



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Anastasiya Pavlish

RELATÓRIO DE ESTÁGIO  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira e pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022





UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Anastasiya Pavlish

RELATÓRIO DE ESTÁGIO  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira e pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



## **Agradecimentos**

À coordenação do Mestrado em Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, à Professora Doutora Ana Miguel Matos e à Professora Doutora Bárbara Silva Rocha.

À Orientadora e Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira pelos seus conselhos e disponibilidade.

Ao Orientador e Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, Doutor Luís Espírito Santo Nina pela oportunidade de estágio.

A toda a equipa de Profissionais de Saúde e, nomeadamente, aos responsáveis de cada Setor pela prontidão em transmitir os seus conhecimentos e por toda a ajuda prestada.

A todos os Professores e colegas que estiveram presentes ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os meus amigos e familiares pelo seu apoio.

À minhas colegas de Residência Universitária, especialmente, à minha colega de quarto por me acompanhar e motivar ao longo deste Mestrado.



## Índice

Lista de Abreviaturas e Siglas .....	3
Índice de Figuras .....	7
Índice de Tabelas .....	8
Resumo e <i>Abstract</i> .....	9
Introdução .....	11
Caracterização do Laboratório de Estágio .....	12
Controlo de Qualidade Interno e Controlo de Qualidade Externo .....	13
<b>Setor de Hematologia</b> .....	<b>15</b>
<b>Setor de Química Clínica</b> .....	<b>16</b>
<b>Setor de Microbiologia</b> .....	<b>17</b>
Coloração de Gram .....	18
Coloração de Kinyoun .....	19
Meios de Cultura .....	19
Amostras Biológicas .....	25
Sangue .....	25
Amostras Respiratórias .....	27
Urina .....	30
Fezes .....	31
Exsudatos .....	32
Fâneros .....	33
Pontas de Cateter .....	33
Identificação e Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos .....	34
Pesquisa e Identificação de Enzimas Inativadoras de $\beta$ -lactâmicos .....	37
Controlo de Qualidade Interno e Externo .....	40
Equipamento .....	40
<b>Setor Virologia</b> .....	<b>41</b>
<b>Setor Imunologia e Hormonologia</b> .....	<b>42</b>
Imunoensaios Competitivos e Não Competitivos .....	43
Imunoensaios Enzimáticos – ELISA e FEIA .....	44
Imunoensaio de Fluorescência por Emissão de Criptato Amplificada Tempo-Resolvida .....	44
Imunoensaios Quimioluminescentes e Eletroquimioluminescentes (CLIA e ECLIA) .....	45
Imunonefelometria e Imunoturbidimetria .....	45

Radioimunoensaios e Ensaio Imunoradiométricos (RIA e IRMA) .....	45
Ensaio de Libertação de Interferão-Gama .....	46
Estudos de Autoimunidade .....	46
Quantificação de Iodo Urinário .....	46
Marcadores Tumorais .....	47
$\alpha$ -Fetoproteína (AFP) .....	48
Antigénio Carcinoembrionário (CEA) .....	48
Tiroglobulina .....	48
Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) .....	49
Calcitonina .....	49
$\beta$ -2 Microglobulina (B2M) .....	49
Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA) .....	50
HER-2/neu .....	50
Proteína 4 do Epidídimo Humano (HE4) .....	50
CYFRA 21-I .....	50
Cromogranina A II (CgA II) .....	51
Enolase Neuroespecífica (NSE) .....	51
Pró-Peptídeo Libertador de Gastrina (ProGRP) .....	51
SI00 .....	52
Antigénio Hidrocarbonado 72-4 (CA 72-4) .....	52
Antigénio Hidrocarbonado 15-3 (CA 15-3) .....	52
Antigénio Hidrocarbonado 125 (CA 125) .....	52
Antigénio Hidrocarbonado 19-9 (CA 19-9) .....	53
Antigénio Específico da Próstata (PSA) .....	53
Técnicas Eletroforéticas .....	54
Controlo de Qualidade Interno e Externo .....	54
Equipamento .....	55
<b>Caso Clínico 1</b> .....	<b>57</b>
<b>Caso Clínico 2</b> .....	<b>61</b>
Conclusão .....	65
Bibliografia .....	66



## Lista de Abreviaturas e Siglas

- °C – Graus Celsius
- µl – Microlitros
- Ac** – Anticorpo
- ACTH** – Hormona Adrenocorticotrófica
- AFP** – Alfa-Fetoproteína
- Ag** – Antígeno
- ALP** – Fosfatase Alcalina
- ALT** – Alanina Aminotransferase
- AST** – Aspartato Aminotransferase
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- B2M** – Beta-2 Microglobulina
- BAAR** – Bacilos Ácido-Álcool Resistentes
- BHI** – Caldo de Infusão Cérebro-Coração
- CA** – Antígeno Cancerígeno
- CAM** – Gelose Campyloset
- CC** – Caldo de Carne
- CDC** – Gelose para Anaeróbios + 5% de Sangue de Ovelha
- CEA** – Antígeno Carcinoembrionário
- CgA II** – Cromogranina A II
- CHGM** – Concentração Média de Hemoglobina Globular
- CHUC** – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
- CK-MB** – Creatina Cinase Isoenzima MB
- CLED** – Gelose Cistina-lactose Deficiente em Eletrólitos
- CLIA** – Imunoensaio de Quimioluminescência
- cm – Centímetros
- CNA** – Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro
- CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono
- COS** – Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro
- CYFRA** – Fragmento da Citoqueratina
- DHEA** – Desidroepiandrosterona
- DHEA-SO<sub>4</sub>** – Desidroepiandrosterona Sulfato
- ECLIA** – Imunoensaio de Eletroquimioluminescência
- EDTA** – Ácido Etileno Diamino Tetracético Tetrassódico

**ELISA** – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
**FEIA** – Imunoensaio Enzimático de Fluorescência  
**Fe<sub>2</sub>S** – Sulfureto de Ferro  
**FSH** – Hormona Folículo-Estimulante  
**FLC** – Cadeias Leves Livres  
**FISH** – Hibridação *in situ* com Fluorescência  
**G** – Força G ou Velocidade Relativa de Centrifugação (RCF)  
**GRP** – Peptídeo Libertador da Gastrina  
**HAE2** – Gelose *Haemophilus* Chocolate 2  
**hCG** – Gonadotrofina Coriônica Humana  
**HCl** – Ácido Clorídrico  
**HDL** – Lipoproteína de Alta Densidade  
**HE4** – Proteína 4 do Epidídimo Humano  
**HER-2/neu** – Recetor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano  
**hGH** – Hormona do Crescimento Humana  
**HGM** – Hemoglobina Globular Média  
**HEKT** – Gelose Hektoen  
**hsTPI** – Troponina I de Alta Sensibilidade  
**ID** – Identificação  
**Ig** – Imunoglobulina  
**IGF-I** – Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo I  
**IGRA** – Ensaio de Libertação de Interferão-Gama  
**INF-γ** – Interferão-Gamma  
**INR** – *International Normalized Ratio*  
**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge  
**IPOCFG** – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil  
**IRMA** – Ensaio Imunoradiométrico  
**KCS** – Caldo Schaedler + Vitamina K3  
**KV** – Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Ovelha Canamicina Vancomicina  
**LDH** – Lactato Desidrogenase  
**LDL** – Lipoproteína de Baixa Densidade  
**LH** – Hormona Luteinizante  
**LJ** – Löwenstein-Jensen  
**MCK** – Gelose MacConkey

**mg** – Miligrama

**MGIT** – Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias

**MHE** – Gelose Mueller-Hinton E

**MHF** – Gelose Mueller-Hinton + 5% de sangue de cavalo +  $\beta$ -NAD

**mm** – Milímetros

**NSE** – Enolase Neuroespecífica

**NT-proBNP** – N-terminal do Péptido Natriurético do tipo B

**PDW** – Distribuição do Tamanho das Plaquetas

**PP** – Polipeptídeo Pancreático

**PNAEQ** – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

**ProGRP** – Pró-Peptídeo Libertador de Gastrina

**PSA** – Antígeno Específico da Próstata

**PTH** – Hormona Paratiroideia

**PTHrP** – Proteína relacionada com a Hormona Paratiroideia

**PVX** – Gelose Chocolate PolyViteX™

**RDW** – Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos

**RIA** – Radioimunoensaio

**RIQAS** – *Randox International Quality Assessment Scheme*

**rpm** – Rotações por Minuto

**RT-qPCR** – Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real

**SARS-CoV-2** – Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

**SCCA** – Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas

**SCS** – Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Carneiro

**SGC2** – Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SPC** – Serviço de Patologia Clínica

**sTfR** – Recetor Solúvel de Transferrina

**T3** – Triiodotironina

**T4** – Tiroxina

**TASO** – Título de Anti-Estreptolisina O

**TP** – Tempo de Protrombina

**TPOA** – Anticorpos Anti-Peroxidase Tiroideia

**TRACE** – Imunoensaio de Fluorescência por Emissão de Criptato Amplificada Tempo-Resolvida

**TSA** – Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

**TSB** – Caldo de Tripticase de Soja

**TSH** – Hormona Tiroestimulante

**TTPa** – Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias

**v.g** - *verbi gratia*

**VGM** – Volume Globular Médio

**VMA** – Ácido Vanilmandélico

**VPM** – Volume Plaquetar Médio

**XLD** – Gelose Xilose Lisina Desoxicolato

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Imagens de microscopia ótica (objetiva x100) de esfregaços de amostras biológicas após coloração de Gram .....	<b>18</b>
<b>Figura 2</b> – Ilustração da técnica de sementeira por esgotamento do produto à superfície do meio sólido com uma ansa de 10 µl, usada na maior parte das amostras, exceto urina .....	<b>26</b>
<b>Figura 3</b> – Imagens de placas de cultura com diferentes bactérias isoladas de expetoração de um paciente com traqueostomia .....	<b>29</b>
<b>Figura 4</b> – Ilustração da técnica de sementeira quantitativa com uma ansa de 1 µl, usada em amostras de urina .....	<b>30</b>
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática das provas realizadas para escolher as cartas de ID e TSA apropriadas .....	<b>35</b>
<b>Figura 6</b> – Imagem de uma placa semeada pelo método de Kirby-Bauer com diferentes discos de antibiótico que revelam a presença de ESBL e ausência de <i>ampC</i> indutível e carbapenemases na estirpe estudada .....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b> – Imagem de uma placa semeada pelo método de Kirby-Bauer com um <i>E-test</i> IMI/IMD MBL negativo na estirpe estudada .....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b> – Esquema ilustrativo de um Imunoensaio Competitivo .....	<b>43</b>
<b>Figura 9</b> – Esquema ilustrativo de um Imunoensaio Não Competitivo .....	<b>43</b>
<b>Figura 10</b> – Esquema ilustrativo do TRACE™ .....	<b>44</b>
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática de um perfil eletroforético padrão e de uma Gamapatia Monoclonal que auxilia no diagnóstico de Mieloma Múltiplo .....	<b>54</b>
<b>Figura 12</b> – Imagens de microscopia ótica (objetiva x100) de <i>Fusobacterium nucleatum</i> (setas) obtidas a partir de esfregaços de sangue de hemocultura (A) e colónias de meio de cultura (B) após coloração de Gram .....	<b>63</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Lista dos responsáveis por cada Setor do SPC-IPOCFG .....	<b>12</b>
<b>Tabela 2</b> – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG .....	<b>15</b>
<b>Tabela 3</b> – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG .....	<b>16</b>
<b>Tabela 4</b> – Lista de ensaios de RT-qPCR realizados no GeneXpert® no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG .....	<b>26</b>
<b>Tabela 5</b> – Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expectoração .....	<b>28</b>
<b>Tabelas 6 e 7</b> – Cartas ID e TSA do equipamento VITEK® 2, com os respetivos grupos de microrganismos que identifica e testa a suscetibilidade a antimicrobianos .....	<b>34</b>
<b>Tabela 8</b> – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG .....	<b>40</b>
<b>Tabela 9</b> – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Virologia do SPC-IPOCFG	<b>41</b>
<b>Tabela 10</b> – Lista dos equipamentos no Setor de Imunologia e Hormonologia do SPC-IPOCFG, com o respetivo tipo de imunoensaio e parâmetros doseados .....	<b>43</b>
<b>Tabela 11</b> – Resultados do estudo hematológico da paciente do caso clínico I .....	<b>57</b>
<b>Tabela 12</b> – Resultados bioquímicos da paciente do caso clínico I .....	<b>58</b>
<b>Tabela 13</b> – Resultados microbiológicos da paciente do caso clínico I .....	<b>59</b>
<b>Tabela 14</b> – Resultados do estudo hematológico da paciente do caso clínico 2 .....	<b>61</b>
<b>Tabela 15</b> – Resultados bioquímicos da paciente do caso clínico 2 .....	<b>62</b>
<b>Tabela 16</b> – Resultados microbiológicos da paciente do caso clínico 2 .....	<b>63</b>

