ajudando a garantir resultados fidedignos dos parâmetros. Depois da colheita, as amostras são distribuídas pelos diferentes setores e processadas de acordo com o tipo de análise.

Este serviço divide-se nos setores de Hematologia, Bioquímica Clínica, Imunologia e Microbiologia. Nos 3 primeiros as determinações são feitas por métodos maioritariamente automatizados, sendo a Microbiologia ainda bastante dependente de técnicas manuais e de pessoal qualificado.

Na tabela I estão representados os principais equipamentos do SPC e sua principal utilização/ função.

Tabela I- Equipamentos do Serviço de Patologia Clínica e respetiva função.

MICROBIOLOGIA	
Vitek ® 2 - BioMérieux	Identificação e TSA de microrganismos
BD BACTEC™ 9050 Blood Culture System	Estufa para hemoculturas
Cobas ® u411 - Roche Diagnostics	Sumária de Urina
HEMATOLOGIA	
ACL TOP ® CTS 500- Instrument Laboratory	Testes de coagulação
DxH 900 - Beckman Coulter	Hemograma
Test I BCL - ALI FAX	Velocidade de Sedimentação
IMUNOLOGIA	
Immulite 2000 ® Xpi - Siemens	Autoanalizador (CLIA)
Advia Centaur Xp ® - Siemens	Autoanalizador (CLIA)
Kryptor ®	Autoanalizador (TRACE)
Cobas e601/602 Analyzer ® -Roche Diag.	Autoanalizador (ECLIA)
Atellica NEPH 630 ® - Siemens	Autoanalizador (Nefelometria)
BIOQUÍMICA CLÍNICA	
RapidChem ® 744 - Bayer	Quantificação de Iões
RapidLab ® I265 - Siemens	Gasometrias
ABL 800 Flex - Radiometer	Quantificação de Cálcio Ionizado
Atellica ® CH Analyser	Autoanalizador

## HEMATOLOGIA

O setor de Hematologia tem como responsável a Dra. Joana Diamantino, Assistente Hospitalar Graduada Especialista em Patologia Clínica.

Neste são realizadas diferentes determinações incluindo o hemograma com contagem celular diferenciada em diferentes amostras biológicas, velocidade de sedimentação, estudos da coagulação e respetivos fatores, estudos genéticos, imunofenotipagem por citometria de fluxo e ainda observação de esfregaços sanguíneos e de medula óssea ao microscópio ótico. Para estes procedimentos são utilizadas amostras como sangue total e plasma, aspirados de medula óssea e diversos líquidos biológicos.

Este setor é de extrema importância, especialmente numa unidade de saúde como o IPO uma vez que auxilia no diagnóstico e respetiva ação da terapêutica e na monitorização da doença. Também é fundamental para uma fase pré terapêutica de modo a avaliar a situação clínica do doente, sendo os resultados validados num curto espaço de tempo entre a colheita e a análise.

## MICROBIOLOGIA

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

As amostras recebidas neste setor são variadas, embora a urina, expetoração e sangue sejam as mais frequentes. Estas são processadas sempre com o objetivo de identificação do microrganismo responsável pelo processo infeccioso e respetivo Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA) de acordo com o tipo de amostra.

### 1- Receção e Exame macroscópico

Assim que as amostras entram no setor de Microbiologia é feito um exame macroscópico com o objetivo de aceitar ou rejeitar as mesmas e até mesmo observar características que possam ajudar ao diagnóstico. Amostras de expetoração, exceto para pesquisa de micobactérias, com saliva e sem muco, ou fezes não moldáveis ao contentor para pesquisa de *Clostridioides difficile*, por exemplo, podem levar à rejeição das mesmas.

O registo por leitura ótica dos produtos é feito no *Modulab*, o software informático utilizado no IPOCFG que contém os dados demográficos dos utentes.

### 2- Coloração de Gram

Após o exame macroscópico da amostra e do seu registo, na maior parte destas, faz-se a coloração de esfregaços pela técnica de Gram. Esta coloração foi desenvolvida por Hans Gram em 1884 e permite distinguir as bactérias de Gram positivo e de Gram negativo de acordo com a reação tintorial que apresentam e que se deve às características da parede celular. [1]

As primeiras são constituídas por uma membrana citoplasmática e uma espessa camada de peptidoglicano, proteínas, ácidos teicóicos e lipoteicóicos. Esta camada de peptidoglicano retém o corante primário, o violeta de genciana, assim como o mordente, o soluto de lugol. O corante primário fica retido depois da adição do diferenciador (álcool acetona) devido à baixa concentração de lípidos na parede celular bacteriana, permanecendo estas bactérias com

o tom roxo proveniente do corante primário. Por outro lado, as bactérias de Gram negativo, para além de lipopolissacarídeos, proteínas e porinas, contêm uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa com elevada quantidade de fosfolípidos. Estas bactérias ficam sem cor com a adição do diferenciador uma vez que este dissolve os lípidos da membrana externa permitindo a remoção do violeta de genciana, o corante primário. Contudo, ficam coradas de rosa com o corante secundário, a fucsina de Ziehl diluída. Todo o procedimento da coloração de Gram está descrito na tabela I.

Após o processo de secagem, estas preparações são observadas ao microscópio ótico de campo claro na objetiva de 100x ou de acordo com os dados fornecidos e pedidos. Isto permite que seja observada a morfologia das bactérias (cocos e bacilos), distinguir entre bactérias de Gram negativo e Gram positivo de acordo com a sua cor, bem como o tipo de agrupamento (por ex. estafilococos, diplococos e estreptococos ou diplobacilos e estreptobacilos). Também podemos retirar ilações acerca da qualidade (nas expetorações por exemplo) do produto biológico, assim como células representativas da amostra.

### 3- Coloração de Kinyoun

Os bacilos ácido-álcool resistentes possuem uma parede celular característica constituída maioritariamente por ácidos micólicos e arabinoglicano. Devido a esta constituição específica e morfologia, estas bactérias são consideradas bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), uma vez que resistem à descoloração pelo diferenciador.

Assim, para este tipo de bacilos, deve utilizar-se a técnica de Ziehl- Neelsen ou no caso do SPC, a coloração de Kinyoun. Trata-se de uma técnica semelhante à de Ziehl- Neelsen, mas a segunda não requer aquecimento. Desta forma, é aplicado carbolfucsina numa maior concentração seguida do diferenciador, e por fim, o verde brilhante que é um corante de contraste. A carbolfucsina, tendo grupos fenol, consegue penetrar a parede celular dos BAAR que retêm este corante ficando com uma tonalidade avermelhada em contraste com o verde do segundo corante. Tal como o procedimento anterior, este está também ilustrado na tabela II.

Tabela II- A- Técnica de coloração de Gram; B- Técnica de coloração de Kinyoun.

A- Coloração de Gram	B- Coloração de Kinyoun
<p><b>Esfregaço bacteriano</b>  <b>Violeta de Genciana</b> - 1 minuto  <b>Soluto de Lugol</b> - 30 segundos  <b>Álcool- acetona</b> - gota a gota até descorar  Lavar em água corrente  <b>Fucsina de Ziehl diluída</b>- 30 segundos  Lavar e Secar</p>	<p><b>Esfregaço bacteriano</b>  <b>Carbolfucsina</b> - 4 minutos  Lavar em água corrente  <b>Descorante</b> - 5 segundos  Lavar em água corrente  <b>Verde brilhante</b>- 30 segundos  Lavar e Secar</p>

#### 4- Meios de cultura

A inoculação da amostra em meios de cultura (sementeira) é feita a par com os esfregaços bacterianos, uma vez que a seleção dos meios de cultura é feita consoante o produto biológico. Os meios de cultura podem ser líquidos, semissólidos com 0,5 % de agar e sólidos com 1,5 % de agar. Estes podem ser subdivididos em meios não seletivos, meios de isolamento e meios diferenciais. Os primeiros permitem o crescimento da maioria dos microrganismos podendo ser enriquecidos com sangue de origem animal por exemplo, importantes para o crescimento de microrganismos fastidiosos. Os meios de isolamento podem ser seletivos inibindo o crescimento de certos grupos de bactérias ou eletivos que favorecem um grupo de bactérias num certo período de tempo. Por fim, os meios diferenciais permitem uma identificação preliminar com a adição de certos ingredientes ou substratos revelando características bioquímicas ou outras características da espécie ou grupo de microrganismos.

## Meios Não Seletivos

### ○ **COS (Gelose Columbia com sangue)**

Trata-se de um meio base Gelose Columbia com 5% sangue de carneiro adicionado. Permite o crescimento e isolamento da maioria dos microrganismos sejam estes fastidiosos ou não. O sangue de carneiro fornece ao meio o fator X (grupo heme), razão pela qual podem ser observados os vários tipos de hemólise. [2]

### ○ **PVX (Gelose chocolate com Polyvitex)**

É um meio enriquecido, em que a base é a mesma da gelose de sangue e a mistura é aquecida a 80 °C promovendo a hemólise dos eritrócitos. Devido à presença do fator X e V fornecido pelo grupo heme do sangue de carneiro e pelo Polyvitex, respetivamente, favorece o crescimento de *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. [2]

### ○ **Caldo Selenito**

Trata-se de um meio líquido de enriquecimento para *Salmonella* spp. O selenito de sódio inibe o crescimento da maioria das *Enterobacteriales* comuns da microbiota intestinal, sendo este meio utilizado em coproculturas e posteriormente subcultivado noutros meios de cultura. [2]

### ○ **Caldo GN**

Também utilizado em coproculturas, este é um meio líquido de enriquecimento ao qual são adicionados peptonas, dextrose e manitol. Este último está presente em maior concentração, favorecendo o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. e limitando o crescimento de outras bactérias fermentadoras de dextrose. [2]

### ○ **Meio Mueller Hinton**

Este meio não seletivo é recomendado para o teste de Kirby-Bauer (suscetibilidade aos antimicrobianos).

### ○ **BHI (Brain-Heart Infusion)**

Utilizado maioritariamente como um meio de enriquecimento, é constituído por infusões de cérebro e coração, peptonas e dextrose, assim como cicloheximida e/ou

cloranfenicol. É recomendado para a recuperação de fungos e bactérias aeróbias que não cresceriam em meios não enriquecidos. [2]

- **KCS (Meio de Schaedler com vitamina K3)**

É um meio enriquecido com fatores de crescimento como hemina e vitamina K3 e é perfeitamente adaptado ao crescimento tanto de bactérias exigentes aeróbias como anaeróbias conforme as condições de incubação. [2]

Meios de Isolamento e Diferenciais

- **CLED (Cistina- Lactose- Deficiente em Eletrólitos)**

Este meio de cultura é utilizado para o isolamento, contagem e identificação presuntiva de microrganismos em amostras de urina, assim como de bactérias de Gram negativo de diversas amostras biológicas. Por possuir lactose permite distinguir os fermentadores dos não fermentadores de lactose, uma vez que os primeiros baixam o pH do meio mudando este de cor verde para amarelo. Devido à deficiência em eletrólitos, inibe o “swarming” de *Proteus* spp. sendo considerado um meio diferencial e não seletivo, respectivamente. [2]

- **CNA (Colistina e Ácido Nalidíxico)**

Suplementado com 5% de sangue de carneiro e 2 antibióticos, a colistina e o ácido nalidíxico, é um meio seletivo e diferencial utilizado para o isolamento de microrganismos de Gram positivo de amostras clínicas. A presença do sangue de carneiro permite também a visualização dos vários tipos de hemólise. Este meio é utilizado em conjunto com o CLED em amostras de urina. [2]

- **SGC2 (Sabouraud com Gentamicina e Cloranfenicol)**

Idealmente utilizado para o crescimento e isolamento de fungos, é rico em glicose e tem um pH ácido prejudicial a muitas bactérias. A adição de 2 agentes antimicrobianos (gentamicina e cloranfenicol) inibe o crescimento da grande maioria de bactérias de Gram negativo assim como de Gram positivo. [2]

- **SCS (Meio de Schaedler)**

A gelose de Schaedler é um meio não seletivo que contém 5% de sangue de carneiro, vitamina K1 e cloreto de sódio favoráveis ao crescimento de microrganismos anaeróbios. Neste meio, há crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios fastidiosos. No entanto, o tipo de microrganismo recuperado depende das condições de incubação, para bactérias anaeróbias esta é feita a 37°C durante pelo menos 48 horas. [2]

- **CAM (Gelose Campylobacter)**

É um meio de isolamento para *Campylobacter* spp., geralmente patogénicas, a partir de amostras de fezes. Contém sangue de carneiro e agentes redutores, sendo que a sua seletividade é assegurada pela adição de antifúngicos e antibióticos inibindo a maioria dos contaminantes.