## **Resumo**

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o estágio curricular descrito neste relatório foi desenvolvido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil entre os dias 17 de janeiro e 17 de julho de 2022 nas áreas de Hematologia, Química Clínica, Microbiologia, Virologia, Imunologia e Hormonologia. Foram aprofundadas as valências de Microbiologia, Imunologia e Hormonologia, as áreas de estudo que mais me interessaram ao longo do meu percurso académico. Este relatório descreve a dinâmica de trabalho, o controlo de qualidade laboratorial, as metodologias utilizadas no processamento das amostras biológicas e os seus fundamentos. São também apresentados dois casos clínicos.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Microbiologia, Imunologia e Hormonologia

## **Abstract**

*Within the scope of the Masters in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, the curricular internship described in this report was carried out at the Clinical Pathology Service of the Portuguese Institute of Oncology of Coimbra Francisco Gentil between January 17th and July 17th 2022 in the areas of Hematology, Clinical Chemistry, Microbiology, Virology, Immunology and Hormonology. Microbiology, Immunology and Hormonology were developed more broadly as they were the most interesting to me throughout my academic path. This report describes the work dynamics, the laboratory quality control, the methodologies used in the processing of biological samples and their principles. Two clinical cases are also presented.*

*Keywords: Clinical Analysis, Microbiology, Immunology and Hormonology*





## Introdução

O cancro é uma doença que resulta do crescimento e proliferação descontrolada de células anormais. A carcinogénese é influenciada pela predisposição genética de um indivíduo e por fatores ambientais como o envelhecimento, a exposição solar, hábitos tabágicos, entre outros. Apesar da mortalidade do cancro estar a diminuir nas últimas décadas graças às novas metodologias terapêuticas desenvolvidas, a sua incidência tem vindo a aumentar pelo que é importante realizar o diagnóstico numa fase inicial para potenciar o sucesso do tratamento e minimizar o impacto na vida do doente (1).

As Análises Clínicas abrangem um conjunto de exames que caracterizam o estado de saúde de um indivíduo, desempenhando um papel fulcral na tomada de decisões médicas. Para além de auxiliarem no diagnóstico e monitorização de patologias, também contribuem para a sua prevenção e deteção precoce, bem como um tratamento eficaz.

Este relatório é realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e reflete o estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG). É descrito, sucintamente, o trabalho desenvolvido nos Setores de Hematologia, Química Clínica e Virologia, focando-se sobretudo nos Setores de Microbiologia e Imunologia e Hormonologia em virtude da sua maior duração. Globalmente, o estágio permitiu que participasse na rotina do serviço, tendo sido dada a oportunidade de serem relembrados e interiorizados conhecimentos teóricos, assim como a execução de diversas técnicas laboratoriais.

## Caracterização do Laboratório de Estágio

O IPOCFG é uma unidade hospitalar que integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde e recebe pacientes de toda a Região Centro de Portugal. Iniciou a sua atividade em 1962 e desde então procura atender às necessidades de saúde da comunidade, conceber projetos de investigação, formação, ensino e rastreio oncológicos, organizar e publicar o registo oncológico regional e contribuir para a definição e acompanhamento da execução da política oncológica nacional (2).

O SPC encontra-se no piso 0 do edifício da Oncologia Médica e Laboratórios. É composto pela área de receção dos pacientes, área administrativa, sala de colheitas, área de triagem das amostras, laboratórios de Hematologia, Química Clínica, Microbiologia, Virologia e Imunologia e Hormonologia, vestiários, sala de refeições e reuniões, sala de arrumos e tratamento de materiais e alguns gabinetes. O Diretor do SPC é o Doutor Luís Espírito Santo Nina, Assistente Graduado Hospitalar, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos. A equipa de trabalho inclui Médicos Especialistas em Patologia Clínica, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Análises Clínicas, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Técnicos e Assistentes Operacionais.

O sistema informático utilizado é o *Modulab*. Este integra vários processos do fluxo de trabalho como a criação e gestão dos dados dos utentes, os pedidos dos médicos, a receção de amostras, a comunicação dos resultados laboratoriais, a validação e elaboração de relatórios, entre outras funcionalidades. Cada paciente tem um número de processo e para cada amostra é gerado um número de identificação. As amostras de sangue venoso são colhidas por Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica de acordo com os requisitos estabelecidos para o seu processamento laboratorial. O SPC também processa amostras provenientes do Serviço de Sangue do IPOCFG. Na Tabela I pode ser consultada a identificação dos profissionais responsáveis por cada Setor do SPC-IPOCFG.

**Tabela I** – Lista dos responsáveis por cada Setor do SPC-IPOCFG.

Setor	Responsável
Hematologia	Dra. Isabel Joana Diamantino, Médica Assistente Graduada e Especialista em Patologia Clínica
Química Clínica	Dra. Ana Raquel Paiva, Médica Assistente e Especialista em Patologia Clínica
Microbiologia	Dra. Maria Alexandre Vaz Mendes, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos e Assistente da Carreira Farmacêutica
Imunologia e Hormonologia	Dr. Nuno Alexandre Costa Ferreira da Cunha, Técnico Superior de Saúde Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Biólogos e Especialista Europeu em Laboratório Médico
Virologia	Dr. Rui Manuel Costa Soares, Assistente Hospitalar, Especialista em Patologia Clínica pela Ordem dos Médicos

O controlo da qualidade laboratorial é fundamental para a melhoria contínua dos resultados analíticos fornecidos por um laboratório de Análises Clínicas. É um sistema documentado de gestão do desempenho dos instrumentos, técnicas e materiais usados. De modo geral, consiste na compreensão das não conformidades e no estabelecimento e cumprimento de um conjunto de algoritmos que especificam ações a tomar com base nos resultados dos testes de controlo (3).

### **Controlo de Qualidade Interno (CQI)**

O objetivo do CQI é prevenir, identificar e corrigir possíveis erros e assim garantir a precisão e fiabilidade dos resultados laboratoriais. É realizado diariamente antes do processamento das amostras dos pacientes, e sempre que necessário ao longo do dia, como por exemplo, no caso da mudança de lote de um reagente. Nos Setores de Hematologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia são realizados diariamente usando amostras comerciais. Para assegurar que os parâmetros analíticos se encontram dentro dos valores de referência definidos recorre-se às cartas de controlo de Levey-Jennings, analisadas com base nas regras de Westgard. Para os valores obtidos serem aceites tem de se observar uma distribuição dentro dos limites de confiança ( $\pm$  dois desvios padrão), preferencialmente o mais próximo da linha média central.

### **Controlo de Qualidade Externo (CQE)**

O CQE é um controlo interlaboratorial periódico organizado por entidades externas que enviam amostras para serem analisadas pelo laboratório da mesma forma que as amostras dos pacientes. Quando estes organizadores recebem o relatório, comparam os resultados com a média de consenso obtida a partir dos resultados dos laboratórios participantes que utilizam a mesma metodologia. Desta forma, é determinada a exatidão resultados analíticos, contribuindo para a credibilização do laboratório. Nos Setores do SPC-IPOCFG, estas entidades externas são o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) a nível nacional e o *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) a nível internacional.



## **Setor de Hematologia**

No Setor de Hematologia são estudados os vários componentes sanguíneos através da análise de amostras de sangue periférico e aspirados de medula óssea. É usado sangue total com Ácido Etileno Diamino Tetracético Tetrassódico (EDTA) para a realização de hemograma, avaliação da velocidade de sedimentação, estudos genéticos (RT-qPCR e FISH), imunofenotipagem por citometria de fluxo e observação de esfregaços sanguíneos e de medula óssea ao microscópio ótico. Os tubos de sangue permanecem em agitação até serem processados. Para o estudo da coagulação, o sangue total com citrato de sódio é centrifugado (3000 rpm durante 10 minutos) de forma a obter plasma. Ambos os anticoagulantes quelam o cálcio necessário para a conversão de protrombina em trombina, mas o EDTA é o de eleição para hemogramas porque preserva melhor a morfologia das células. Mais raramente, são analisados outros fluidos biológicos como o líquido cefalorraquidiano e aspirados de punção ganglionar. Para realização das análises no Setor de Hematologia são necessários diversos equipamentos consoante o objetivo pretendido (Tabela 2).

**Tabela 2** – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Hematologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b> (Fornecedor)	<b>Função</b>
<i>Aerospray® Hematology Pro Slidestainer</i> (ELITech Group)	Coloração de Wright-Giemsa automatizada de esfregaços sanguíneos
<i>GeneXpert® System</i> (Cepheid)	Quantificação do transcrito do gene de fusão BCR-ABL por RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcrição Reversa) em amostras de sangue periférico de pacientes com Leucemia Mieloide Crónica t(9;22) positivos
<i>DxH 900 Hematology Analyzer</i> (Beckman Coulter)	Contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, eritrócitos, plaquetas e reticulócitos, avaliação do hematócrito e plaquetócrito, volume globular médio dos eritrócitos e das plaquetas, hemoglobina globular média, concentração média de hemoglobina globular, distribuição do tamanho dos eritrócitos e plaquetas
<i>Test I BCL Analyzer</i> (ALI FAX)	Avaliação da velocidade de sedimentação das hemácias
<i>ACL TOP 350 CTS</i> (Instrumentation Laboratory)	Avaliação do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e INR ( <i>International Normalized Ratio</i> )
<i>Cytomics™ FC 500 Flow Cytometer</i> (Beckman Coulter)	Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Para além do TP, TTPa e INR, no estudo da hemostase também é quantificado o fibrinogénio, os D-dímeros e o anticoagulante lúpico.