- **LJ (Löwenstein-Jensen)**

Este é um meio favorável ao crescimento e isolamento de colónias de micobactérias, nomeadamente de *Micobacterium tuberculosis*. É constituído por ovos inteiros coagulados, glicerol, fécula de batata assim como verde malaquite que inibe a maioria das bactérias contaminantes. [2] Esta mistura é colocada em tubos de vidro de forma inclinada e o crescimento das colónias é vigiado semanalmente durante dois meses.

As colónias de *M. tuberculosis* são tipicamente em forma de “couve flor”, rugosas e esbranquiçadas.

- **XLD (Xilose-Lisina-Desoxicolato)**

A gelose XLD é um meio diferencial e seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de microrganismos entéricos (bacilos de Gram negativo) de amostras de fezes especialmente *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. A adição de xilose permite distinguir as colónias de *Shigella* spp., uma vez que é dos poucos microrganismos entéricos que não fermentam este açúcar, resultando em colónias translúcidas. *Salmonella* spp. distingue-se de outras bactérias não patogénicas pela lisina, uma vez que esgotada a xilose estas bactérias fermentam a lisina pela lisina descarboxilose o que alcaliniza novamente o meio. O sistema indicador H<sub>2</sub>S que engloba o tiosulfato de sódio e o citrato de amónia férrico permite a visualização da produção de sulfato de hidrogénio resultando em colónias de centro negro. [2]

- **Gelose Hektoen**

Trata-se de um meio seletivo e diferencial utilizado no isolamento e crescimento de bactérias de Gram negativo de origem entérica, nomeadamente *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. de amostras de fezes. Na sua fórmula contém sais biliares que inibem microrganismos de Gram positivo, mas também pode ser tóxico para alguns de Gram negativo, retardando o seu crescimento. A presença de sacarose, lactose, salicino e dos indicadores de pH azul de bromotimol e fucsina ácida permite diferenciar as bactérias entéricas através da cor das colónias e do meio de cultura. Desta forma, os microrganismos não fermentadores destes compostos, como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., não alteram a cor do meio de cultura. Já os organismos que acidificam o meio através da fermentação, como *Escherichia coli*, mudam a cor do meio para laranja. [2]

- **Sistema Mycoline**

Sistema de 2 meios de cultura em lâmina inserida num tubo (Figura 1) destinado à cultura de fungos dermatófitos. Um dos lados da lâmina contém Sabouraud-Gentamicina-Cloranfenicol que favorece crescimento de fungos e impede o crescimento de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. Enquanto o outro lado contém Sabouraud-Cloranfenicol-Actidiona permitindo o crescimento de dermatófitos e inibindo os restantes fungos filamentosos.



Figura 1- Sistema de meio de cultura Mycoline. (IPOCFG)

- **Meio para Hemoculturas BD BACTEC™**

São meios líquidos que contêm tripticase de soja e resinas que neutralizam a ação de antibióticos, particularmente úteis em pacientes medicados.

Estes meios estão inseridos em garrafas com um sensor químico que deteta o aumento de CO<sub>2</sub> resultante da respiração celular das bactérias através da fluorescência. No SPC utilizam-se garrafas de hemocultura para aeróbios/fungos, anaeróbios e para *Mycobacterium tuberculosis*.

## 5- Processamento de amostras

### ○ **Urina**

A urina é um dos produtos biológicos mais comuns que dão entrada no laboratório de Microbiologia no SPC, assim como as infeções urinárias estão entre as infeções nosocomiais mais comuns. Estas podem ser infeções do trato urinário superior, as pielonefrites (parênquima renal) e uretrites (ureteres), ou infeções do trato urinário inferior, sendo as mais comuns as cistites (bexiga). [3] As principais vias de acesso ao trato urinário compreendem a via linfática, a via hematogénea e a via ascendente, sendo esta última a mais frequente principalmente em mulheres devido à sua fisionomia.

A colheita da amostra é feita em contentor estéril do jato médio da primeira urina da manhã, tentando não contaminar a amostra com a microbiota vaginal, perianal e uretral. Em alternativa, esta colheita pode ser feita por cateter, por aspiração suprapúbica ou por nefrostomia/uretostomia realizadas por profissionais de saúde. [4]

O exame laboratorial da urina envolve 2 etapas, a Urocultura e a Análise Sumária de urina/ Urina tipo II.

#### Urocultura

A Urocultura consiste em semear a urina em meios de cultura de modo a quantificar os microrganismos nela presentes, sendo realizada nos meios CLED, CNA e SGC2, em casos de suspeita de infeção provocada por fungos, o mais rápido possível de modo a evitar contaminações e com uma ansa de 10 µl. Estas placas são incubadas a 37 C° durante 24h, sendo posteriormente interpretadas.

Como no SPC se utilizam ansas de 10 µl, é considerado positivo uma cultura com pelo menos 1000 Unidades Formadoras de Colónias (UFC). Esta quantificação é feita no meio de CLED, tendo em conta as características inibitórias devido aos antibióticos do meio CNA.

A valorização dos resultados deverá ter em conta uma série de parâmetros como o método de colheita da urina, tipo de doente, sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultados de exames bacteriológicos anteriores. [4] Se valorizados os resultados, devemos continuar a análise, realizando os testes necessários tais como a coloração de Gram das colónias, a identificação e possivelmente o TSA.

Dos microrganismos identificados no SPC a partir de amostras de urina, podemos destacar espécies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* (Figura 2), *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp. No entanto, no caso de existirem três ou mais estirpes diferentes deve considerar-se a amostra polimicrobiana e aconselhar o clínico a pedir uma nova amostra ao paciente.

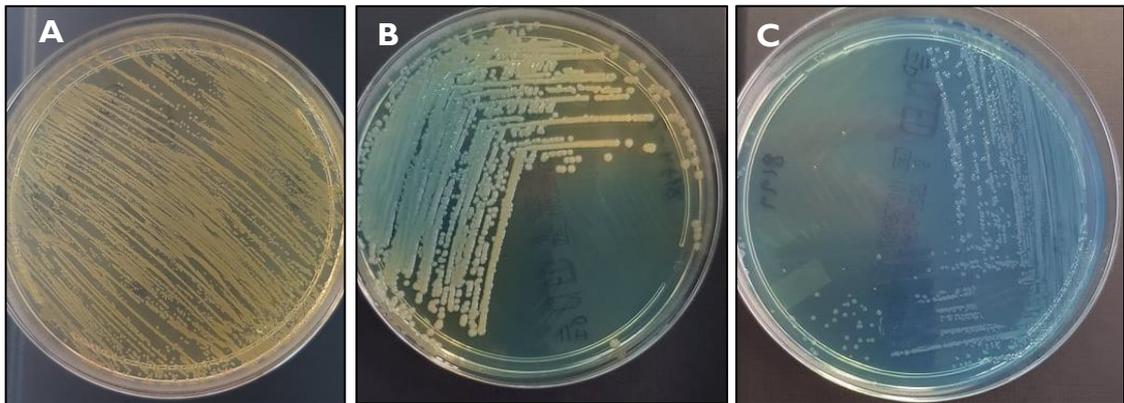


Figura 2- Diferentes microrganismos isolados a partir de amostras de urina em meio CLED. A- *Escherichia coli*; B- *Klebsiella pneumoniae*; C- *Proteus mirabilis*. (IPOCFG)

#### Análise sumária de urina

Após a sementeira é feita a análise quantitativa de alguns parâmetros bioquímicos em urina não centrifugada. É mergulhada uma tira *Combur test* num tubo contendo a urina, colocando-a logo de seguida no Cobas ® u411 que faz a leitura automática de parâmetros como o pH, a densidade, leucócitos, nitritos, bilirrubina, proteína, glicose, cetonas, urobilinogénio e sangue segundo reações colorimétricas. Também é inserido neste equipamento o aspeto da urina, uma característica macroscópica.

A segunda parte da Análise sumária de urina é feita em urina centrifugada a 1500 rpm durante 5 min, sendo o sedimento observado ao microscópio ótico de campo claro numa preparação a fresco entre lâmina e lamela. Nesta fase deve ser observada a possível existência de leucócitos, glóbulos vermelhos, células epiteliais, cilindros, cristais, microrganismos e outros elementos anormais com a objetiva de 40x em pelo menos 10 campos diferentes da lâmina.

- **Sangue**

O fluido sanguíneo é um dos produtos biológicos mais frequentes no SPC, sendo a maioria dos episódios de septicemia de origem hospitalar resultado da presença de microrganismos com elevada resistência aos antibióticos, associada a uma grande taxa de mortalidade. [3]

Sendo considerado um fluido biológico estéril, o isolamento de apenas um microrganismo a partir de hemoculturas representa normalmente o agente etiológico da infecção. Esta ocorre geralmente por penetração a partir de um foco primário de infecção ou por entrada direta na corrente sanguínea através de dispositivos vasculares. [4]

A colheita deste produto biológico requer um cuidado extra, uma vez que a contaminação ocorre com alguma facilidade devido à microbiota da pele. Assim, é necessário proceder à desinfecção da pele com solução antisséptica de forma circular e do interior para a periferia. O sangue deve ser colhido por punção venosa ou por cateter venoso central quando necessário, sendo que no caso da primeira situação, devem ser efetuadas colheitas em veias periféricas diferentes para aumentar a probabilidade de detecção do microrganismo presente. [4]

As garrafas de hemocultura devem ser inoculadas com 8 a 10 ml de sangue no caso da pesquisa de microrganismos aeróbios e fungos e colocadas com a maior brevidade no equipamento automatizado BD BACTEC™ 9050 *Blood Culture System* que incuba, agita e monitoriza as amostras a cada 10 minutos permitindo uma rápida detecção de resultados positivos. Estas leituras são realizadas durante 7 dias no caso de crescimento bacteriano e 14 dias no caso de crescimento de fungos.

Assim que o equipamento indica que uma amostra positivou, é feita a repicagem da mesma em meio de cultura COS pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido e incubada a 37 °C durante pelo menos 24 horas. Paralelamente, devem efetuar-se 2 esfregaços bacterianos e respetiva coloração de Gram, assim como a sua observação ao microscópio ótico. De ressaltar que a repicagem deve ser feita mesmo que não sejam observados microrganismos na coloração de Gram. Dependendo dos resultados observados, procede-se à respetiva identificação e TSA.

Em amostras de sangue do SPC, prevalecem identificados microrganismos como *Staphylococcus aureus* (Figura 3), *Escherichia coli*, *Candida* spp., e ainda *Staphylococcus* coagulase negativa como *Staphylococcus epidermidis*.

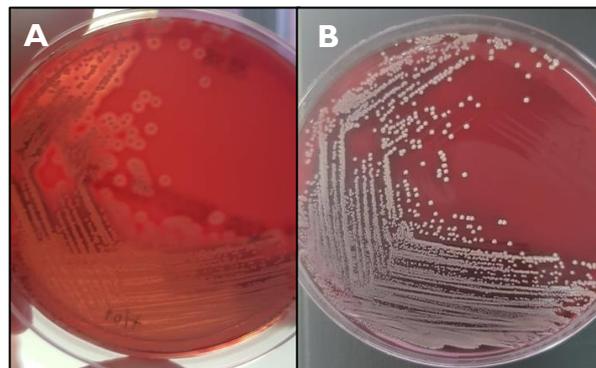


Figura 3- A e B- *Staphylococcus aureus* isolado a partir de amostra de sangue em meio COS. (IPOCFG)

#### Caso Clínico:

Amostra de sangue de homem de 63 anos, em que a garrafa de hemocultura positivou. Semeou-se a mesma em meio de cultura COS, verificando-se a presença de cocos de Gram positivo no exame direto pela técnica de Gram.