## Setor de Química Clínica

Para a maioria dos parâmetros determinados no Setor de Química Clínica são usadas amostras de soro obtidas por centrifugação (3000 rpm durante 10 minutos) de sangue total com esferas de sílica que ativam a cascata de coagulação. Após repouso e antes de inserir os tubos nos autoanalisadores, é removida a fibrina para não interferir com a aspiração da amostra. Deve-se ter atenção amostras hemolisadas já que a hemólise altera os valores de potássio, da lactato desidrogenase (LDH) e outros analitos. Por outro lado, amostras ictericas e lipêmicas podem levar a discrepâncias na leitura da absorvância. Hemoglobina glicada é doseada em sangue total com EDTA, o cálcio ionizado em sangue com heparina de lítio compensada e as gasometrias em sangue arterial em seringa (colheita médica). São também recebidas amostras de urina pontual ou das 24h e líquido cefalorraquidiano.

Apesar deste Setor ser o mais automatizado (Tabela 3), são realizadas técnicas manuais de aglutinação para o rastreio de sífilis (teste da Reagina Plasmática Rápida), fator reumatoide (teste de Waaler-Rose), Lúpus Eritematoso Sistêmico (Avitex SLE), *Salmonella* spp. (teste de Widal), *Brucella* spp. (teste de Wright) e mononucleose infecciosa. Além disso, é feita a colheita, pré-processamento e envio de amostras para ensaios clínicos que testam novos tratamentos ou fármacos.

**Tabela 3** – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Química Clínica do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b> (Fornecedor)	<b>Função</b>
Atellica™ CH 930 Analyzer (Siemens Healthineers)	Quantificação da ureia, creatinina, glicose, sódio, potássio, cloro, magnésio, fósforo, amônia, proteínas totais, albumina, pré-albumina, microalbumina, amilase, lipase, aldolase, colesterol total, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), triglicerídeos, ácido úrico, azoto ureico, bilirrubina total e direta, ferro, capacidade total de fixação de ferro, saturação da transferrina, LDH, enzima conversora da angiotensina sérica, fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamiltransferase através de espectrofotometria e potenciometria indireta (ionograma)
ABL800 FLEX (Radiometer)	Quantificação da saturação do oxigênio, sódio, potássio, cálcio, cloro, pH, glicose, lactato, hemoglobina e as suas diferentes frações através de potenciometria e amperometria
Reflotron® (Roche Diagnostics)	Confirmação dos resultados de alguns parâmetros obtidos com o Atellica™ através de refratometria
RAPIDChem® 744 (Siemens)	Confirmação do ionograma obtido com o Atellica™ através de potenciometria direta

## **Setor de Microbiologia**

O ser humano não existe num ambiente estéril. A colonização por microrganismos começa à nascença, uma simbiose que tanto depende da microbiota como do hospedeiro. Hospedeiros com um sistema imunitário debilitado como os doentes oncológicos, seja devido à neoplasia, seja devido à terapia administrada, encontram-se mais suscetíveis a patógenos oportunistas (4). Neste contexto, o papel do Setor de Microbiologia no SPC do IPOCFG, é especialmente importante. Nele, são seguidas regras de biossegurança que têm como objetivo proteger o operador e a sua equipa de trabalho, o ambiente e a própria amostra de forma a assegurar resultados fidedignos. Para tal, é utilizado equipamento de proteção pessoal (v.g.: bata e luvas), a manipulação das amostras é realizada em câmara de fluxo laminar e os resíduos biológicos ou químicos são rejeitados em contentores específicos, para posterior descontaminação e/ou tratamento.

Consoante o tipo de amostra e os exames pedidos, o processamento laboratorial de material biológico pode englobar um exame macroscópico, microscópico e cultural, o isolamento do microrganismo, a sua identificação (ID) e a testagem da sua suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) e, ainda, testes complementares como os testes da oxidase e catalase.

São pesquisadas bactérias, fungos e parasitas em amostras biológicas como o sangue, produtos respiratórios, urina, fezes, exsudados purulentos, fâneros, pontas de cateter, líquido cefalorraquidiano, entre outras. Para facilitar a interpretação e valorização clínica dos resultados, a colheita de qualquer tipo de amostra deve ser realizada, idealmente, antes da administração de terapia antimicrobiana, e a amostra processada no dia em que é recebida. Entre os agentes infecciosos mais comuns, pode-se destacar: *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.*

Para a receção dos produtos biológicos no laboratório, estes devem estar devidamente identificados e acompanhados da requisição médica com a informação sobre o clínico, o utente e os exames solicitados. Para a amostra ser aceite, deve também estar discriminada a zona anatómica de colheita. Deve também estar devidamente acondicionada, em recipiente e meio adequado e em volume suficiente. É realizado o seu registo no sistema informático que gera etiquetas para os meios de cultura pré-estabelecidos para o tipo de amostra recebido, com um número único para cada tipo de exame (bacteriológico, micológico ou micobacteriológico) e uma folha de trabalho para documentar o processamento da amostra.

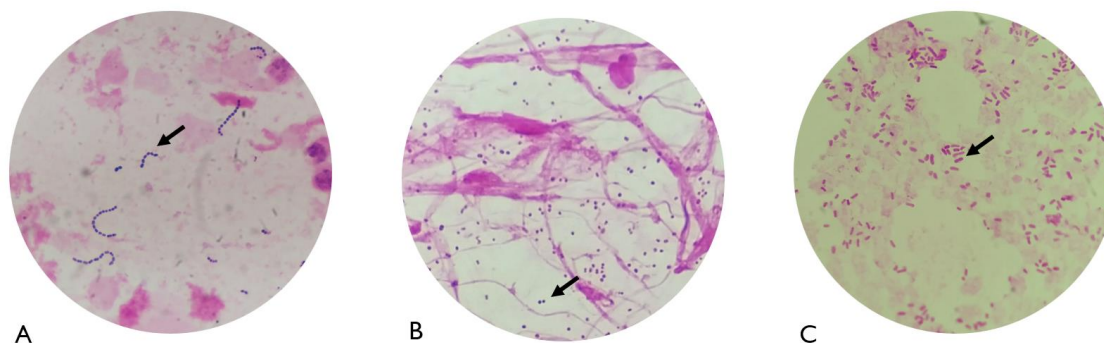
Geralmente, o primeiro exame realizado é o direto, em que as amostras biológicas são observadas ao microscópio ótico através de preparação a fresco (v.g.: urina), após tratamento ou coloração de Gram ou Kinyoun de esfregaços. Os esfregaços são feitos, preventivamente, em duplicado, caso seja necessário corar outra lâmina.

### Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma valiosa ferramenta que permite rapidamente direcionar o exame cultural e aplicar uma antibioterapia de largo espectro, em caso de urgência. No Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG, é automatizada e realizada após a fixação pelo calor do esfregaço de um produto biológico para posterior observação microscópica com as objetivas x50 e x100, usando óleo de imersão. É registrada a cor, morfologia e o agrupamento das bactérias, bem como outros componentes relevantes visualizados.

Tem como objetivo diferenciar dois grupos de bactérias de acordo com a estrutura e composição bioquímica da sua parede celular: enquanto as bactérias Gram positivo possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa e complexada com ácido teicóicos, as bactérias Gram negativo possuem uma camada de peptidoglicano mais fina, revestida por uma membrana celular externa com lipopolissacarídeos (5).

Consiste na coloração por violeta de Genciana estabilizada com mordente (soluto de Lugol), descoloração com álcool-acetona, lavagem com água corrente, coloração com Fucsina diluída (corante de contraste) e nova lavagem. Resulta em bactérias Gram positivo que se mantêm violeta e bactérias Gram negativo que se tornam cor-de-rosa devido à sua incapacidade de reter o corante primário, possivelmente porque o descorante dissolve parte da membrana externa e atravessa a fina camada de peptidoglicano. Adicionalmente, também permite visualizar leveduras coradas de violeta. Na Figura I encontram-se exemplificadas diferentes cores, morfologias e agrupamentos bacterianos.



**Figura I** – Imagens de microscopia ótica (objetiva x100) de esfregaços de amostras biológicas após coloração de Gram. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

A - Cocos Gram positivo em cadeia; B - Diplococos Gram negativo; C - Bacilos Gram negativo



## Coloração de Kinyoun

É realizada principalmente em produtos respiratórios (expetoração, lavado e aspirado broncoalveolar) na suspeita de uma infecção por bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR), como os do género *Mycobacterium*. Também se denominam micobactérias porque para além de possuírem caracteristicamente arabinoglicano, têm um elevado teor de ácidos micólicos na composição da sua parede celular, que lhes confere um carácter hidrofóbico e impede a ação descolorante do álcool-acetona usado na coloração de Gram.

Para contornar isto, na coloração de Kinyoun, também automatizada (Tabela 8), são usadas maiores quantidades de corante primário, a Carbofucsina, o que aumenta a permeabilidade dos BAAR graças aos seus grupos fenol, substituindo a necessidade de aquecimento usado na coloração de Ziehl-Neelsen. Após a descoloração com álcool-ácido e a adição de Verde Brillhante, o corante de contraste, é possível observar bactérias avermelhadas num fundo azulado (5). O exame microscópico é considerado positivo a partir de 1-2 BAAR/300 campos (objetiva x100) devido à sua virulência e ao elevado risco de transmissão.

## Meios de Cultura

Para a cultura e isolamento de microrganismos *in vitro* é necessário proporcionar um ambiente adequado às suas exigências metabólicas. A seleção de um meio cultural e das condições de incubação pode ser feita consoante o tipo de amostra biológica, a morfologia e as características tintoriais observadas ao exame microscópico. Os meios de cultura podem ser sólidos, permitindo isolar colónias individuais, semisólidos, ou líquidos, nos quais a avaliação do crescimento é feita através da turvação (6). Os meios de cultura ainda podem ser classificados em:

- Seletivos: a presença de substâncias inibidoras (v.g.: corantes, sais ou antibióticos) na sua composição favorece o crescimento de um dado grupo de microrganismos em detrimento de outro.
- Diferenciais: combinam substâncias que conferem características visuais que permitem distinguir diferentes grupos de microrganismos (v.g.: substratos de fermentação combinados com indicadores de pH).
- Enriquecidos: geralmente implicam repicagem para outros meios (6).

➤ **Meio para hemoculturas BD BACTEC™**

Meio líquido com nutrientes, anticoagulante e esferas de resina que neutralizam os antibióticos nas amostras, recuperando inclusive bactérias fastidiosas, anaeróbias, fungos e micobactérias. Encontra-se dentro de garrafas e o sistema associado deteta aumentos de fluorescência proporcionais às elevações na concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que resultam da respiração celular que aumenta com o crescimento bacteriano. Volumes de sangue maiores ao recomendado podem originar falsos positivos devido ao CO<sub>2</sub> produzido pelas células sanguíneas.

➤ **COS** (Gelose Columbia + 5% de Sangue de Carneiro)

Meio sólido não seletivo e diferencial: nutritivamente adaptado, o que permite isolar a maior parte das bactérias, inclusive fastidiosas. Também permite observar e diferenciar a hemólise, um critério orientador para a identificação bacteriana. Assim, após incubação, é possível observar uma coloração esverdeada à volta da colónia que corresponde a hemólise parcial ( $\alpha$  hemólise), uma zona clara à volta da colónia ou por baixo da colónia que evidencia uma hemólise total ( $\beta$  hemólise) ou uma ausência de hemólise ( $\gamma$  hemólise).