Como se tratava de uma amostra considerada urgente, e tendo em conta o resultado do diagnóstico preliminar, recorreu-se à biologia molecular para despistar a hipótese de estarmos perante *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), particularmente preocupante em meio hospitalar uma vez que pode causar sérias infecções nosocomiais.

O reagente inativa as bactérias e lisa a membrana de modo a libertar o seu DNA, sendo o conteúdo colocado posteriormente no cartucho GeneXpert® para fazer Real Time PCR. Neste caso, o microrganismo presente na hemocultura não era um *Staphylococcus aureus*, logo também não era resistente à metilina.

#### ○ **Amostras respiratórias**

Em caso de suspeita de infecção do trato respiratório inferior são colhidas amostras como expectoração e lavados brônquicos, sendo que as primeiras são facilmente contaminadas pela microbiota comensal da orofaringe durante o processo de colheita. [4]

#### Expectoração

A colheita deve ser da primeira expectoração da manhã produzida por tosse profunda e para um contentor estéril com rosca após lavagem da boca. Idealmente devem ser colhidas três amostras em três dias consecutivos, desprezando as amostras que contêm saliva, uma vez que não são representativas.

Para avaliar a qualidade das amostras de expetoração são feitos esfregaços que são posteriormente corados pela técnica de coloração de Gram e observados ao microscópio ótico com a objetiva de 10x. Durante a observação, deve ter-se em atenção certos aspetos como a relação entre leucócitos e células epiteliais pavimentosas que permite avaliar se a amostra é uma verdadeira expetoração ou se houve contaminação com saliva, sendo que no segundo caso a amostra deve ser rejeitada. [4] Nesta classificação é utilizado o critério de Murray e Washington indicada na tabela III. Segundo este critério, apenas as amostras englobadas nos grupos 4 e 5 são adequadas para prosseguir com o processamento das mesmas, uma vez que a razão leucócitos/ células epiteliais é alta. As restantes devem então ser rejeitadas.

Tabela III- Tabela de Murray e Washington. [4]

Grupos	Células epiteliais/ pequena ampliação (10x)	Leucócitos/pequena ampliação (10x)
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Outro aspeto a ter em conta é a observação de bactérias com a objetiva de 50x e com óleo de imersão, onde devemos ter em atenção a morfologia das bactérias e se as mesmas coram de Gram negativo ou de Gram positivo. Isto permite-nos orientar o processamento da amostra e resultados, tendo em conta o predomínio ou não de algum agente microbiano. Posteriormente, a amostra deve ser semeada em meio COS, PVX e SGC2 pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido sendo incubados a 37 °C em atmosfera aeróbia durante pelo menos 24 horas e um mês no caso do SGC2. A interpretação destas placas depende das colónias observadas. Se não houver predomínio de colónias a amostra é dada como polimicrobiana. Se contrário, repica-se a colónia predominante para um novo meio sólido, obtendo assim uma cultura pura.

Na figura 4 podemos observar culturas puras de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos isolados frequentemente a partir de amostras respiratórias no

SPC, assim como *Haemophilus influenzae*. A partir destas culturas puras procede-se à identificação e respetivos testes de suscetibilidade.

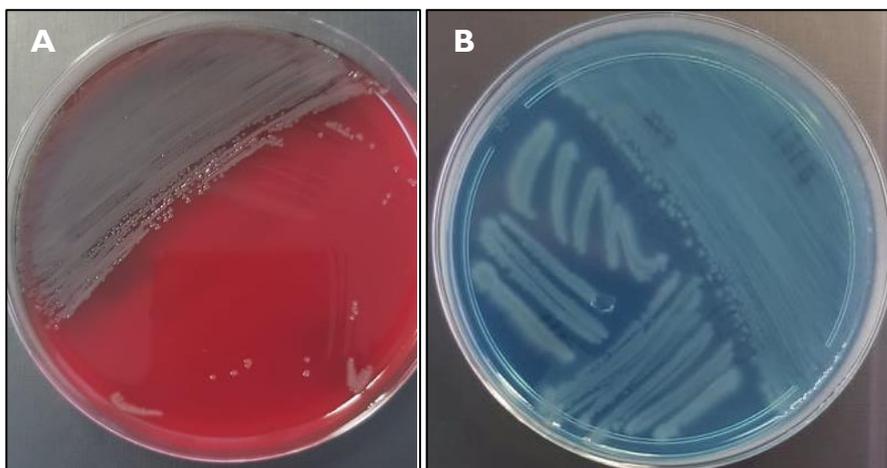


Figura 4- A- *Escherichia coli* isolada em COS a partir de uma amostra de expetoração; B- *Pseudomonas aeruginosa* isolada em CLED a partir de uma amostra de expetoração. (IPOCFG)

#### ○ **Fezes**

Por rotina, no SPC submetem-se as amostras de fezes à pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp., a coprocultura, sendo efetuada a pesquisa de *Clostridioides difficile* e outros microrganismos apenas por indicação médica.

#### Coprocultura

Idealmente, a colheita de fezes é feita em três dias consecutivos para recipiente estéril e sem refrigeração, tendo assim de ser processado rapidamente.

No caso da coprocultura, a amostra é semeada em Hektoen e XLD, assim como nos caldos de enriquecimento GN e Selenito. Estes meios devem ser incubados a 37 °C durante 24 horas no caso dos meios sólidos e 12 horas no caso dos caldos de enriquecimento. Esta cultura nos meios sólidos é feita para despiste de presença de fungos e microbiota, rentabilizando o tempo de espera de incubação dos meios líquidos. Após as 12 horas de incubação dos caldos de enriquecimento, estes são repicados para meio sólido XLD e Hektoen.

Pela observação das placas e características diferenciais dos meios de cultura sólidos Hektoen e XLD, é possível distinguir as colónias de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. azuis esverdeadas no meio Hektoen, uma vez que não são fermentadoras da lactose, sendo que as

primeiras são produtoras de H<sub>2</sub>S tendo o centro negro, ao contrário de *Shigella* spp. No caso do meio XLD, as colónias avermelhadas correspondem a colónias de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., tendo as colónias das primeiras o centro negro. A partir destas colónias puras devemos seguir com a identificação destes microrganismos e respetivo TSA.

#### Pesquisa de *Campylobacter* spp.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. faz-se através de um teste rápido imunocromatográfico para deteção de antigénios deste género, utilizando o kit RIDA® Quick *Campylobacter*. A amostra deve ser inoculada na cassette depois da adição de reagentes de extração de antigénio para reação com os anticorpos existentes. Os resultados são interpretados na zona T (teste) e C (controlo), sendo que na zona T são detetados os antigénios de *Campylobacter* spp., enquanto na zona C se deteta os anticorpos dos reagentes. O teste é considerado positivo se as duas bandas estiverem presentes, negativo se apenas aparecer uma banda na zona controlo e inconclusivo/inválido no caso de não aparecer banda na zona controlo.

Se o teste imunocromatográfico for positivo, a amostra é semeada em gelose *Campyloset* (CAM) pela técnica de esgotamento de produto por extensão à superfície do meio sólido e incubada a 42 °C durante pelo menos 24 horas em atmosfera microaerofílica para identificação da espécie e respetivo TSA.

#### Pesquisa de *Clostridioides difficile*

Esta pesquisa baseia-se em 2 testes, a pesquisa da enzima glutamato desidrogenase e da toxina B desta mesma bactéria. A amostra de fezes, neste caso, deve ser moldável ao contentor estéril.

A deteção da enzima glutamato desidrogenase, específica de *Clostridium difficile* é feita através do kit RIDA® Quick *Clostridium difficile*. O princípio deste teste é idêntico ao da pesquisa de antigénio de *Campylobacter* spp., sendo a amostra homogeneizada com reagentes de extração de antigénio para reação com os anticorpos existentes específicos de *Clostridium difficile* e os resultados interpretados da mesma forma.

No caso de o teste anterior ser positivo, procede-se à confirmação pela pesquisa das toxinas B e binária desta bactéria através de PCR em tempo real no GeneXpert®. Se for positivo indica-nos que a estirpe presente é produtora de uma destas toxinas. Por outro lado, se o teste for negativo, a bactéria está presente na amostra, mas não produz toxina, não sendo patogénica.

#### Pesquisa de sangue oculto nas fezes

Este é um teste imunocromatográfico que pesquisa a presença de hemoglobina humana e que se baseia no princípio da pesquisa de glutamato desidrogenase e *Campylobacter* spp. No entanto, a amostra reage com partículas revestidas com anticorpo anti- hemoglobina humana. A interpretação dos resultados também é idêntica à já descrita anteriormente, sendo positiva quando aparecem 2 bandas coloridas na zona teste e zona controlo (Figura 5).



Figura 5- Pesquisa de sangue oculto nas fezes. 1 e 2- negativos; 3- positivo. (IPOCFG)

#### ○ Exsudatos

No caso do SPC, os exsudatos para análise são maioritariamente de feridas resultantes de cirurgias ou de dispositivos como cateteres, feridas tumorais, fístulas, entre outros. Dadas as muitas situações clínicas e múltiplos microrganismos responsáveis por estas infeções, a metodologia para o estudo de exsudatos tem de ter em atenção o local da infeção, a história clínica, o tipo de infeção e o modo de colheita. [4]

Em caso de ferida aberta, a colheita é feita com zaragatoa (nunca seca) e em meio de transporte de Stuart ou Amies. Em lesões fechadas deve ser feita por punção e aspiração com agulha e seringa evitando a contaminação com a microbiota da pele. Neste caso devemos ter em consideração a possibilidade de se tratar de microrganismos anaeróbios e processar a amostra devidamente. Todos os recipientes devem ser estéreis. Quanto ao processamento destas amostras, são feitos sempre esfregaços a partir da amostra e posterior coloração de Gram, assim como a sementeira em meio sólido COS, PVX e SGC2 pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície do meio sólido, incubando a 37 °C durante pelo menos 24 horas.

No caso de suspeita da presença de microrganismos anaeróbios e se a amostra estiver nas devidas condições, esta é inoculada em meio KCS, assim como em COS, PVX, SGC2 e SCS (em anaerobiose). A atmosfera anaeróbia é obtida através do GENbag que é composto por uma bolsa de plástico e um gerador de atmosfera anaeróbia. Todos estes meios incubam a 37 °C durante pelo menos 24 horas, sendo o meio SCS incubado cinco dias. Devido ao crescimento bacteriano, o meio KCS apresenta turvação, e é sempre repicado para meio sólido COS e SGC2 em aerobiose e anaerobiose, respetivamente. Também são feitos esfregaços a partir deste meio líquido e respetiva coloração de Gram. Todas estas etapas são feitas com o objetivo de identificar o microrganismo infeccioso e determinar a sua suscetibilidade aos antimicrobianos.

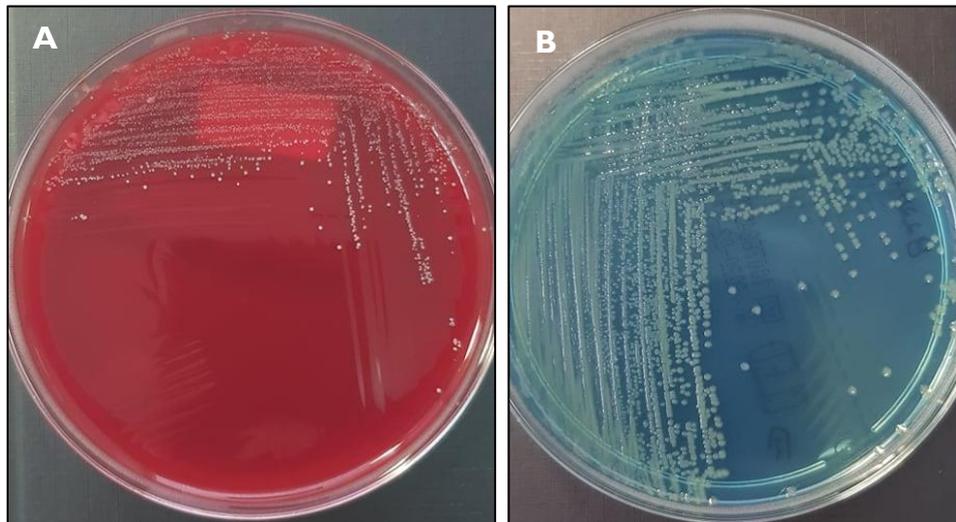


Figura 6- A- *Enterococcus faecium* isolado em COS a partir de um exsudato purulento superficial; B- *Pseudomonas aeruginosa* isolado em CLED a partir de um exsudato purulento superficial. (IPOCFG)

No SPC, é frequente isolar neste tipo de amostra espécies como *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* (figura 6) e *Staphylococcus aureus*.

## Exsudatos Vaginais

Estes tipos de exsudatos são colhidos e processados da mesma forma que outros exsudatos, no entanto, o exame a fresco e a coloração de Gram são fundamentais para o diagnóstico de patologias genitais femininas.

No caso do exame direto a fresco, este deve ser feito o mais breve possível. Isto para que os possíveis parasitas presentes, como *Trichomonas vaginalis*, estejam vivos e para que o número de leveduras seja real e representativo da amostra. Na lâmina coloca-se uma gota de NaCl a 0,9% com a amostra e observa-se ao microscópio na objetiva de 40x.

Após coloração de Gram, na observação ao microscópio deve descrever-se a microbiota existente, assim como avaliar a presença de células epiteliais revestidas de cocobacilos (Clue Cells), indicativas de infecção por *Gardnerella vaginalis* ou *Mobiluncus* spp. Ter em conta também a presença de diplococos de Gram negativo no interior de leucócitos pois são característicos de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*. [4]

### Caso Clínico:

Amostra de exsudado vaginal de uma mulher em idade fértil. Utilizou-se um método de identificação para bactérias de Gram positivo, de acordo com o observado nos meios de cultura e no esfregaço corado pela técnica de Gram, o BDBBL *Crystal 2*. Este é um método cromogéneo e interpretado por luz UV, sendo a numeração colocada na base de dados BDBBL *Crystal Microbiology Interactive Database* que nos identificou o microrganismo *Streptococcus pyogenes*.

Esta bactéria pode provocar endometrites e vulvovaginites em mulheres adultas, principalmente quando o parceiro sexual é portador do mesmo microrganismo. [5] Pode também colonizar a vagina da mulher, que em caso de gravidez deve valorizar-se uma vez que pode provocar infeções graves no recém-nascido aquando o parto como pneumonia, septicémia e meningite. [6]

### ○ **Gânglios e Biópsias**

Este produto biológico é colhido em contexto hospitalar por profissionais de saúde e enviado em contentor estéril. Se necessário faz-se maceração da amostra e semeia-se em meio BHI, COS e PVX incubando a 37 °C durante pelo menos 24 horas.

No caso de se verificar crescimento bacteriano no meio BHI, faz-se os esfregaços e coloração de Gram e repica-se este meio para COS. Dependendo da observação das placas, procede-se à identificação e TSA do microrganismo presente.

- **Pontas de cateter**

A análise microbiológica de pontas de cateter torna-se relevante em doentes com cateter venoso central e/ou hemoculturas positivas, uma vez que o foco de infeção poderá ser o cateter, no entanto, qualquer cateter retirado deve ser encaminhado para o laboratório. A colheita é feita removendo o cateter e enviando 5 cm do mesmo em contentor estéril.

A ponta de cateter é rodada em COS à superfície do meio de cultura (técnica de Maki) e é incubado durante 24 horas a 37 °C. Verificando-se o crescimento de >15 colónias por cada 5 cm de cateter está-se na presença de infeção e identifica-se o microrganismo. Caso a contagem seja <15 colónias, considera-se apenas a colonização bacteriana.

Paralelamente, a ponta de cateter é colocada em meio BHI, permitindo o crescimento de microrganismos que possam estar presentes no interior do cateter. Incuba-se a 37 °C durante 24 horas, repicando-se para COS se verificado crescimento bacteriano em BHI. Identificados os microrganismos dos 2 meios, sejam iguais ou diferentes, deve averiguar-se se são estes os causadores da infeção no sangue.

- **Líquido Cefalorraquidiano (LCR)**

Tal como o sangue, o LCR é um líquido biológico estéril e por isso considerado urgente o seu processamento. A colheita do LCR é feita por punção lombar e deve ser enviado imediatamente ao laboratório em contentor estéril.

Se o volume da amostra for superior a 1 ml, deve centrifugar-se a amostra a 1500 rpm durante 10 minutos e, posteriormente fazer esfregaços e respetiva coloração de Gram. Qualquer resultado positivo deve ser comunicado no momento ao corpo clínico. Simultaneamente, o produto é inoculado em BHI e em meios sólidos COS e PVX SGC2 (pela técnica de inundação), sendo todos incubados a 37 °C durante 72 horas observando as placas diariamente, exceto o SGC2 que incuba um mês para fungos filamentosos. O meio BHI deve ser repicado para meio COS e PVX ao fim de 24 horas de incubação. Qualquer microrganismo identificado é imediatamente valorizado.

## 6- Exame Micológico (Dermatófitos)

Embora seja raro, por vezes, chegam ao laboratório do IPOCFG amostras de raspados de pele e unhas para pesquisa de dermatófitos.

Estas devem ser semeadas no sistema Mycoline e SGC2 (por picada), efetuando o exame direto ao microscópio na objetiva de 40x após tratamento com KOH, onde devem ser pesquisadas estruturas fúngicas. Os meios de cultura devem ser incubados a 25 °C por um mês se o exame direto for negativo, e dois meses se positivo. No caso de crescimento de fungos filamentosos, como *Tricophyton* spp. (figura 7A), e utilizando a técnica da fita cola, devem ser observadas as estruturas fúngicas reprodutoras ao microscópio com contraste do azul de lactofenol, exemplificado com o *Tricophyton* spp. na figura 7B. As características microscópicas e macroscópicas do fungo devem ser consideradas, contribuindo para a sua identificação.

Caso se verifique o crescimento de leveduras, as colónias devem ser isoladas em meio COS para posterior identificação.

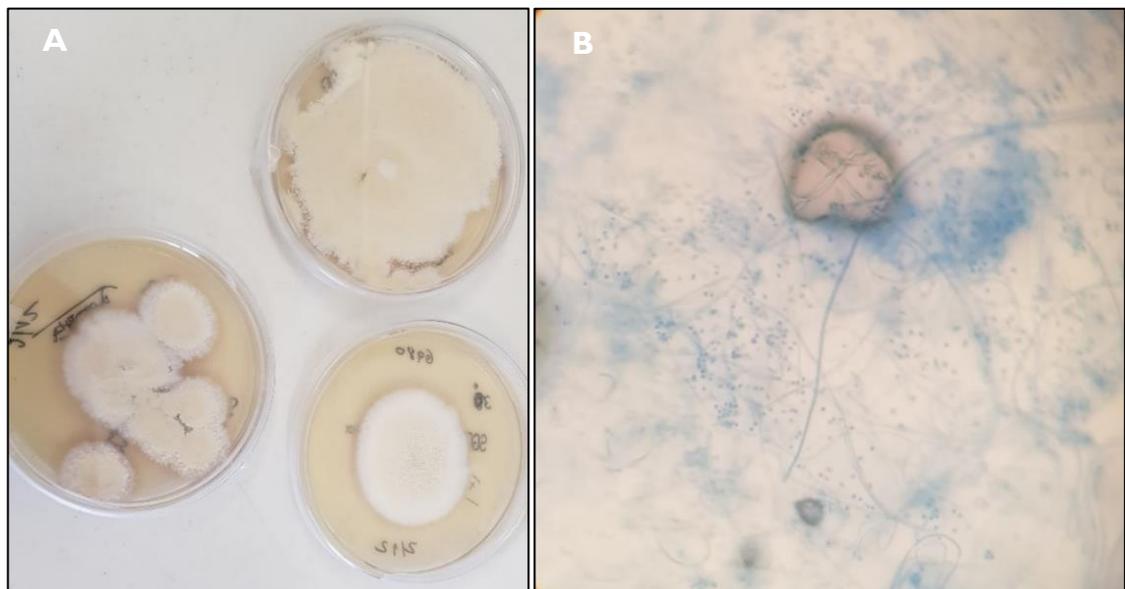


Figura 7- A-*Tricophyton* spp. isolado em SGC2; B- *Tricophyton* spp. com objetiva de 40x com contraste de azul de lactofenol. (IPOCFG)

## 7- Exame Micobacteriológico

A pesquisa de micobactérias é feita se requisitado pelo clínico e sempre que haja suspeita da presença destes microrganismos nas amostras. O exame micobacteriológico pode ser feito nas mais variadas amostras, sendo que as respiratórias são as mais frequentes.

Como as micobactérias, quando presentes, estão em baixa concentração e, dependendo da amostra, estas podem estar contaminadas devem passar por processos de descontaminação, liquefação, concentração e homogeneização. Para estas etapas é utilizado o KIT BBL MycoPrep.

### **Descontaminação e Liquefação**

Nesta etapa é utilizada uma solução constituída por NaOH, N-acetil-L-cisteína e citrato de sódio. O NaOH é utilizado como descontaminante da microbiota comensal e tal como a N-acetil-L-cisteína é um agente mucolítico. Este último também impede a ação do NaOH nos bacilos ácido-álcool resistentes. Por fim, o citrato de sódio liga-se aos iões existentes na amostra para que estes não tenham ação inibitória sobre a N-acetil-L-cisteína. O fosfato é adicionado e funciona como tampão para estabilizar a amostra. [7]

### **Concentração e Homogeneização**

Devido à baixa concentração de micobactérias em amostras positivas, estas devem centrifugar a 3000 G durante 20 minutos. São realizados dois esfregaços para posterior coloração de Kinyoun e sementeira em meio sólido Löwenstein-Jensen, o qual incuba a 37 °C durante dois meses, sendo observados semanalmente. Se ocorrer crescimento de colónia característica, deve ser feito esfregaço e coloração de Kinyoun da mesma, e caso a identificação de micobactérias pelo GeneXpert ® seja positiva o tubo de sementeira deve ser enviado para o laboratório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra para ser efetuado o TSA micobacteriano. Se negativo é pedido a identificação e respetivo TSA à mesma entidade.

Paralelamente à sementeira e esfregaços bacterianos, deve ser realizado o Xpert MTB/RIF no sistema GeneXpert ®, como acima referido, em que é pesquisado ADN de *Mycobacterium tuberculosis* e mutações do gene rpoB (resistência à rifampicina), características de *M. tuberculosis*.

## 8- Identificação dos Microrganismos

Após isolamento das espécies microbianas, a etapa seguinte corresponde à identificação do microrganismo e respetivo TSA. Para isso, são utilizadas técnicas automáticas realizadas no sistema VITEK® 2, sendo estas, por vezes, dependentes de testes manuais que orientam as cartas de identificação e TSA escolhidas.

O aspeto macroscópico das colónias e algumas provas bioquímicas são necessárias para prosseguir com a respetiva identificação.

### **Tipo de Hemólise**

Algumas bactérias têm capacidade de lisar os glóbulos vermelhos, podendo esta ser total ou parcial. Esta hemólise pode ser observada em gelose de sangue, uma vez que possui na sua composição glóbulos vermelhos.

$\beta$ -Hemólise- hemólise total dos GV, formando um halo incolor à volta das colónias.

$\alpha$ -Hemólise- hemólise parcial dos GV, formando um halo cinzento esverdeado em torno das colónias.

$\gamma$ -Hemólise- ausência de hemólise

### **Teste da Oxidase**

Este teste permite detetar a produção intracelular da enzima citocromo oxidase por bactérias não fermentadoras (oxidase positiva), ao contrário das enterobactérias que não são produtoras desta mesma enzima (oxidase negativa). [3]

O reagente utilizado tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorato impregnado em tiras comerciais, muda de cor para roxo devido à sua oxidação pela citocromo oxidase caso esta seja produzida pela célula bacteriana, sendo que a colónia deve ser retirada com uma ansa de plástico para que não ocorram falsos positivos.