➤ **CLED** (Gelose Cistina-lactose Deficiente em Eletrólitos)

Meio sólido não seletivo e diferencial: permite o isolamento de microrganismos responsáveis por infeções urinárias e a partir do qual é feita a contagem das Unidades Formadoras de Colónicas (UFC), tendo a vantagem de minimizar o *swarming* de *Proteus* spp. graças à ausência de eletrólitos na sua composição, sendo visualizadas colónias individuais (Figura 3A). Permite a diferenciação entre bactérias fermentadoras de lactose (acidificam o meio e formam colónias amareladas) e não fermentadoras de lactose (colónias azuladas/incolores).

➤ **MCK** (Gelose MacConkey)

Meio sólido seletivo e diferencial: permite o isolamento de enterobactérias inibindo o crescimento de bactérias Gram positivo através da presença dos sais biliares e do Cristal violeta. As bactérias fermentadoras da lactose são evidenciadas pela coloração cor-de-rosa das colónias, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. As bactérias que não fermentam a lactose originam colónias incolores.

➤ **CNA** (Gelose Columbia ANC + 5% de Sangue de Carneiro)

Meio sólido seletivo e diferencial: permite o isolamento de bactérias Gram positivo, inclusive fastidiosas, inibindo o crescimento de bactérias Gram negativo através da presença dos antibióticos Ácido Nalidíxico e a Colistina. Também permite avaliar a presença e tipo de hemólise.

➤ **PVX** (Gelose Chocolate PolyViteX™)

Meio sólido não seletivo: permite o isolamento de bactérias fastidiosas especialmente pertencentes aos géneros *Neisseria* e *Haemophilus* por ser enriquecido com os fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela hemoglobina de sangue hemolisado e pelo PolyViteX™.

➤ **HAE2** (Gelose *Haemophilus* Chocolate 2)

Meio sólido seletivo: permite o isolamento de principalmente *Haemophilus* por ser altamente nutritivo como o PVX e conter antibióticos que inibem o crescimento de outras bactérias e fungos. Pela sua especificidade, é usado maioritariamente em produtos biológicos com uma grande diversidade microbiana como a expetoração.

➤ **SCS** (Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Carneiro)

Meio sólido não seletivo: permite o isolamento de bactérias anaeróbias estritas e facultativas e identificar o tipo de hemólise presente.

➤ **KV** (Gelose Schaedler + 5% de Sangue de Ovelha Canamicina Vancomicina)

Meio sólido seletivo: permite o isolamento de bactérias anaeróbias Gram negativo através da presença dos antibióticos Canamicina e Vancomicina como agentes seletivos. Evidencia hemólise através do sangue adicionado.

➤ **CDC** (Gelose para Anaeróbios + 5% de Sangue de Ovelha)

Meio sólido não seletivo: favorece o crescimento de bactérias anaeróbias e permite a observação de hemólise.

➤ **CC** (Caldo de Carne)

Meio líquido não seletivo enriquecido: permite o crescimento de bactérias anaeróbias por ser um caldo com pedaços de carne cozinhada, o que o torna altamente nutritivo.

➤ **KCS** (Caldo Schaedler + Vitamina K3)

Meio líquido não seletivo: favorece o crescimento de bactérias aeróbias facultativas.

➤ **BHI** (Caldo de Infusão Cérebro-Coração)

Meio líquido enriquecido: permite o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias fastidiosas. É utilizado para produtos biológicos que necessitem de enriquecimento como, por exemplo, provenientes de cateteres e zaragatoas.

➤ **Caldo Selenito**

Meio líquido enriquecido seletivo: favorece o crescimento de *Salmonella* e *Shigella* provenientes de amostras fecais. Implica a realização de subculturas depois de 8-12h de incubação. O selenito de sódio na sua composição inibe várias espécies de bactérias da microbiota intestinal.

➤ **Caldo GN** (Caldo Gram Negativo)

Meio líquido de enriquecimento seletivo: favorece o crescimento de bactérias entéricas Gram-negativo, sendo usado especialmente em amostras de fezes para a pesquisa de *Salmonella* e *Shigella*. Na sua composição tem compostos nitrogenados, manitol e dextrose para promover o crescimento bacteriano. A concentração do manitol é superior à da dextrose porque *Salmonella* e *Shigella* fermentam o manitol em detrimento da dextrose, enquanto a dextrose é preferencialmente utilizada por *Proteus* e outras enterobactérias, limitando, assim, o crescimento destas últimas. O citrato de sódio e desoxicolato de sódio inibem bactérias Gram negativo e algumas Gram positivo.

➤ **XLD** (Gelose Xilose Lisina Desoxicolato)

Meio sólido seletivo e diferencial: permite o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes através da inibição de microrganismos de Gram positivo e outras Enterobacteriaceae pelo desoxicolato de sódio e sais biliares. As bactérias que fermentam um dos três açúcares contidos no meio formam colónias amareladas e as bactérias que não fermentam, como a *Salmonella* e *Shigella*, formam colónias cor-de-rosa. Outro fator diferenciador é a presença de tiosulfato redutase, enzima detetada pela formação de sulfureto de ferro ( $Fe_2S$ ), permitindo observar um centro negro nas colónias devido à precipitação do  $Fe_2S$ , formado por reação entre tiosulfato de sódio e citrato amoniacal presentes no meio.

➤ **HEKT** (Gelose Hektoen)

Meio sólido seletivo e diferencial: permite o isolamento *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes através da inibição dos outros microrganismos e da diferenciação das bactérias fermentadoras (colónias alaranjadas) das não fermentadoras (colónias verdes/azuladas). As bactérias produtoras de ácido sulfídrico formam colónias com um centro preto devido à precipitação do  $Fe_2S$ .

➤ **CAM** (Gelose Campyloesel)

Meio sólido seletivo: permite o isolamento *Campylobacter* spp. em amostras de fezes graças ao valor nutritivo do sangue de carneiro e do efeito inibitório dos antibióticos e antifúngicos noutros microrganismos. Implica incubação numa atmosfera microaerofílica.

➤ **LJ** (Löwenstein-Jensen)

Meio sólido não seletivo em tubo de vidro: destinado à cultura de micobactérias. É altamente nutritivo e inibe bactérias contaminantes. Deve ser incubado a 37°C em posição inclinada, até evaporação do líquido antes de enroscar os tubos. O crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* caracteriza-se por colónias de cor bege com aspeto “em couve-flor”.

➤ **MGIT** (Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias)

Meio líquido não seletivo: constitui uma modificação do meio de Middlebrook 7H9. Na base do tubo encontra-se silicone com um composto fluorescente sensível à presença de oxigénio no caldo. Inicialmente, a grande quantidade de oxigénio suprime a fluorescência, sendo esta proporcionalmente emitida quando este é consumido por microrganismos. A leitura da fluorescência é realizada através de um equipamento portátil específico.

➤ **SGC2** (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2)

Meio sólido seletivo: permite o isolamento de leveduras e bolores inibindo o crescimento da maioria das bactérias Gram negativo e Gram positivo graças à presença dos antibióticos Gentamicina e Cloranfenicol.

➤ **Mycoline:** é composto por um tubo fechado que contém uma lâmina gelosada para transporte e cultura seletiva de fungos. Cada lado é coberto por 1 meio de cultura:

- Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol (coloração amarela-pálida): nutritivamente possui peptonas e glicose, e os antibióticos inibem a maior parte das bactérias.

- Gelose Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (coloração alaranjada): o crescimento de dermatófitos leva à viragem de cor para vermelho por alcalinização do meio na presença de Vermelho de fenol. A Actidiona inibe os fungos não dermatófitos.

Os meios de cultura para fungos são incubados a 25°C para a pesquisa de dermatófitos, e a 30, 37 e 42°C para leveduras e fungos filamentosos, consoante a amostra, a suspeita do clínico e o histórico microbiológico do paciente. Em produtos biológicos respiratórios, a placa é selada com Parafilme® para impedir contaminações, a saída de esporos e para manter a humidade, uma vez que é incubada durante um mês para pesquisa de fungos filamentosos.

➤ **MHE** (Gelose Mueller-Hinton E)

Meio sólido usado para o TSA de bactérias não fastidiosas pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. A sua concentração em íões divalentes otimiza a determinação da sensibilidade dos antibióticos cuja atividade é catião dependente.

➤ **MHF** (Gelose Mueller-Hinton + 5% de sangue de cavalo +  $\beta$ -NAD)

Meio sólido usado para o estudo da suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias fastidiosas pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. A sua composição permite o crescimento de pneumococos e outros estreptococos, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium* e de anaeróbios em atmosfera adequada.

➤ **Gelose CT** (Count-Tact®)

Meio sólido usado para o controlo microbiológico das superfícies e do ar nas indústrias, hospitais e outros serviços públicos. Tem um fundo quadriculado, um menor diâmetro que as placas referidas anteriormente e apresenta um menisco que permite a sua aplicação direta em superfícies. Na sua composição possui neutralizadores que inativam desinfetantes residuais.

➤ **Portagerm Anaeróbios e Portagerm Pylori**

Meios sólidos em frasco: para o transporte de amostras para pesquisa de anaeróbios e o transporte de biópsias gástricas para pesquisa de *Helicobacter pylori*, respetivamente.

## Amostras Biológicas

### Sangue

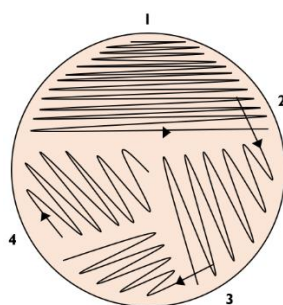
A septicemia, termo que designa coletivamente a bacteriemia ou fungemia e as alterações orgânicas associadas, representa uma situação clínica muito crítica, e, por isso, requer um diagnóstico célere e correto para a implementação de um tratamento, especialmente em indivíduos imunodeprimidos (7) já que taxa de mortalidade de doentes oncológicos com sépsis é de 65-85% comparativamente à de 30-70% em pacientes sem cancro (4).

Para evitar contaminações pela microbiota cutânea e facilitar a interpretação dos resultados, é essencial uma assepsia apropriada da pele e a colheita de duas amostras de sangue distintas num volume adequado (8-10 ml). Para otimizar a recuperação do agente etiológico, cada amostra é inoculada num meio aeróbio e num meio anaeróbio (7).

No Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG, é usado o sistema BD BACTEC™ 9020 para hemoculturas, tendo ao seu dispor garrafas para microrganismos aeróbios e fungos, para microrganismos anaeróbios e para micobactérias (Tabela 8). As garrafas para microrganismos anaeróbios possuem, adicionalmente, azoto e agentes hemolisantes, permitindo o crescimento de microrganismos fastidiosos e intracelulares. As garrafas para micobactérias são raramente usadas, mas o seu meio é constituído por caldo de Middlebrook 7H9 suplementado, BHI e hemolisante, requerendo 1-5 ml de sangue.

Este equipamento automatizado incuba e agita as garrafas a 35°C por um mínimo de sete dias para bactérias, 14 dias para fungos e 42 dias para micobactérias. A fluorescência é monitorizada a cada 10 minutos e quando ultrapassa um determinado limite, sendo considerada uma hemocultura positiva, são emitidos alarmes visuais e sonoros (8).

Hemoculturas positivas implicam um exame direto, a partir do qual se obtém informação crítica que é transmitida imediatamente ao clínico para que seja aplicada uma intervenção terapêutica oportuna. É também realizada uma repicagem do sangue usando uma seringa e uma sementeira pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido com uma ansa estéril como se encontra ilustrado na Figura 2.



**Figura 2** – Ilustração da técnica de sementeira por esgotamento do produto à superfície do meio sólido com uma ansa de 10 µl, usada na maior parte das amostras, exceto urina.

Para a cultura de microrganismos aeróbios é usado o COS, e para microrganismos anaeróbios o SCS, KV e CDC. Os meios de cultura para bactérias anaeróbias exigem uma incubação a 37°C durante pelo menos 48h num GENbag, um envelope hermético com geradores de atmosfera que criam condições de anaerobiose. Quando as condições de anaerobiose são perturbadas, a cor do gerador passa de branca a azul.

Posteriormente, é realizada a ID e o TSA usando VITEK® 2. Na suspeita de *Staphylococcus aureus* pela observação microscópica de cocos Gram positivo em cacho, é feito o teste Xpert MRSA/SA (Tabela 4) para identificar esta espécie e as suas resistências. Sempre que se realizam testes de ID e TSA, são semeadas placas de controlo da pureza. Em certas situações pode ser usado o *Accelerate Pheno*® para a ID e TSA. Este sistema recorre à hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) para identificar bactérias e leveduras e à tecnologia de análise celular morfocinética para derivar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

**Tabela 4** – Lista de ensaios de RT-qPCR realizados no GeneXpert® no Setor de Microbiologia do SPC-IPOFG.

Ensaio	Amostra	Função
Xpert MRSA/SA <i>Blood Culture</i>	Sangue (hemocultura)	Deteção dos genes codificantes de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>spa</i> ) e de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Metilina ( <i>mecA</i> e <i>SCCmec</i> )
Xpert MRSA NxG	Zaragatoa Nasal	Deteção dos genes codificantes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Metilina/Oxacilina ( <i>mecA/mecC</i> e <i>SCCmec</i> )
Xpert MTB/RIF	Expetoração	Deteção do complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e de mutações do gene <i>rpoB</i> associados à resistência à Rifampicina
Xpert Carba-R	Zaragatoa Retal	Deteção dos genes associados às carbapenemases do tipo KPC, OXA-48, NDM, IMP e VIM
Xpert <i>C. difficile</i>	Fezes	Deteção dos genes codificantes das toxinas B ( <i>tcdB</i> ), binária ( <i>cdt</i> ) e do ribótipo hipervirulento 027 ( <i>tcdΔI17</i> ) de <i>Clostridium difficile</i>



A interpretação e valorização dos resultados pode ser difícil, devendo ser tido em conta o padrão de resultados – se apenas uma das amostras apresentar um resultado positivo e o microrganismo fizer parte da microbiota da pele, é provável que se trate de uma contaminação. Microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* são sempre valorizados, enquanto a recuperação de *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp. apenas é valorizada após integração no contexto clínico do paciente. Por outro lado, os estafilococos coagulase negativo são dos contaminantes mais comuns por fazerem parte da microbiota cutânea, mas podem ser relevantes em pacientes com dispositivos intravasculares como os cateteres e constituir uma verdadeira bacteriemia se todas as amostras apresentarem um resultado positivo para o mesmo microrganismo (9).

### **Amostras Respiratórias**

O trato respiratório pode ser dividido em superior e inferior. O trato respiratório superior é composto pela boca, nasofaringe, orofaringe e laringe, e possui uma elevada diversidade microbiana pelo que uma infecção constituirá a predominância de um tipo de microrganismo. Por outro lado, o trato respiratório inferior compreende a traqueia, os brônquios e o parênquima pulmonar, estruturas e tecidos que são protegidos pela ação das células epiteliais ciliadas e pelo movimento de muco. Em pacientes sob quimioterapia, é frequentemente observada neutropenia ou deficiente função dos neutrófilos, o que lhes confere uma predisposição a infecções respiratórias (4).

No Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG, os produtos respiratórios colhidos mais frequentemente incluem a expectoração, o aspirado brônquico e o lavado broncoalveolar. Visto que a colheita de expectoração facilmente sofre contaminação pela microbiota comensal da orofaringe, a qualidade da amostra é determinada pelos critérios de Murray-Washington (Tabela 5) – é contado o número de células epiteliais e leucócitos por microscopia (objetiva x10) após coloração de Gram do esfregaço, e a amostra é rejeitada se se observar mais de 25 células epiteliais por campo, e é aceite se se observar mais de 25 leucócitos e menos de 10 células epiteliais por campo. A observação do tipo de leucócitos na amostra também é um indicador complementar do tipo de infecção: leucócitos maioritariamente polimorfonucleares são sugestivos de infecções bacterianas, enquanto a predominância de leucócitos mononucleares sugere infecções virais ou por micobactérias.

Para colher expetoração deve usar-se a primeira amostra da manhã, recolhida por tosse profunda e para um contentor estéril, após a lavagem da boca, tentando evitar a contaminação com saliva. Idealmente, deve ser colhida mais do que uma amostra em dias consecutivos (7).

**Tabela 5** – Critérios de Murray-Washington para a avaliação da qualidade das amostras de expetoração. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

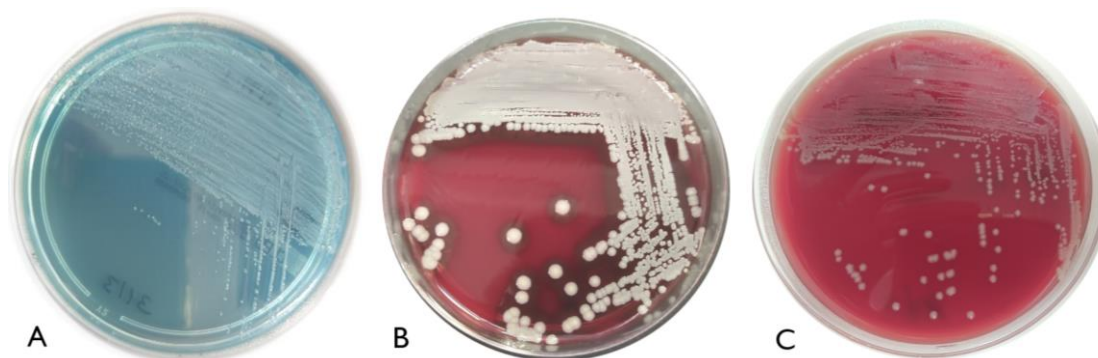
Grupo	Células Epiteliais	Leucócitos
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	< 10	25

Após o exame direto, os produtos respiratórios são semeados nas placas de cultura pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido (Figura 2).

1. Para a cultura de **bactérias**, são usados os meios COS, PVX e HAE2 e incubados a 37°C durante 24h para posterior análise do crescimento.

2. Para a pesquisa de **fungos**, a sementeira é feita em duas placas de SGC2, seladas com Parafilme® e incubadas a 30°C e 37°C. Se a cultura for negativa após 24h, geralmente o suficiente para o crescimento de leveduras, é incubada por mais um mês a 30°C e avaliada semanalmente para o crescimento de fungos filamentosos, de entre os quais o mais comum é o género *Aspergillus* spp. O exame macroscópico de fungos filamentosos inclui observação da sua cor, aspeto e o tipo de micélio, enquanto o exame microscópico implica a discriminação do tipo de hifas (septadas ou asseptadas), da presença ou ausência de pigmentação e o tipo de estruturas reprodutoras. Para a preparação da lâmina, coloca-se em contanto com a colónia uma tira de fita-cola, a qual é colocada por cima de uma gota de azul de lactofenol previamente distribuída no centro da lâmina, usado para aumentar o contraste na observação microscópica, e coberto com uma lamela. A preparação pode ser conservada com verniz para evitar desidratação. Adicionalmente, uma porção periférica da colónia do fungo filamentoso (mais jovem) é repicada por picada no centro de um novo meio SGC2 para o caso de ser necessário realizar estudos adicionais.

Para a avaliação dos resultados culturais, é necessário ter em conta a microbiota do local de onde provém a amostra – por exemplo, se numa mesma placa se observam mais de três morfologias distintas, a amostra é considerada polimicrobiana. Em contrapartida, no caso de predominância de apenas uma morfologia, essas colónias são isoladas através da repicagem para o meio COS de forma a obter colónias puras para ID e TSA, geralmente usando o VITEK® 2.



**Figura 3** – Imagens de placas de cultura com diferentes bactérias isoladas de expetoração de um paciente com traqueostomia. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

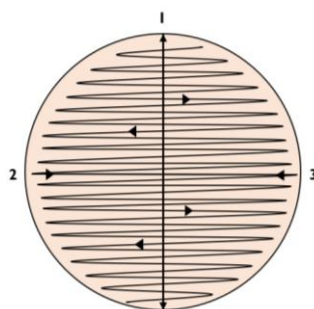
A - *Proteus mirabilis* em CLED; B - *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) em COS; C - *Moraxella catarrhalis* em COS

**3.** Para a pesquisa de **BAAR**, antes do exame direto e cultural, as amostras respiratórias são homogeneizadas para a sua fluidificação e descontaminação de células epiteliais e microbiota através de NaOH/NALC (hidróxido de sódio/N-acetil-L-cisteína), e concentração das micobactérias através de centrifugação (3000G durante 20 minutos) Cada processamento de amostras implica a utilização de um controlo positivo e negativo, e uma sementeira por inundação dos homogeneizados em placas de COS para o controlo do processo de descontaminação. Parte destes homogeneizados é inoculada nos meios LJ e MGIT, e outra é congelada e armazenada, preventivamente. Verifica-se semanalmente, durante dois meses, se ocorreu crescimento nos meios de culturas semeados. Quando os exames culturais são positivos, é realizado um exame microscópico de confirmação do esfregaço corado pela técnica de Kinyoun, e sendo visualizados BAAR no esfregaço, a ID é feita pelo teste Xpert MTB/RIF (Tabela 4). Se este método de Biologia Molecular for negativo, significa que se está na presença de outra espécie de micobactéria. Caso seja necessário, as amostras são enviadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) para confirmação dos resultados.

## Urina

A urina é a amostra biológica mais frequentemente recebida no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG. As infeções do trato urinário (ITU) são das mais comuns, especialmente em pacientes hospitalizados devido às patologias subjacentes e ao uso de dispositivos médicos. Em indivíduos saudáveis, a uretra é colonizada pela microbiota perianal, uretral e vaginal, no caso das mulheres. Por esta razão, após higienização da região genital, deve ser colhido o jato intermédio da primeira urina da manhã para um recipiente esterilizado, ou através de uma punção supra-púbica, punção de um cateter urinário ou da drenagem de nefrostomia ou uretostomia. A cateterização da bexiga é a causa mais frequente de ITU nosocomial, sendo os agentes etiológicos mais comuns a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. (4)

1) Após a receção da amostra, é primeiramente realizada **sementeira** de forma a evitar contaminação. A urina é homogeneizada e inoculada pela técnica de sementeira quantitativa com uma ansa de 1 µl (Figura 4) nos meios CLED, CNA, MCK, e SGC2, caso seja pedido exame micológico. Após 24h de incubação a 37°C, a contagem das UFC é feita na placa de CLED por se tratar de um meio não seletivo.