### **Teste da catalase**

Trata-se de um teste que permite detetar a presença da enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em oxigénio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ). [3] Numa lâmina coloca-se uma gota de peróxido e hidrogénio e transfere-se a colónia a testar. O teste é positivo caso se observem bolhas de ar que corresponde ao oxigénio libertado pela reação química. Se não ocorrer formação de bolhas de ar ou efervescência, o teste é negativo. [4]

Esta prova é útil para distinguir estirpes de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., sendo que as primeiras são catalase positiva e as últimas catalase negativa.

### **Teste da urease**

Deteta a presença da enzima urease que degrada a ureia em amónia. Para isto, utiliza-se um meio de ureia-indol no qual se inocula a colónia bacteriana a testar, sendo posteriormente incubada a 37 °C durante pelo menos 24 horas. Assim, se a urease estiver presente, o meio alcaliniza devido à produção de amónia e muda de cor laranja para carmim.

Esta prova é útil para diferenciar colónias de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. que são urease negativa de outras bactérias fermentadoras de lactose como *Proteus* spp. que são urease positiva.

### **Teste de suscetibilidade à optoquina**

A optoquina é uma substância que inibe o crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, provocando um halo de inibição da cultura em placa. Assim, este teste torna-se útil para a distinção entre *S. pneumoniae* e os restantes estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos.

Para a realização deste teste, é preparada uma suspensão bacteriana com densidade correspondente a 0,5 da escala de MacFarland segundo a EUCAST a partir da cultura que se quer testar. Pela técnica de sementeira em toalha inocula-se a suspensão em meio Mueller-Hinton, sendo posteriormente colocado o disco de optoquina no centro da placa incubando a 37 °C durante pelo menos 24 horas (método de Kirby-Bauer). [4] O crescimento de *S. pneumoniae* provoca um halo de inibição de  $\geq 14$  mm.

### **Teste de suscetibilidade à bacitracina**

Este teste avalia o crescimento de microrganismos face à suscetibilidade à bacitracina e é realizado de forma semelhante ao teste de suscetibilidade à optoquina. Neste caso é colocado um disco de bacitracina no centro da placa já inoculada com a suspensão bacteriana

com densidade correspondente ao 0,5 MacFarland e incuba a 37 °C durante pelo menos 24 horas.

Com a interpretação do teste, podemos fazer identificação presuntiva de *Streptococcus pyogenes*, uma vez que são sensíveis a concentrações baixas de bacitracina e qualquer halo de inibição indica que o teste é considerado positivo. [3] A ausência de halo de inibição pode ser interpretada como *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos não grupo A. [4]

Tendo em conta as características macroscópicas das colónias e os resultados dos testes manuais acima descritos, podem ser escolhidas as cartas de identificação para posterior análise no sistema Vitek® 2. De seguida, é feita uma suspensão bacteriana com 3 ml de solução salina com densidade (em escala MacFarland) dependente da carta de identificação utilizada e descrito na tabela IV.

Tabela IV-Cartas de identificação, densidade da suspensão bacteriana e respetivo volume a pipetar para TSA.

<b>Carta ID</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>Densidade MacFarland</b>	<b>Volume a pipetar de suspensão bacteriana para TSA</b>
<b>GP</b>	cocos de Gram Positivo	0,60-0,63	280 $\mu$ l
<b>GN</b>	bacilos de Gram Negativo	0,60-0,63	145 $\mu$ l
<b>YST</b>	Leveduras	1,80-2.20	280 $\mu$ l
<b>ANC</b>	Anaeróbios, <i>Corynebacterium</i> spp. e outros bacilos de Gram positivo anaeróbios	2.70-3-30	*
<b>NH</b>	<i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e bacilos de Gram negativo fastidiosos	2.70-3.30	*

\* Não existem TSA automáticos para microrganismos correspondentes às cartas NH e ANC. Os respetivos controlos ID devem ser feitos em PVX e SCS (em condições de anaerobiose no caso de SCS).

## 9- Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

Também com base nas características macroscópicas das colónias e respetivas provas manuais, são escolhidas as cartas de TSA. Transfere-se um volume conhecido de suspensão bacteriana utilizada para a identificação para um tubo contendo 3 ml de solução salina, devendo posteriormente semear-se esta suspensão em meio COS, CLED ou SGC2 conforme as características da colónia a testar. Esta sementeira vai funcionar como controlo ID de forma a avaliar a pureza da suspensão bacteriana utilizada tanto para a identificação como para o TSA. Estas cartas são, por fim, colocadas no Vitek ® 2 para inoculação, incubação e análise.

A carta de identificação e respetivo TSA que deve ser utilizada para cada microrganismo, bem como a densidade da suspensão bacteriana estão descritas na tabela IV.

**AST-N355** - bacilos de Gram negativo;

**AST-N373**- bacilos de Gram negativo não fermentadores;

**AST-P648**- *Staphylococcus* spp.;

**AST-P586**- *Enterococcus* spp.;

**AST-PST03**- *Streptococcus* spp.;

**AST-YS08**- leveduras.

Após análise no Vitek ® 2, temos a espécie do microrganismo identificada, assim como a suscetibilidade ou resistência aos diferentes antibióticos testados por este sistema automático. Os resultados do TSA são realizados e analisados de acordo com as normas *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST <https://eucast.org>).

Ainda assim, no caso de dúvida podem ser realizados testes de difusão em disco ou E-test utilizando a gelose Mueller-Hinton e de acordo com as normas da EUCAST e *The Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI).

## 10- Mecanismos de Resistência Antimicrobianos

A resistência aos antibióticos é cada vez mais uma realidade preocupante, principalmente numa unidade de saúde como o IPO em que a maioria dos doentes se encontram imunodeprimidos.

Os  $\beta$ -lactâmicos são a classe de antibióticos mais utilizada sendo também, por isso, alvo frequente de mecanismos de resistência entre os quais as Beta-Lactamases de Espectro Alargado (ESBL) e as carbapenemases.

Se houver suspeita da presença de ESBL devemos confirmar através de métodos fenotípicos em meio Mueller-Hinton, previamente inoculado com suspensão bacteriana com densidade 0,5 MacFarland de acordo com as normas EUCAST. Neste meio deve ser colocado, no caso de bactérias sem AmpC indutíveis, um disco de amoxicilina/ ácido clavulânico (inibidor das  $\beta$ -lactamases) no meio de dois discos de ceftazidima e cefotaxima com 2 cm de distância entre os mesmos. Se a estirpe a testar possuir AmpC indutíveis estes dois últimos discos devem ser substituídos por um disco de cefepima também a 2 cm de distância do disco de amoxicilina/ ácido clavulânico. Os resultados são interpretados de acordo com a presença ou ausência de sinergismo criado pelo crescimento bacteriano e o efeito dos discos de antibiótico utilizados. Assim, caso haja a presença de um sinergismo entre os discos, podemos considerar a estirpe ESBL positiva (Figura 8). Por outro lado, se ocorrer ausência de sinergismo é indicativo de ESBL negativo.



Figura 8- (em cima) Exemplo de uma estirpe ES positiva, em que há um sinergismo criado pelo crescimento bacteriano; (em baixo) Exemplo de uma carbapenemase negativa, no qual há um halo de inibição do crescimento bacteriano.

Por sua vez, as carbapenemases são testadas também em meio Mueller-Hinton inoculado com suspensão bacteriana com densidade 0,5 MacFarland mas, neste é colocado apenas um disco de faropeneme. No caso de ocorrer crescimento bacteriano até ao disco podemos estar na presença de uma enterobactéria produtora de carbapenemase (EPC), uma vez que este crescimento indica uma resistência ao fármaco (Figura 8). Caso haja resistência utiliza-se, de seguida, um kit imunocromatográfico para avaliar o tipo de carbapenemase presente (OXA-48, KPC ou NDM). Se o teste positivar para alguma carbapenemase destes tipos, este confirma a existência de uma EPC. Por outro lado, se negativo devemos avançar para a biologia molecular (GeneXpert ®) que avalia duas EPC a mais que o teste imunocromatográfico (VIM e IMP). Se este for negativo para estes tipos de carbapenemase, avalia-se por último, a presença de outros mecanismos de resistência por métodos fenotípicos.

## 11- Controlo de Qualidade

Neste setor, o controlo de qualidade interno é realizado através do controlo microbiológico das placas de meios de cultura, de reagentes e da solução salina utilizada para as suspensões bacterianas incubando-os a 37 °C durante 24 horas, verificando-se posteriormente uma possível contaminação. As cartas de identificação e de TSA são controladas através de uma estirpe *American Type Culture Collection* (ATCC) de modo a garantir a qualidade das mesmas.

O controlo externo é realizado anualmente no qual são enviadas amostras bacterianas e micológicas liofilizadas. Estas amostras são acompanhadas de uma pequena história clínica e necessitam de ser hidratadas antes da sementeira e restante processamento da amostra. O objetivo é processar a amostra como se de uma amostra de um paciente se tratasse realizando a sua identificação e respetivo TSA, quando necessário. Os resultados são reportados posteriormente à entidade responsável por este controlo.

## IMUNOLOGIA

O setor de Imunologia e Hormonologia tem como responsável o Dr. Nuno Cunha, Técnico Superior de Saúde, Assistente de Laboratório, Bioquímico, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Biólogos.

Neste setor são utilizadas metodologias de imunoensaios nos doseamentos de marcadores tumorais, de função cardíaca, fármacos, proteínas de fase aguda e hormonas. Nos estudos de proteínas séricas e urinárias são usadas técnicas eletroforéticas, em gel de agarose, como o proteinograma, imunofixação e proteinúria de *Bence Jones*.

### 1- Receção e Tratamento de Amostras

A maioria das determinações efetuadas neste setor são realizadas em soro, mas também, e em casos específicos, plasma ( $K_3$ EDTA, Heparina de lítio), urina pontual, urina de 24 horas (com ou sem ácido) ou saliva. As amostras após serem colhidas em contentores apropriados e devidamente identificados com códigos de barras são rastreadas através de leitura ótica no software *Modulab* na entrada do Setor de Imunologia e Hormonologia.

As amostras de sangue são colhidas em tubos de 5 mL sem anticoagulante, com micropartículas de sílica ativadoras da coagulação e gel separador. O soro é obtido após retração do coágulo com centrifugação a 2000 G durante 10 minutos.

### 2- Imunoensaios

Os marcadores tumorais e as hormonas são essencialmente quantificados através de métodos imunoquímicos. Estes métodos baseiam-se principalmente numa reação específica entre o antigénio e o anticorpo. [8]

#### ○ **Imunoensaios não competitivos (Sandwich)**

Neste tipo de ensaios são utilizados dois clones de anticorpos distintos, em que um deles se encontra imobilizado numa matriz sólida e é mais específico para o antigénio, e o outro está marcado e liga-se a um epítopo diferente do local de ligação do primeiro anticorpo.

Desta forma, o antigénio liga-se ao primeiro anticorpo e após lavagem dos antigénios livres é adicionado o segundo anticorpo marcado formando um complexo anticorpo-antigénio-anticorpo (sandwich) (Figura 9). Desta forma, a quantidade de anticorpo marcado detetado é diretamente proporcional à concentração de antigénio na amostra. [9]

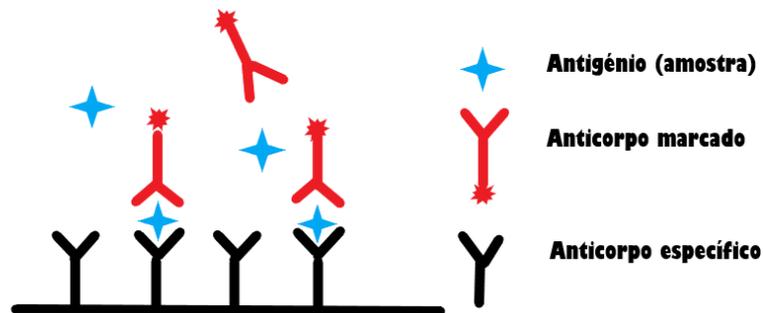


Figura 9- Esquema ilustrativo de um ensaio não competitivo.

○ **Imunoensaios competitivos**

Nos imunoensaios competitivos são utilizados dois antígenos, o da amostra e o análogo marcado, que competem por um local de ligação num número limitado de anticorpos imobilizados a uma matriz sólida (Figura 10). Assim, é adicionado uma quantidade conhecida de antígeno marcado juntamente com o antígeno da amostra à matriz com os anticorpos, e após incubação e lavagem quantifica-se o sinal. Este sinal é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra, uma vez que à medida que o antígeno da amostra liga aos anticorpos, menos antígeno marcado consegue ligar-se aos mesmos. [9]

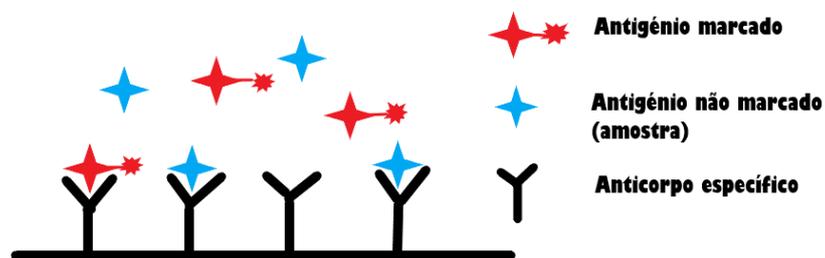


Figura 10- Esquema ilustrativo de um imunoensaio competitivo.

## Métodos de Detecção do Imunocomplexo Antígeno-Anticorpo

### ○ **Chemiluminescence Immunoassay (CLIA) e Electrochemiluminescent Immuno Assay (ECLIA)**

As reações de CLIA e ECLIA têm por base ensaios competitivos ou não competitivos. A quimioluminescência define-se como a produção de radiação eletromagnética observada após uma reação química que origina um produto ou intermediário excitado eletronicamente, que por sua vez emite luz ou transmite energia para outra molécula, emitindo esta, luz. [10]

Nos imunoensaios CLIA indiretos, os imunocomplexos formados possuem enzimas no anticorpo sinalizador (por ex. fosfatase alcalina) que reage com substratos luminogénicos, levando-os a emitir luminescência que é posteriormente fotomultiplicada e quantificada por um luminómetro. Por outro lado, no imunoensaio de ECLIA, ocorrem reações de oxidação-redução, após ser aplicado um potencial elétrico na superfície dos elétrodos de platina existentes na célula de leitura, entre um complexo de ruténio (Tris-(bipiridil) Ruténio II) ligado ao anticorpo sinalizador e a tripropilamina com emissão de luminescência a 620 nm.

### ○ **Nefelometria**

Ao contrário da turbidimetria, a nefelometria mede a dispersão da luz quando um feixe radiante colide com os imunocomplexos em suspensão numa solução, sendo este feixe disperso ou refletido em todas as direções e medido por células fotoelétricas situadas em diferentes ângulos. A intensidade de luz dispersada é diretamente proporcional à concentração do antígeno em estudo.

### ○ **Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)**

A TRACE é uma técnica que se baseia na transferência de energia de um fluorocromo dador para um fluorocromo aceitador (emissor) como resultado de uma reação imunológica. Isto ocorre porque o complexo antígeno-anticorpo promove a aproximação dos 2 fluorocromos, sendo que o aceitador sofre excitação resultando num sinal de fluorescência. Este sinal é diretamente proporcional à concentração do analito e é obtida através de uma seleção espectral e temporal. A TRACE está disponível apenas em analisadores KRYPTOR®. [11]

○ **Radioimmunoassay (RIA) e Immunoradiometric Assay (IRMA)**

A RIA e a IRMA são utilizadas nas técnicas manuais e nelas são utilizados isótopos radioativos. O radioisótopo utilizado é o  $I^{125}$ .

A RIA baseia-se em imunoenaios competitivos, onde o antígeno marcado com isótopo radioativo compete com o antígeno da amostra por locais de ligação nos anticorpos.

Por outro lado, a IRMA utiliza ensaios não competitivos onde o anticorpo secundário é marcado com um radioisótopo. A leitura da radiação emitida é feita com um contador de raios gamma ( $\gamma$ ) juntamente com uma curva de calibração utilizando concentrações conhecidas do analito. [12]

Na tabela V estão representados os métodos de detecção de imunocomplexos mencionados, equipamentos associados e respetivas determinações laboratoriais.

Tabela V- Métodos de detecção de imunocomplexos, equipamentos e respetivas determinações feitas no SPC.

<b>Métodos de detecção de imunocomplexos</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>Determinações</b>
CLIA	Immulite 2000 <sup>®</sup> Xpi (Siemens)	AND, GAS, AF, ACT, CEA, BMG, ATA, IGF, GRH, PSA, TSI, FPS, HCG, EPN
CLIA	Advia Centaur Xp <sup>®</sup> (Siemens)	DHEA-SO <sub>4</sub> , Estradiol, FSH, Prolactina, Ferritina, iPTH, LH, Progesterona, 25-OH-D total, TSH e IgE total
TRACE	Kryptor <sup>®</sup>	CA 15.3, CgA, NSE, PCT e SCC
ECLIA	Cobas e601 Analyzer <sup>®</sup> (Roche Diagnostics <sup>™</sup> )	ACTH, ATG, TG 2 <sup>a</sup> geração, Cortisol, Calcitonina, Vit. B12, FT3, FT4, T3, T4, ATSHR, Ácido Fólico, Testosterona total, Osteocalcina, S100, sHBG, PEP-C, Insulina, HE-4, ProGRP, CA 12.5, CA 19.9, CA 72.4, Cyfra 21.1
Nefelometria	Atellicca NEPH 630 <sup>®</sup> (Siemens)	Fatores do complemento C3 e C4, TRF, Ig A, sTfR, IgM, AAT IgG, HPT, ASLn, RFn, hsPCR

### 3- Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais (MT) definem-se como moléculas (enzimas, hormonas, oncoproteínas, antigénios de função variável...) induzidas ou produzidas por células cancerígenas que refletem o seu crescimento e/ou atividade e que permitem monitorizar a presença, evolução e resposta terapêutica de um tumor maligno. Estes marcadores são sintetizados por células neoplásicas, mas a maioria deles podem também ser produzidos por células normais, daí a importância de estabelecer valores de referência ou *cut-off*. [13]

Quando os MT são requisitados pelo clínico, deve ter-se em conta a sua utilidade e valorização dos resultados uma vez que estes podem determinar o risco de desenvolvimento da doença no caso de indivíduos que não têm cancro, ou, por outro lado, ajudar a distinguir entre um processo tumoral benigno ou maligno e ainda monitorizar a doença durante e depois da terapia estabelecida. [14]

Os MT podem ser avaliados pela sua especificidade e sensibilidade, sendo que o marcador é específico do tumor quando este não é detetado em doenças benignas ou na ausência de doença e a sensibilidade do marcador tumoral é determinada pela deteção precoce do mesmo permitindo assim um diagnóstico igualmente precoce da doença.

Não existem MT ideais, uma vez que para o serem devem reunir características como elevada especificidade para determinado tumor, permitir um diagnóstico precoce, ser altamente sensível evitando falsos positivos e por fim, a sua concentração deve estar relacionada com a massa tumoral assim como com a sua progressão ou regressão. [15] Quanto maior for o crescimento tumoral, maior é a probabilidade de invasão de vasos linfáticos e sanguíneos, facilitando o acesso dos MT à circulação sanguínea sendo detetados, desta forma, maiores concentrações dos mesmos. [13] No entanto, muitos marcadores encontram-se elevados em tumores benignos e podem não estar tão elevados em estádios iniciais de tumores malignos. [16] Os MT não devem ser utilizados como forma de diagnóstico primário principalmente por causa da falta de especificidade e sensibilidade. Os MT são particularmente importantes na monitorização durante e pós-terapêutica. [15]

No SPC, as determinações dos MT são maioritariamente realizadas em sangue (soro ou plasma) por punção venosa e urina de 24 horas, sendo um processo rápido, pouco dispendioso e invasivo.

Na tabela VI, estão representados os principais marcadores tumorais determinados no IPOCFG e respectivos órgãos a eles associados.

Tabela VI- Marcadores tumorais e respectivos órgãos, glândulas ou doenças associados.

<b>Órgão/ Glândula/ Doença</b>	<b>Marcador Tumoral</b>
Cérebro	NSE, Cyfra 21.1
Glândula Tiroideia	Calcitonina, Tiroglobulina, CEA
Esófago	CEA, SCC
Pulmão	NSE, Cyfra 21.1., CEA, SCC, ProGRP
Mama	CA 15.3, CEA
Fígado e Vesícula Biliar	AFP, CEA, CA19.9
Estômago	CEA, CA 72.4, Gastrina
Pâncreas	CA 19.9, CEA
Intestino e Reto	CEA, CA 19.9
Bexiga	Cyfra 21.1
Ovários	CA 12.5, HE4
Útero	SCC, CEA
Glândula da próstata	PSA total e livre
Mieloma Múltiplo	$\beta$ 2- microglobulina
Testículo	AFP, HCG

○ **Enolase Neuro-específica (NSE)**

Valores de Referência < 25ng/ml

As enolases são enzimas glicolíticas que convertem 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. [17] Ocorrem em isoenzimas diméricas com 3 subunidades diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), sendo que a  $\alpha\alpha$  distribui-se inespecificamente em órgãos como o fígado e músculo e as  $\alpha\gamma$  e  $\gamma\gamma$  (NSE) são sintetizadas principalmente por neurónios e células neuroendócrinas. [13] Assim, a NSE é particularmente útil em tumores de origem neuroectodérmica como carcinomas medulares da tiróide ou neuroblastomas e também no carcinoma de células pequenas do pulmão (SCLC), isto porque frequentemente exibem propriedades neuroendócrinas. [18]

As técnicas imunológicas de quantificação da NSE detetam a isoenzima gamma tanto como dímero como em combinação com as outras subunidades beta ou alfa.

- **Cyfra 21.1**

Valor de Referência  $\geq 3,3$  ng/ml

As citoqueratinas são proteínas que formam os filamentos do citoesqueleto e que normalmente estão presentes no tecido epitelial na forma insolúvel. [19] A citoqueratina 19 é reconhecida por 2 anticorpos monoclonais KS 19-1 e BM 19-21 através do Cyfra 21.1 e encontra-se exclusivamente no epitélio simples e pseudoestratificado, como o epitélio brônquico.