**Figura 4** – Ilustração da técnica de sementeira quantitativa com uma ansa de 1 µl, usada em amostras de urina.

2) Seguidamente, procede-se à **sumária de urina** que consiste num exame macroscópico, bioquímico e microscópico. É anotada a cor e a turvação da urina, e para a avaliação semiquantitativa dos vários parâmetros bioquímicos, é mergulhada uma tira-teste Combur® em 10 ml de urina não centrifugada e feita a leitura de forma automatizada no LabUReader Plus 2 (Tabela 8). Por fim, é realizada uma observação microscópica a fresco do sedimento urinário (objetiva x40) em que se regista o número médio de leucócitos, eritrócitos e células epiteliais por campo, bem como a presença de bactérias, leveduras, cristais ou cilindros. O sedimento urinário é obtido por ressuspensão de 1 ml de urina após centrifugação de 10 ml (1500 rpm durante 5 minutos), em que os 9 ml de sobrenadante é descartado.

Para a identificação do uropatógeno, a urianálise deve estar concordante com os resultados culturais – por exemplo, ao verificar bactérias no exame microscópico da urina, é de esperar que haja crescimento nos meios de cultura. Placas em que não se observa crescimento nas primeiras 24h, são guardadas por mais um dia porque se pode estar na presença de um microrganismo de difícil recuperação ou a colheita de urina ter sido feita sob antimicrobioterapia.

Para facilitar a análise dos resultados, recorre-se a uma interpretação quantitativa das Uroculturas – considera-se que uma contagem  $\geq 10^5$  UFC/ml, ou seja, 100 colónias com uma mesma morfologia em 1  $\mu$ l de urina, corresponde a um quadro clínica de infeção. Para além disto, é considerada a presença de sintomas, a predisposição e o tipo de população em que o paciente se insere, o tipo de microrganismo isolado, o método de colheita da amostra e se ocorreu administração de terapêutica antimicrobiana. Após a valorização da Urocultura e da sumária de urina, a ID e TSA são feitos usando o VITEK® 2.

## Fezes

Tendo em conta que a microbiota intestinal comensal tem uma ação protetora contra doenças infecciosas do trato gastrointestinal, a sua disrupção pela quimioterapia e administração profilática de antibióticos torna os pacientes oncológicos mais suscetíveis a infeções oportunistas de maior gravidade e duração, especialmente em contexto hospitalar (10).

O processamento de amostras de fezes é dos menos requisitados no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG. No entanto, por defeito, é feita Corpocultura para a pesquisa de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. Quando solicitado, pode-se pesquisar *Yersinia* spp., *Clostridium difficile*, sangue oculto e parasitas. Idealmente, a colheita de fezes dever ser realizada em três dias consecutivos para um recipiente estéril de boca larga porque a emissão dos microrganismos pode ser intermitente. Após a receção da amostra, é realizado um exame macroscópico em que se avalia o aspeto, a consistência e a presença de sangue, pus, ovos ou vermes nas fezes.

1. Para a pesquisa de ***Salmonella*** spp. e ***Shigella*** spp., a amostra é semeada nos caldos de enriquecimento GN e Selenito, e nas placas HEKT e XLD pela técnica de esgotamento do produto à superfície do meio sólido. Após 24h de incubação a 37°C, os caldos são repicados para os meios sólidos referidos anteriormente e novamente incubados nas mesmas condições. As características diferenciais observadas permitem distinguir preliminarmente colónias de *Salmonella* spp. de *Shigella* spp., isolá-las e realizar a ID e TSA através do VITEK® 2.

2. Para a pesquisa de ***Clostridium difficile***, a amostra só é aceita se as fezes se moldarem ao contentor, isto é, se forem diarreicas. Nela, procura-se detetar as toxinas e a enzima glutamato desidrogenase específica a esta bactéria através de um teste imunocromatográfico em que se adiciona reagentes de extração dos antigénios que irão ligar aos anticorpos adsorvidos na cassette. Para validar o resultado deve ser visualizada a banda de controlo, caso contrário é inconclusivo. Se o resultado for positivo (2 bandas), é confirmado pelo teste de Biologia Molecular Xpert *C. difficile* (Tabela 4) que deteta a toxinas B e binária.

3. Para a pesquisa de ***Campylobacter*** spp., também se utiliza um kit de testagem imunocromatográfico rápido que deteta antigénios específicos. Se este for positivo, a amostra é semeada em gelose CAM pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície e incubada a 42°C durante 72h em condições de microaerofilia para posterior ID através do VITEK® 2. Após o ID realiza-se o TSA manualmente pela técnica de Kirby-Bauer.

4. Para a pesquisa de **sangue oculto**, também se utiliza um teste imunocromatográfico que deteta qualitativamente hemoglobina humana.

5. Para a pesquisa de **parasitas**, é feita a concentração das fezes pelo método de Ritchie que consiste numa centrifugação (1500 rpm durante 10 minutos) após a adição de formol 10% e éter, que separa as estruturas parasitárias das fezes. Paralelamente, a amostra também é processada pelo método de Willis para pesquisa de ovos leves de helmintas. É feito um exame direto a fresco do sedimento obtido em que se procede à pesquisa de ovos, larvas ou quistos em várias ampliações. Também pode ser realizado um teste imunocromatográfico para a deteção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

## Exsudatos

As amostras de exsudatos superficiais ou profundos recebidas mais frequentemente são as de feridas cirúrgicas, outro tipo de feridas e abscessos, e, muito raramente, exsudatos auriculares e vaginais. Assim, deve ser tida em conta a origem do produto, a microbiota local, o método de colheita e a história clínica do paciente. Após a receção das amostras, procede-se primeiramente à realização do esfregaço e coloração de Gram para observação microscópica. A sementeira é feita pela técnica de esgotamento do produto por extensão à superfície. Para a ID e TSA utiliza-se o VITEK® 2.

I. Os exsudatos **superficiais** são colhidos com uma zaragatoa e acondicionados no meio de transporte Amies. Consoante o pedido de exame bacteriológico ou micológico, as amostras são semeadas em placas de COS, PVX e SGC2, respetivamente, e incubadas a 37°C durante 24-48h em condições de aerobiose.

2. Os exsudatos **profundos** são colhidos por aspiração com seringa após a assepsia da pele, devendo a agulha ser capsulada para manter os microrganismos anaeróbios viáveis, caso estejam presentes. As amostras são semeadas em COS, PVX e SGC2 e incubadas em condições de aerobiose e SCS, KV e CDC numa atmosfera de anaerobiose (GENbag) a 37°C durante cinco dias. Também são inoculadas nos caldos de enriquecimento BHI, KCS e CC, e incubados a 37°C durante 24-48h para posterior análise da turvação, novo exame microscópico e repicagem para os meios sólidos. Este tipo de processamento também se aplica a amostras de punções ganglionares.

### **Fâneros**

Por vezes são recebidas amostras de cabelo, raspados de pele e unhas para a pesquisa de dermatófitos. Estas são semeadas nos meios Mycoline e SGC2 por picada, e incubadas a 25°C durante um mês. Para procurar estruturas fúngicas por observação microscópica, as amostras são tratadas com hidróxido de potássio para digerir a queratina e soltar as hifas. Se os resultados culturais revelarem leveduras, estas são repicadas para um meio COS para posterior ID e TSA usado o VITEK® 2 e solicitada nova amostra para valorização do isolado. Ao verificar o desenvolvimento de um fungo filamentosos, é usada a técnica da fita cola e azul de lactofenol para identificar as suas estruturas ao microscópio.

### **Pontas de Cateter**

Para a análise microbiológica de pontas de cateter, devem ser colhidas para um contentor estéril e ter um comprimento de 5 cm de forma a utilizar a técnica semi-quantitativa de Maki que permite distinguir entre colonização e contaminação do cateter. Nesta técnica, a ponta de cateter é rodada à superfície do meio COS. De seguida, a ponta de cateter é mergulhada no caldo BHI. Estes meios são incubados a 37 °C durante 24h. Se o meio sólido onde foi rodado o cateter revelar mais de 15 colónias com uma mesma morfologia, procede-se à sua ID e TSA usado o VITEK® 2. Este resultado deve ser corroborado pela turvação do meio líquido, devendo este ser repicado para uma placa COS e posteriormente identificado para valorização dos resultados. Por outro lado, menos de 15 colónias no meio é sugestivo de colonização do cateter.

## Identificação (ID) e Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA)

Após a validação dos resultados e isolamento de colónias puras em meios de cultura sem a presença de antimicrobianos, a ID definitiva e os TSA são maioritariamente realizados no equipamento VITEK® 2. No entanto, em situações particulares pode ser necessário usar o *MicroScan*, o BBL™ CRYSTAL™ ou o *Accelerate Pheno*®. Os sistemas VITEK® 2, *MicroScan* e BD BBL™ CRYSTAL™ implicam sempre a realização de controlos de pureza das suspensões bacterianas preparadas no meio COS. No caso dos microrganismos fastidiosos, os controlos são feitos nos meios PVX e SCS, em condições de anaerobiose, quando apropriado. A densidade necessária das suspensões bacterianas para o VITEK® 2 está descrita nas tabelas 6 e 7, enquanto o *MicroScan* e o BBL CRYSTAL™ requerem uma turvação de 0,5 MacFarland.

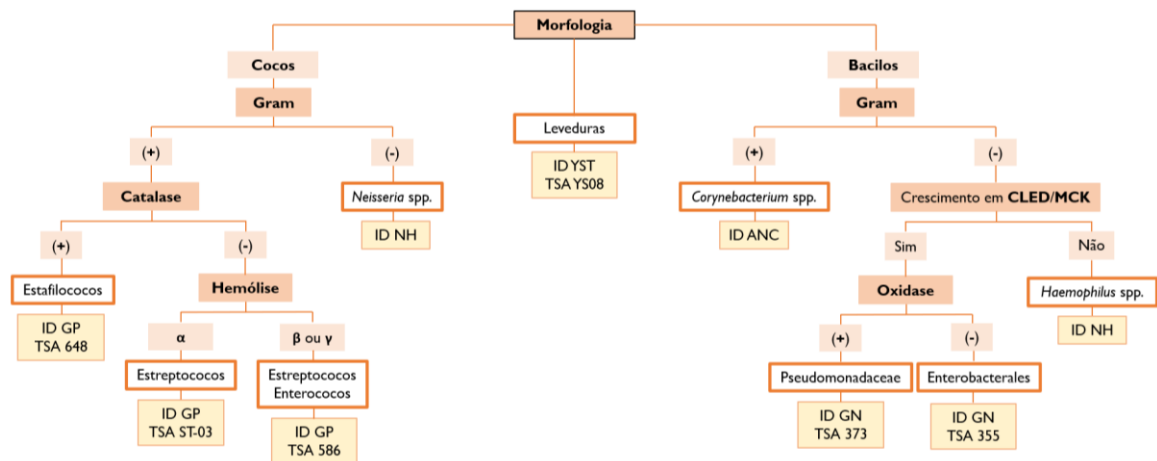
**Tabelas 6 e 7** – Cartas ID e TSA do equipamento VITEK® 2, com os respetivos grupos de microrganismos que identifica e testa a suscetibilidade a antimicrobianos. (Fonte: setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Carta ID	Microrganismos	Densidade (MacFarland)
GP	Cocos Gram negativo	0,60 - 0,63
GN	Bacilos Gram negativo	0,60 - 0,63
YST	Leveduras	1,80 - 2,20
ANC	Bactérias anaeróbias e corineformes	2,70 - 3,30
NH	<i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e outras bactérias fastidiosas	2,70 - 3,30

Carta TSA	Microrganismos
355	Enterobacteriaceae
373	Pseudomonadaceae
648	Estafilococos
586	Estreptococos $\beta$ ou $\gamma$ -hemolíticos e enterococos
ST-03	Estreptococos $\alpha$ -hemolíticos
YS08	Leveduras

Para orientar a escolha de cartas de ID e TSA (Figura 5), para além do exame microscópico, são tidas em conta características como a cor, forma, tamanho, odor, o tipo de hemólise que as colónias apresentam e os meios em que crescem. Adicionalmente, são usadas provas complementares como o teste da oxidase, catalase e o teste de suscetibilidade à optoquina.