É particularmente sensível e específico em carcinomas das células escamosas assim como no carcinoma de células não pequenas do pulmão (NSCLC), sendo que permite um diagnóstico diferencial entre NSCLC e o carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC), estando aumentado no NSCLC. Os níveis de Cyfra 21.1 estão normalmente relacionados com o estágio e prognóstico de NSCLC, indicando a extensão da doença. [20] Além disso, níveis elevados de Cyfra 21.1 podem estar presentes em patologias benignas como tuberculose pulmonar ou pneumonia intersticial e ainda em patologias malignas como cancro de mama e neoplasias ginecológicas. [19]

- **Calcitonina**

Valor de Referência  $< 10$  ng/L

A calcitonina é um polipeptídeo que resulta da transformação pós-traducional do precursor preprocalcitonina que se encontra nas células C parafoliculares da tiróide. A sua principal função envolve a homeostase do cálcio e do fósforo juntamente com a hormona paratiroide (PTH) e a vitamina D, regulando a reabsorção óssea. [21]

É marcador tumoral do carcinoma medular da tiróide, ajudando tanto no diagnóstico como no seguimento de doentes pós-terapêutica, e permite ainda detetar o crescimento de células C que geralmente antecedem a neoplasia. [22]

Além do carcinoma medular da tiróide, pode verificar-se um aumento da calcitonina noutros tumores neuroendócrinos como o SCLC e em doenças tiroideas autoimunes. [13]

- **Tiroglobulina**

Valor de Referência  $\geq 1$  ng/mL

A tiroglobulina é uma glicoproteína produzida unicamente na tiróide e armazenada nos folículos desta glândula. É libertada na corrente sanguínea por estimulação da hormona estimuladora da tiróide (TSH) e pela T3 e T4, sendo a molécula precursora destas iodotironinas. [23]

Os seus níveis no soro refletem a massa de tecido tiroideo diferenciado e a inflamação ou lesão da glândula, sendo também um marcador específico da disfunção tiroidea maioritariamente de causa benigna. [13]

A tiroglobulina é o MT de eleição no estudo do cancro diferenciado da tiroide, e tem a sua maior utilidade no pós-cirúrgico, estando os seus valores relacionados com massas tumorais residuais. Os níveis de tiroglobulina são relevantes, também, depois da tiroidectomia com ablação do tecido remanescente após terapêutica com isótopos de iodo, na monitorização e progressão local e à distância. A tiroglobulina é determinada juntamente com os anticorpos antitiroglobulina para avaliar possíveis interferências destes nos imunoensaios não competitivos, que podem causar resultados falsos negativos nos doseamentos da tiroglobulina. [24, 13]

- **Antigénio Carcinoembrionário (CEA)**

Valor de Referência  $< 5$  ng/mL

O CEA é uma glicoproteína cuja função está relacionada com mecanismos de adesão celular e é produzida aquando o desenvolvimento fetal pelas células da mucosa intestinal, sendo que esta produção é interrompida após o nascimento. [25]

Podem verificar-se valores elevados de CEA em situações benignas como cirrose hepática, insuficiência renal, patologias pulmonares e digestivas, bem como quistos ováricos ou hipotireoidismo. No entanto, também se encontram elevados em tumores epiteliais entre os quais pulmão, mama, cabeça e pescoço. [13] Por este motivo, o CEA não é um marcador específico do cancro devendo ser complementado com a determinação de outros marcadores mais específicos e nunca como diagnóstico por si só. Os níveis de CEA estão também relacionados com o estágio do tumor em situações graves e pode ser utilizado na monitorização da doença durante o tratamento e possível presença de metástases. [25]

- **Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas (SCC)**

Valor de Referência  $\geq 2$  ng/mL

O SCC é uma glicoproteína pertencente à família dos inibidores das serino-proteases que podem estar presentes em tecidos escamosos da vulva, cérvix, pulmão, esófago e pele. Os seus níveis serológicos aumentam com a malignidade ou em lesões benignas de células escamosas e é o marcador tumoral primário do SCC do cérvix uterino. Podem ocorrer falsos positivos em casos de patologia renal crónica e doenças dermatológicas. [26,13]

É importante no acompanhamento e monitorização da doença durante e pós-terapêutica, uma vez que a sua quantificação está relacionada com o estágio do tumor e presença de metástases. [27]

- **Antigénio Hidrocarbonado 15.3 (CA 15.3)**

Valor de Referência  $< 30$  U/mL

Trata-se de uma glicoproteína mucínica de alto peso molecular que se encontra na superfície luminal e nas membranas apicais dos tecidos epiteliais secretores: mamário, pancreático, brônquico, prostático e uterino e que pode ser detetada através de dois anticorpos monoclonais Mab 11-5 D 8 e DF3 contra uma fração da membrana originária no carcinoma da mama e da membrana da globina da gordura do leite materno, respetivamente. [13, 28]

É o marcador mais utilizado na avaliação do cancro de mama não sendo, no entanto, específico uma vez que pode encontrar-se elevado em tumores ováricos, endometriais e no carcinoma do pulmão. [13] Por este motivo, o CA 15.3 não deve ser utilizado no diagnóstico por si só, mas é uma mais valia na deteção precoce de recidivas e no prognóstico da doença pois é um método bastante simples e sensível e correlaciona-se com a regressão e progressão da doença. [29]

- **Antigénio Hidrocarbonado 19.9 (CA 19.9)**

Valor de Referência  $< 37$  U/mL

A mucina CA 19.9 é detetada por um anticorpo monoclonal 1116-NS-19.9 no equipamento Cobas e601 Analyzer® que reconhece um determinante antigénico mucínico formado por um gangliosídeo que é um derivado siálico do antigénio do grupo sanguíneo Lewis

(uma percentagem de população são Lewis negativo e, portanto, não produzem CA 19.9) e encontra-se elevado em pacientes com tumores gastrointestinais de origem pancreática ou colorretal. No entanto, não deve ser utilizado no diagnóstico diferencial do cancro do pâncreas uma vez que se encontra elevado também em hepatopatias (icterícia) e em pancreatites, assim como em neoplasias ováricas e broncopulmonares. [13]

A principal utilidade do CA 19.9 prende-se com a avaliação do estágio do tumor, a sua localização e monitorização da doença durante a terapêutica. [30]

- **$\alpha$ -Fetoproteína (AFP)**

Valor de Referência < 5 UI/mL

A AFP é uma glicoproteína sintetizada maioritariamente no saco vitelínico e hepático durante o desenvolvimento fetal, diminuindo drasticamente a sua produção após o nascimento. A sua função fisiológica é semelhante à da albumina, o transporte de moléculas como ácidos gordos, hormonas e bilirrubina. [13, 31]

Encontra-se elevado em carcinomas hepatocelulares e em tumores testiculares, sendo particularmente importante no diagnóstico e monitorização do carcinoma hepatocelular, estando também associado a presença de metástases ou persistência da doença no caso de tumores testiculares. [31]

Os seus níveis podem estar elevados em vários tipos de hepatopatias infecciosas ou tóxicas dando origem a falsos positivos. [13]

- **Antigénio Específico da Próstata (PSA)**

Valor de Referência < 4 ng/mL

Trata-se de uma serino-protease expressa maioritariamente na glândula da próstata que é responsável pela proteólise de algumas proteínas existentes no sémen. Está presente no soro em diferentes formas enzimáticas, uma vez que é sintetizado como proPSA numa fase inicial sendo inativado posteriormente no líquido seminal formando o PSA livre.

Em condições normais, são detetados baixos níveis de PSA no soro. O seu aumento pode estar associado a infeções, trauma, hiperplasia prostática benigna (BPH) ou mesmo cancro da próstata. Devido a esta baixa especificidade, o PSA não deve ser utilizado no diagnóstico, mas sim como biomarcador de progressão/ regressão da doença ou mesmo como

indicador de recidivas após terapia. É bastante útil em pacientes já diagnosticados com cancro de próstata já que o aumento sérico é indicador do estágio da doença, assim como de anormalidades vasculares e anatómicas nesta glândula.

Com o objetivo de diminuir o número de falsos positivos, é habitual a determinação da relação fPSA (livre)/ PSA (total) quando a concentração do PSA total está compreendida entre 2,5 e 10 ng/mL. Quanto menor for a relação, maior o risco de cancro. Uma razão inferior a 0,15 (15%) é mais suspeita da presença de um cancro do que uma relação superior a 0,20 ou 0,25 (20% ou 25%) distinguindo, desta forma, as situações benignas como BPH de situações malignas [13, 32]

- **Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**

Valor de Referência < 5 UI/L

A hCG é uma hormona glicoproteica produzida em altas concentrações nos trofoblastos placentários e tem como função controlar a secreção de progesterona, assim como o corpo lúteo durante as primeiras semanas de gestação e a sua concentração sérica atinge o pico entre as 7 e as 10 semanas. Esta hormona é constituída por 2 subunidades, sendo a subunidade  $\beta$  mais específica devido à sua composição em aminoácidos o que permite doseá-la sem interferências de outras hormonas. [13, 33]

A hCG total pode estar aumentada em tumores trofoblásticos e neoplasias do testículo e ovário. É uma mais valia na avaliação pré-terapêutica de doentes que possam necessitar de tratamento mais agressivo, uma vez que a sua expressão está associada a um pior prognóstico. No estudo prévio dos tumores germinativos do testículo a hCG é doseada em conjunto com a AFP e a LDH, porque este tipo de carcinoma está intimamente associado à produção destes marcadores tumorais. Concentrações elevadas de hCG (>5000 UI) são normalmente indiciadoras de tumores não-seminomatosos do testículo, e correlacionam-se com um pior prognóstico. [33, 34]

Podem ser detetadas pequenas concentrações desta hormona em tecidos como a mama, glândula pituitária, próstata, testículo e músculo esquelético. [13]

- **$\beta$  -2- Microglobulina (BMG)**

Valor de Referência < 2,5 mg/L

A BMG é uma proteína que representa a cadeia leve do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC-I) localizado na superfície da maioria das células e que são libertados em concentrações elevadas por linfócitos e plasmócitos. [35] Desta forma, é considerado um marcador tumoral em doenças linfoproliferativas como o mieloma múltiplo e os linfomas estando a sua concentração sérica diretamente relacionada com a massa tumoral. [36]

Pode verificar-se um aumento da concentração da BMG em pacientes com insuficiência renal, uma vez que o catabolismo desta proteína é realizado nos rins, a idade também pode influenciar os seus valores séricos. A BMG é um bom indicador de prognóstico no mieloma múltiplo, ao correlacionar-se com o aumento da massa tumoral e ao refletir alterações na função renal destes doentes. [35, 36]

- **Antigénio Hidrocarbonado 72.4 (CA 72.4)**

Valor de Referência < 6,9 U/mL

Trata-se de um antigénio mucínico que pode ser detetado através dos anticorpos monoclonais CC49 e B72.3 e que está presente em diversas neoplasias epiteliais. Pode-se observar aumentos séricos deste antigénio em neoplasias gastrointestinais, tumores mamários, ováricos e pulmonares. [13]

É um marcador bastante específico, contudo com baixa sensibilidade de órgão e com poucos falsos positivos sendo indicativo do estágio da doença. Existem, no entanto, estudos recentes que relatam a existência de valores séricos de CA 72.4 falsamente elevados em doentes que efetuam tratamentos com omeprazol, corticóides ou anti-inflamatórios não esteróides (AINES). Este marcador é útil na monitorização terapêutica das neoplasias gastrointestinais. [37, 38]

- **Antigénio Hidrocarbonado 12.5 (CA 12.5)**

Valor de Referência < 35 U/mL

O CA 12.5 é um antigénio de elevado peso molecular constituído sobretudo por glicoproteínas e que está presente nas estruturas que derivam dos ductos de Müller e

mesotélio. É sintetizado na célula e secretado no lúmen, embora em circunstâncias normais não atinja a corrente sanguínea, o que acontece no caso de tumores benignos em que as concentrações séricas de CA 12.5 não se alteram. No entanto, no caso de tumores malignos, estes interferem na estrutura dos tecidos permitindo desta forma a libertação deste marcador tumoral para a corrente sanguínea elevando a sua concentração no soro. [39, 13]

O CA 12.5 encontra-se em elevadas concentrações nos carcinomas ováricos, nos adenocarcinomas do endométrio e do endocérvix, e menos frequentemente no cancro de mama, cancro pancreático, cancro do colón e no cancro do pulmão. Em situações benignas como lesões do endométrio, tumores benignos do ovário e quistos, invaginações e proliferações do epitélio também podem alterar os níveis séricos deste marcador tumoral. A principal causa de falsos positivos ocorre em casos de insuficiência renal e hepatopatias. [39, 13]

- **Proteína 4 do Epidídimo Humano (HE-4)**

Valor de Referência < 100-150pmol/L

O HE-4 é uma proteína precursora da proteína E4, pertencente à família de inibidores de proteases envolvida na maturação do esperma e que é codificada pelo gene WFDC2. Esta proteína é secretada no epitélio distal do epidídimo. [40, 13]

É determinada sobretudo em neoplasias ováricas, principalmente nos mucinosos e ainda noutras neoplasias ginecológicas e pulmonares, sendo normalmente determinado juntamente com o CA12.5, embora o HE-4 seja mais sensível comparado com o CA12.5 especialmente nos estádios iniciais da doença. Este marcador tumoral permite ainda o diagnóstico e controlo de recidivas particularmente no cancro dos ovários. [40, 13]

- **Peptídeo Libertador de Progastrina (ProGRP)**

Valor de Referência < 50 pg/mL

O GRP é um peptídeo associado à gastrina, tendo um papel importante na disseminação metastática por mecanismos autócrinos ou por interação célula-célula. Tem uma meia-vida de apenas 2 minutos sendo, por esta razão, instável no sangue e consequentemente difícil de determinar no soro. O seu precursor, o ProGRP, é desta forma, uma alternativa ao GRP uma vez que é mais estável. [13, 41]

Podem observar-se aumentos da concentração deste marcador nos carcinomas pulmonares, principalmente em SCLC e em tumores neuroendócrinos, contribuindo para a monitorização da doença. É frequentemente determinado juntamente com o NSE, embora tenha menos sensibilidade do que o ProGRP, sendo este último útil na distinção de doença pulmonar benigna, NSCLS e cancro de pulmão não metastizado, de SCLC. [13, 41]

- **Proteínas S100**

Valor de Referência < 0,10-0,20 µg/L

As proteínas S100 pertencem a uma família de proteínas acídicas fixadoras de cálcio de baixo peso molecular. As suas funções fisiológicas estão relacionadas com a divisão e diferenciação celular, assim como com a interação com o supressor tumoral p53. Estas proteínas possuem duas subunidades S100A1 e S100B, sendo que o heterodímero S100A1-B é expresso em células de melanoma. [42, 13]

A sua principal utilidade é no diagnóstico diferencial do melanoma e outras patologias cutâneas benignas, sendo a insuficiência renal a principal causa de falsos positivos. As suas concentrações séricas estão relacionadas com o estágio, prognóstico e monitorização da doença, embora não seja um bom marcador no rastreio e diagnóstico precoce do melanoma. [42, 13]

#### 4- Controlo de Qualidade

Diariamente durante a rotina são realizados dois níveis de diferentes controlos de qualidade interna multiparamétricos da firma Bio-Rad (*Immunoassay plus control, Tumor marker control, Speciality immunoassay control, etc*) com o intuito de avaliar todos os parâmetros estudados no Setor de Imunologia e Hormonologia. Os resultados obtidos são armazenados no software *Unity Real Time* da Bio-Rad e são avaliados diariamente com o intuito de estudar o grau de imprecisão da técnica utilizada e poder corrigir atempadamente os desvios observados.

O controlo externo, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e da *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)* é realizado periodicamente conforme o programa realizado.

Por fim, no caso das técnicas manuais, os seus controlos internos são realizados ao mesmo tempo que o procedimento. Se detetada alguma discrepância nos valores dos controlos o ensaio é repetido.

## BIOQUÍMICA CLÍNICA

O setor de Bioquímica Clínica é o mais automatizado do IPOCFG sendo a maioria das amostras de sangue (soro) e de urina de 24 horas. Aqui são determinados diferentes parâmetros, dos mais comuns como a glicose, colesterol total, LDL, HDL, as enzimas como a fosfatase alcalina e a creatinina cinase. Estas determinações são particularmente úteis no diagnóstico e monitorização da terapêutica assim como na avaliação dos efeitos da mesma na fisiologia do doente, uma vez que certos parâmetros estão associados à destruição celular.

Os equipamentos utilizados na Bioquímica Clínica utilizam diversas técnicas para realizar as determinações. Estas podem ser técnicas enzimáticas, química, espectrofotometria, turbidimétricas e por potenciometria direta e indireta.



## CONCLUSÃO

Este estágio representou o culminar destes 2 anos, nem sempre fáceis, do Mestrado em Análises Clínicas e que agora termina para dar início à próxima fase, a do mercado de trabalho.

Ter contacto com o mundo profissional foi importante para por à prova todos os conhecimentos reunidos ao longo deste mestrado e obter capacidades para resolver as adversidades que uma rotina laboratorial envolve. E estando o mundo a passar por uma realidade não antes vivida, senti também o peso da responsabilidade aquando o serviço, tanto na segurança dos doentes como na minha, assim como nas novas regras impostas para que tudo corresse o melhor possível.

O pessoal do IPOCFG demonstrou-se sempre disponível para ajudar a esclarecer as dúvidas existentes e na partilha de conhecimentos importantes para acompanhar e aproveitar esta experiência. Deram-me ainda a oportunidade de participar na manutenção dos equipamentos e na execução e interpretação do controlo dos mesmos.

Foram uns meses enriquecedores a nível pessoal na medida em que pude estar em contacto com a realidade da doença oncológica, assim como na aprendizagem de trabalho em equipa e no espírito crítico, importantes no mundo profissional.

*“A coisa mais indispensável a um Homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.” Platão*



## BIBLIOGRAFIA

- [1] MOYES, Rita B.; REYNOLDS, Jackie; BREAKWELL, Donald P. - **Differential Staining of Bacteria: Gram Stain**. Current Protocols in Microbiology. Vol. 15, nº1 (2009), A.3C.1-A.3C.8.
- [2] ZIMBRO Mary et. Al - **Manual of Microbiological Culture Media**. 2ª edição. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009. ISBN: 0-9727207-1-5.
- [3] LEVY, Carlos Emílio. - **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. In: Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª Ed, 2004.
- [4] FONSECA, Ana et Al. - **Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia**. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Portugal: Programa Nacional de Controlo de Infecção, 2004.
- [5] SAVINI, Vincenzo et. Al- **Streptococcus agalactiae vaginitis: nonhemolytic variant on the Liofilchem® Chromatic StreptoB**. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. Vol. 6, nº 8 (2013), 1693-1695.
- [6] HANSEN, Soren M. et. Al- **Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42, nº 1 (2004), 83-89.
- [7] TILLE Patricia - **Mycobacteria**. In: Tille Patricia. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017, ISBN: 978-0-323-35482-0. p. 524-554.
- [8] IBRAHIM A. Darwish- **Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances**. International Journal of Biomedical Science. Vol. 2, nº3 (2006), 217-235.
- [9] Karen L. Cox, Viswanath Devanarayan, Aidas Kriauciunas, et al.- **Immunoassay Methods**. In: Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2019. PMID: 22553884.

- [10] A.M. García- Campaña, W.R.G. Baeyens- **Principles and recent analytical applications of chemiluminescence.** ANALISIS. Vol. 28, n°8 (2000), 686-698.
- [11] BERECIARTUA, Edurne - **Trace Technology for Assays of Novel Biomarkers.** Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry. Vol.21, n°4 (2011), 118-121.
- [12] HAWKER, Charles D.- **Radioimmunoassay and Related Methods.** ANALYTICAL CHEMISTRY. Vol. 45, n°11 (1973), 878-888.
- [13] MOLINA, Rafael et. Al- **Utilidad clínica de los marcadores tumorales: Estado actual y perspectivas de futuro III.** Roche Diagnostic. S.L., 2011.
- [14] HENRY, N. Lynn, HAYES, Daniel F.- **Uses and Abuses of Tumor Markers in the Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Primary and Metastatic Breast Cancer.** The Oncologist. Vol.11, (2006), 541-552.
- [15] SHARMA, Shekhar- **Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines.** Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. Vol.30, n°1 (2009), 1-8.
- [16] BATES, Susan E.- **Clinical Applications of Serum Tumor Markers.** Annals of Internal Medicine. Vol. 115, n°8 (1991), 623-638.
- [17] COOPER, E.H.- **Neuron-specific enolase.** The International Journal of Biological Markers. Vol.9, n°4 (1994), 205-210.
- [18] ARIYOSHI, Yutaka et. Al- **Evaluation of Serum Neuron-specific Enolase as a Tumor Marker for Carcinoma of the Lung.** Gann. N°74 (1983), 219-225.
- [19] MURAKI, Masato et. Al- **Assessment of Serum CYFRA 21-1 in Lung Cancer.** American Cancer Society. N°77 (1996), 1274-1277.
- [20] WIESKOPF, Bram et. Al- **Cyfra 21-1 as a Biologic Marker of Non-small Cell Lung Cancer: Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Prognostic Role.** CHEST. Vol. 108, n°1 (1995), 163-169.
- [21] AUSTIN, Lynn A. et. Al- **Calcitonin: Physiology and Pathophysiology.** The New England Journal of Medicine. Vol. 304, n°5 (1981), 269-278.

- [22] GOLTZMAN, David et. Al- **Calcitonin as a Tumor Marker: Use of the Radioimmunoassay for Calcitonin in the Preoperative Evaluation of Patients with Medullary Thyroid Carcinoma.** The New England Journal of Medicine. Vol. 290, n° 19 (1974), 1035-1039.
- [23] SCHAADT, B. et. Al- **Assessment of the Influence of Thyroglobulin (Tg) Autoantibodies and Other Interfering Factors on the Use of Serum Tg as Tumor Marker in Differentiated Thyroid Carcinoma.** Thyroid. Vol. 5, n° 3 (1995), 165-170.
- [24] PINEDA, J. D. et. Al- **Iodine-131 Therapy for Thyroid Cancer Patients with Elevated Thyroglobulin and Negative Diagnostic Scan.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 80, n°5 (1995), 1488- 1492.
- [25] GOLDENBERG, D. M. et. Al- **CEA (Carcinoembryonic Antigen): Its Role as a Marker in the Management of Cancer.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. Vol. 101 (1981), 239-242.
- [26] TORRE, G. C.- **SCC Antigen in Malignant and Nonmalignant Squamous Lesions.** Tumor Biology. Vol. 19 (1998), 517-526.
- [27] TAKEDA, Mahito et. Al- **Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica. Vol. 81 (2002), 451-457.
- [28] RHODE, Peter S. et. Al- **CA 15.3 as a tumour marker in breast cancer.** The International Journal of Biological Markers. Vol. 2, n°3 (1987), 135-142.
- [29] KUMPULAINEN, Eero J.- **Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer.** Breast Cancer Research and Treatment. Vol. 76 (2002), 95-102.
- [30] MOLINA, Victor et. Al- **CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer.** Tumor Biology. Vol. 33 (2012), 799-807.
- [31] MURUGAVEL, Kailapuri G.- **Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepatocellular carcinoma: investigations in south Indian subjects with**

**hepatotropic virus and aflatoxin etiologies.** International Journal of Infectious Diseases. Vol. 12 (2008), e71-e76.

[32] PRENSNER, John R.- **Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers.** Science Translational Medicine. Vol. 4, n°127 (2012), 1-11.

[33] STENMAN, Ulf- Hakan et. Al- **Human chorionic gonadotropin in cancer.** Clinical Biochemistry. Vol. 37 (2004), 549-561.

[34] JAVADPOUR, Nasser- **The Role of Biologic Tumor Markers in Testicular Cancer.** Cancer. Vol. 45 (1980), 1755- 1761.

[35] BATAILLE, Régis et. Al- **Serum Beta-2-microglobulin in Multiple Myeloma: Relation to Presenting Features and Clinical Status.** Eur. Journal Cancer Clinical Oncology. Vol. 18, n°1 (1982), 59-66.

[36] ALEXANIAN, Raymond et. Al- **Beta 2 Microglobulin in Multiple Myeloma.** American Journal of Hematology. Vol. 20 (1985), 345- 351.

[37] CIDÓN, Esther U. et. Al- **Gastric Cancer: Tumor Markers as Predictive Factors for Preoperative Staging.** Journal Gastrointestinal Cancer. Vol. 42 (2011), 127-130.

[38] PIANTINO, P. et. Al- **Significance of CA 72.4 serum levels in gastrointestinal diseases.** The International Journal of Biological Markers. Vol. 5, n°2 (1990), 77-80.

[39] KENEMANS, P. et. Al- **CA 125 in gynecological pathology - a review.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. Vol. 49 (1993), 115-124.

[40] ANASTASI, Emanuela et. Al- **HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer.** Tumor Biology. Vol. 31 (2010), 113-119.

[41] MOLINA, Rafael et. Al- **ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer.** Clinical Biochemistry. Vol. 37 (2004), 505-511.

[42] HENZE, G. et. Al- Serum S100- **A Marker for Disease Monitoring in Metastatic Melanoma.** Dermatology. Vol. 194 (1997), 208-212.