**Figura 5** – Representação esquemática das provas realizadas para escolher as cartas de ID e TSA apropriadas. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

➤ **Teste da Oxidase:** permite detetar a presença da enzima citocromo oxidase. É depositada uma colónia pura numa tira comercial impregnada com N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina que produz cor azul na presença da enzima citocromo oxidase. Para evitar falsos positivos, é usada uma ansa de plástico e a leitura feita nos primeiros 30 segundos. Assim, é possível distinguir bactérias não fermentadoras (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa).

➤ **Teste da Catalase:** permite detetar a presença da enzima catalase. Numa lâmina, é depositada uma gota de peróxido de hidrogénio onde, de seguida, é suspendida uma colónia pura. A formação de oxigénio corresponde a um resultado positivo já que a catalase converte peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. Por outro lado, se não há libertação de gás (oxigénio), o teste é negativo. Este teste é usado para distinguir *Staphylococcus* spp. (catalase positiva) de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (catalase negativa).

➤ **Teste de Suscetibilidade à Optoquina:** identifica presuntivamente *S. pneumoniae*. É inoculada uma suspensão bacteriana (densidade = 0,5 MacFarland) a partir de uma cultura pura num meio MHF pela técnica de sementeira em toalha em que se usa uma zaragatoa para cobrir a placa com três planos (técnica de Kirby-Bauer). É colocado um disco de optoquina no centro da placa incubando-a a 37°C durante 24h. A visualização de um halo de inibição ≥ 12 mm distingue *Streptococcus pneumoniae* de outros estreptococos α-hemolíticos que são resistentes a optoquina. Se o halo de inibição for menor a 12 mm, é possível identificar presuntivamente como *Streptococcus pyogenes*.

O equipamento **VITEK® 2** permite fazer a identificação e testes de suscetibilidade a antimicrobianos de vários grupos de microrganismos através de um sistema que deteta crescimento bacteriano e alterações metabólicas em poços com diferentes substratos através de tecnologias colorimétricas e de fluorescência. Os microrganismos são identificados através da comparação dos resultados com uma base de dados, obtendo-se também um valor percentual da confiança no resultado obtido. Para os TSA, as cartas de Gram positivo e YST requerem 280 µl de suspensão bacteriana enquanto as de Gram negativo requerem 145 µl. Os TSA dos grupos de microrganismos ANC e NH são realizados manualmente em placas de MHF pela técnica de Kirby-Bauer e em condições de anaerobiose quando necessário. Por escolha do laboratório, as cartas YST são incubadas a 37°C durante 30 minutos antes da sua inoculação para aumentar a recuperação das leveduras e aumentar a eficiência da ID e TSA.

Também é usado o sistema **MicroScan** quando os resultados de ID e TSA de bactérias do VITEK® 2 não são satisfatórios. Similarmente, baseia-se num painel com poços com reagentes bioquímicos e antibióticos liofilizados em que é inoculada uma suspensão bacteriana. O painel é incubado a 37°C durante 24h para posterior leitura das alterações colorimétricas resultantes de reações de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise.

Para a identificação de bactérias Gram positivo é ainda usado o sistema **BD BBL™ CRYSTAL™**, que utiliza substratos cromogénicos e fluorogénicos cuja leitura é feita através de uma fonte de luz ultravioleta (UV). Obtém-se um bionúmero que é inserido numa base de dados e convertido numa ID com probabilidade determinada.

Considerando o estado debilitado do sistema imunitário, as hospitalizações prolongadas, os procedimentos invasivos, a frequente exposição a antimicrobianos de largo espectro e as subseqüentes resistências bacterianas aos antimicrobianos, os TSA são da maior importância pois permitem aos clínicos aplicar ou ajustar a antibioterapia e realizar um controlo epidemiológico. Assim, o laboratório de Microbiologia do SPC-IPOCFG segue as Normas da EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para selecionar os antimicrobianos para os quais um microrganismo é resistente ou suscetível e notificar os clínicos caso seja necessário isolar pacientes com infeções por microrganismos multirresistentes.

Quando os TSA dos equipamentos automatizados não são satisfatórios ou quando se trata de um antibiótico que não está disponível nas cartas, recorre-se à execução da técnica manual. Para os antibiogramas manuais são usados os métodos da difusão em disco de Kirby-Bauer e o *E-test*.

No teste de **Kirby-Bauer**, sobre estas geloses são colocados discos de papel de filtro com uma concentração conhecida de determinado antibiótico, criando um gradiente de concentração ao longo da sua difusão pela superfície do meio (Figura 6). A aplicação destes discos deve ser feita usando uma pinça esterilizada ou um dispensador manual, aplicando no máximo cinco discos por placa de 90 mm para evitar a sobreposição de halos de inibição. Após incubação a 37°C durante 24h, é medido o diâmetro de inibição do crescimento bacteriano à volta do disco de antibiótico em milímetros, valor que determina se a estirpe é suscetível, de sensibilidade intermédia ou resistente, consoante os *breakpoints* estabelecidos pela EUCAST anualmente.

Por outro lado, o **E-test** consiste numa tira ao longo da qual estão impregnadas concentrações crescentes de antibiótico, colocada no centro da placa previamente inoculada (Figura 7). Após incubação a 37°C durante 24h, o ponto de interseção do halo com a tira corresponde à CIM, um valor que permite avaliar a suscetibilidade de acordo com o previsto nas Normas da EUCAST.

### **Pesquisa e Identificação de Enzimas Inativadoras de $\beta$ -lactâmicos**

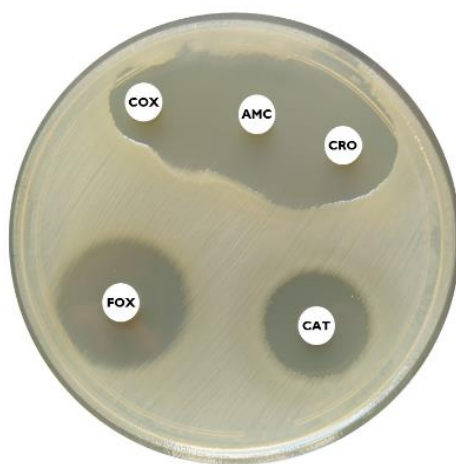
Os  $\beta$ -lactâmicos são os antibióticos mais amplamente usados na clínica e englobam penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos. O mecanismo de resistência usado mais frequentemente por bactérias Gram negativo é a inativação destes fármacos através da sua hidrólise por  $\beta$ -lactamases, inibindo as proteínas de ligação às penicilinas (PBPs) e subsequentemente a síntese da parede celular bacteriana. Estas enzimas podem ser cromossomais e codificar resistência intrínseca, ou serem adquiridas através de elementos genéticos móveis (v.g.: plasmídeos) (II).

I. Se a  $\beta$ -lactamase codificada pelo gene *ampC* conferir resistência a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, trata-se de uma  $\beta$ -lactamase de espectro alargado (**ESBL**). A sua pesquisa é realizada pelo método de Kirby-Bauer usando cefalosporinas de 3ª geração como Ceftriaxona (CRO) e Cefotaxima (COX) e um inibidor de  $\beta$ -lactamases como o Ácido Clavulânico (AMC), de acordo com o definido nas Normas da EUCAST. Os discos CRO e COX devem ser colocados exatamente a 2 cm do disco AMC. O teste é considerado positivo (presença de ESBL) quando se observa sinergismo, ou seja, um aumento do halo de inibição na direção do inibidor de  $\beta$ -lactamases (Figura 6). Se não houver sinergismo entre os antibióticos, a bactéria é classificada como ESBL negativa, ou seja, não é portadora da enzima ou não a expressa. Este teste é realizado de acordo com as da Normas EUCAST, sempre que a CMI de Cefotaxima e Ceftazidima de Enterobacterales é maior ou igual a 1 mg por litro.

2. Para a detecção de  $\beta$ -lactamases codificadas pelo gene **ampC indutível**, é utilizado um disco de Cefoxitina (FOX) pelo método de Kirby-Bauer. A formação de um halo de inibição maior ou igual a 19 mm à volta do disco indica que a estirpe é sensível e *ampC* indutível negativa (Figura 6). Se o halo de inibição for menor a 19 mm, a bactéria é resistente e *ampC* indutível positiva.

As  $\beta$ -lactamases que atuam contra carbapenemos denominam-se carbapenemases. Podem ser encontradas principalmente em Enterobacteriaceae e ser categorizadas nas classes A, B, C e D de Ambler de acordo com a sua estrutura primária. As classes A, C, e D incluem serino-proteases sem semelhanças estruturais significativas entre si, enquanto a classe B é composta por metaloenzimas com um ou dois íons de zinco necessários à sua atividade catalítica que se designam metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs). A carbapenemase NDM (*New Delhi*), IMP-I (Imipenemase) e VIM (*Verona Integron-encoded*) pertencem à classe da classe B de Ambler, enquanto as KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) integram a classe A e as OXA-48 (Oxacilinase) a classe D (12).

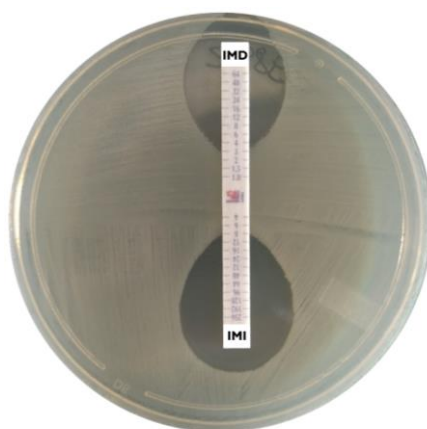
3. Para a pesquisa de **carbapenemases** é feito um teste de rastreio usando um disco de Faropenemo (CAT) pelo método de Kirby-Bauer. Se houver formação de um halo de inibição à sua volta significa que a estirpe em questão não produz carbapenemases (Figura 6). Se não houver formação do halo de inibição, a estirpe é carbapenemase positiva.



**Figura 6** – Imagem de uma placa semeada pelo método de Kirby-Bauer com diferentes discos de antibiótico que revelam a presença de ESBLs (COX + AMC + CRO) e ausência de *ampC* indutível (FOX) e carbapenemases (CAT) na estirpe estudada. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Ao verificar que a estirpe pode ser produtora de carbapenemases, é feito um teste imunocromatográfico para a pesquisa de enterobactérias produtoras de carbapenemases para confirmar a sua presença e identificar o tipo de carbapenemase que expressa. Se o resultado for negativo, ou seja, a carbapenemase não é OXA-48, KPC ou NDM, é feito o teste Xpert Carba-R (Tabela 4) que pesquisa adicionalmente as carbapenemases IMP-I e VIM.

4. Para a pesquisa de **metalo- $\beta$ -lactamases** (MBLs), é realizado um *E-test* em que metade da tira está impregnada com Imipenem (IMI) e a outra com Imipenem e EDTA (IMD). Como as MBLs são queladas pelo EDTA, se o valor do halo formado à volta do IMD for maior ou igual a 3 log<sub>2</sub> diluições do valor de IMI, significa que a estirpe é MBL positiva. Caso contrário, a estirpe não será produtora de MBLs (Figura 7).



**Figura 7** – Imagem de uma placa semeada pelo método de Kirby-Bauer com um *E-test* IMI/IMD MBL negativo na estirpe estudada. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

Para além das amostras dos utentes e profissionais de saúde, o Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG realiza o controlo microbiológico semanal do ar ambiental passivo e das superfícies da câmara de fluxo laminar, das bancadas e dedadas de luva dos operadores das salas limpas de preparação de citostáticos dos Serviços Farmacêuticos. Para tal, utilizam-se placas de contacto para as superfícies e COS para o ar ambiente passivo e dedadas de luva. Também é feita a análise microbiológica da água de enxaguamento obtida no reprocessamento de broncoscópios e endoscópios do Serviço de Gastroenterologia e Pneumologia. Estas amostras são semeadas por inundação no meio COS, centrifugadas e enriquecidas com caldo de tripticase de soja (TSB), sendo o sedimento e as amostras enriquecidas semeadas da mesma forma. As placas são incubadas a 37°C e o crescimento é avaliado às 24h e 48h. Os meios TSB são repicados após 48h e todos os microrganismos identificados são reportados em relatório.

Apesar do Setor de Microbiologia ser o menos automatizado, recorre aos equipamentos listados na Tabela 8 para maximizar a qualidade dos resultados e a celeridade com que são fornecidos. Outros equipamentos incluem 1 câmara de fluxo laminar, estufas a 25°C, 30°C, 37°C (com e sem atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub>) e 42°C, uma centrífuga, três frigoríficos e quatro microscópios óticos.

**Tabela 8** – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b> (Fornecedor)	<b>Função</b>
<i>Aerospray</i> <sup>®</sup> Gram <i>Slidestainer</i> e <i>Aerospray</i> <sup>®</sup> TB <i>Slidestainer</i> (ELITech Group)	Coloração de Gram e Kinyoun automatizada, respetivamente, de esfregaços de amostras
BD BACTEC <sup>™</sup> 9020 <i>Blood Culture System</i> (Quilaban)	Incubação de garrafas de hemocultura e monitorização do crescimento de microrganismos através da produção de CO <sub>2</sub> e deteção da fluorescência emitida
<i>LabUReader Plus 2 +</i> <i>Labstrip U11 Plus</i> (A. Menarini Diagnostics)	Deteção bioquímica de bilirrubina, urobilinogénio, corpos cetónicos, ácido ascórbico, glicose, proteínas, sangue, pH, nitritos, leucócitos e densidade em urina
<i>Vitek</i> <sup>®</sup> 2 <i>Compact 15</i> (Biomérieux)	ID e TSA através de espectrofotometria e turbidimetria
<i>MicroScan autoSCAN-4 System</i> (Beckman Coulter)	ID e TSA (método alternativo) através de espectrofotometria e turbidimetria
<i>Accelerate Pheno</i> <sup>®</sup> <i>System + Accelerate PhenoTest</i> <sup>®</sup> BC kit (Accelerate Diagnostics)	ID e TSA através de FISH e análise celular morfofocinética em amostras de sangue de hemoculturas positivas
<i>GeneXpert</i> <sup>®</sup> <i>System</i> (Cepheid)	RT-qPCR

O **CQI** deste Setor passa pelo controlo microbiológico diário da solução salina usada para a preparação das suspensões bacterianas, em que é dispensado 1 ml para um meio COS que é incubado a 37°C durante 48h para, posteriormente, ser avaliada a presença de contaminantes. Também é realizado o controlo diário do equipamento *LabUReader Plus 2* através de soluções-controlo. Para além disso, as cartas de ID e TSA do VITEK<sup>®</sup> 2 e o *Accelerate Pheno*<sup>®</sup> são controlados mensalmente através da utilização de estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*). Mensalmente, usando estas mesmas estirpes, é avaliada a qualidade dos discos de antibióticos. Paralelamente, o **CQE** consiste no processamento de amostras bacterianas, micológicas e parasitológicas enviadas pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do INSA, ao qual se deve reportar os resultados de ID e TSA. Estas amostras são processadas da mesma forma que as amostras dos pacientes e os resultados interpretados de acordo com a história clínica que as acompanha.

## Setor de Virologia

Este é o Setor mais recente do SPC do IPOCFG, introduzido em 2020 para dar resposta à pandemia do SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2). É composto pela receção, vestiários, gabinete médico, sala de extração de pressão negativa, sala limpa, salas de amplificação, pós-amplificação, lavagem e lixo biológico. Na base do seu funcionamento está a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcrição Reversa (RT-qPCR), uma técnica de Biologia Molecular de deteção e amplificação de fragmentos genéticos específicos através da enzima transcriptase reversa que transforma o RNA do vírus em DNA complementar.

O foco do Setor é o diagnóstico da infeção pelo SARS-CoV-2 usando zaragatoas nasofaríngeas que, por questões de segurança, são transportadas em dois contentores. A escolha do equipamento automatizado (Tabela 9) de purificação de ácidos nucleicos depende do número de amostras recebidas e da urgência do pedido. Este processo consiste na lise celular, inativação das nucleases e libertação dos ácidos nucleicos que ligam a partículas magnéticas, permitindo a sua extração. O material genético é eluído, combinado com kits comerciais de PCR e introduzido no termociclador.

Este Setor também recebe amostras de sangue total com EDTA para o rastreio da deficiência da enzima dihidropirimidina desidrogenase que aumenta a toxicidade dos fármacos contendo fluorouracilo, capecitabina e tegafur utilizados no tratamento do cancro (13) através da pesquisa de 4 polimorfismos. Como este estudo é requisitado menos frequentemente, as amostras são congeladas e processadas em conjunto uma vez por semana para poupar tempo e recursos. O manuseamento das amostras é sempre realizado em câmaras de fluxo laminar.

**Tabela 9** – Lista dos equipamentos e a sua função no Setor de Virologia do SPC-IPOCFG.

<b>Equipamento</b> (Fornecedor)	<b>Função</b>
MagNA Pure 24® (Roche)	Extração de ácidos nucleicos de até 24 amostras de cada vez
GenePure Pro™ (Bioer)	Extração de ácidos nucleicos de 16 ou 32 amostras de cada vez
Cobas® Z 480 (Roche)	Deteção qualitativa dos genes E e RdRp do SARS-CoV-2 e do gene DPYD através de RT-qPCR em várias amostras simultaneamente
VitaPCR™ (Credo™ Diagnostics)	Deteção qualitativa do SARS-CoV-2 em 20 minutos através de RT-qPCR em uma amostra de cada vez
NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific)	Avaliação da qualidade da purificação de ácidos nucleicos através de espectrofotometria

## Setor de Imunologia e Hormonologia

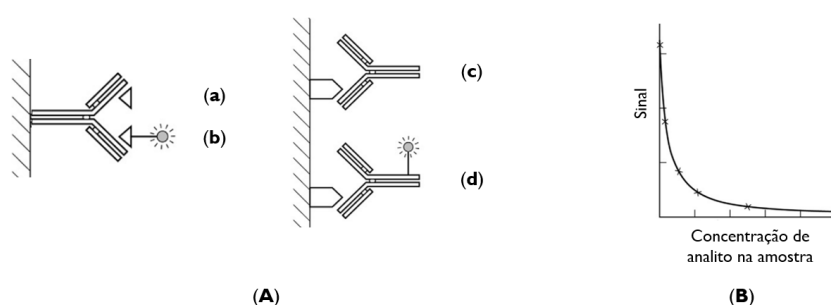
Os anticorpos são componentes essenciais do sistema imunitário. Para além da proteção que oferecem contra agentes infecciosos, são também reagentes incrivelmente úteis e extraordinariamente específicos para a deteção e quantificação de numerosas substâncias (14). A sua aplicação prática nesta secção inclui o doseamento de proteínas de fase aguda, hormonas, marcadores tumorais, anticorpos, entre outras moléculas, para o acompanhamento dos pacientes oncológicos.

Para a maioria dos analitos são colhidas amostras de sangue venoso para tubos VACUETTE® com ativador de coagulação e gel separador de forma a obter soro após centrifugação a 15°C (2100G durante 10 minutos). Para a obtenção de plasma são usadas amostras de sangue total com EDTA, permitindo o doseamento de moléculas como a hormona paratiroideia (PTH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH), renina e aldosterona. São ainda utilizadas amostras de sangue com heparina de lítio para a determinação das metanefrinas fracionadas (metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina) e para o ensaio de libertação do interferão-gama (IGRA). Relativamente à temperatura são, por exemplo, transportadas e centrifugadas amostras de sangue a 37°C para o doseamento de crioglobulinas e a 4°C para dosear PTH, ACTH, imunocomplexos circulantes, homocisteína, glucagina e metanefrinas fracionadas. Adicionalmente, são processadas amostras de urina pontual e urina das 24h (tratadas ou não com HCl) para o doseamento de parâmetros como o cortisol, ácido vanilmandélico (VMA), meta e normetanefrinas e iodo. A maioria das amostras usadas nas técnicas manuais são armazenadas em tubos secundários a -20°C para posterior processamento de forma a maximizar os kits usados. Também é doseado o cortisol livre salivar e a tiroglobulina, calcitonina e PTH nos lavados dos aspirados ganglionares ou BAAF (biópsia aspirativa de agulha fina). Além disso, são realizados estudos de autoimunidade, proteinogramas e imunofixações de proteínas plasmáticas e urinárias.

Após a receção informática e centrifugação das amostras, estas seguem para os diferentes equipamentos consoante os parâmetros requisitados (Tabela 10). O primeiro deste percurso é o VersaCell® X3, um sistema robótico que conecta dois equipamentos independentes (IMMULITE® 2000 XPi e ADVIA Centaur® XP), pelos quais distribui os tubos com soro, otimizando o fluxo de trabalho. São reencaminhadas para os restantes autoanalísadores pela seguinte ordem, salvo algumas exceções: VersaCell® → B·R·A·H·M·S KRYPTOR™ GOLD → Cobas® 6000 + Cobas® e 601 → Atellica® NEPH 630 Analyser System → Oplite® → DS-iSYS Multi-Discipline Automated System



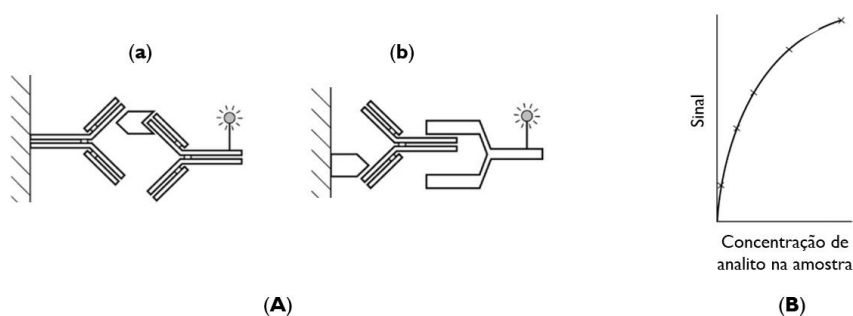
A avaliação dos parâmetros neste Setor baseia-se na formação do complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac), ou seja, em imunoenaios. Para detetar estes imunocomplexos são usados radioisótopos, enzimas, moléculas quimioluminescentes ou fluorescentes. A determinação da concentração de analito na amostra do paciente implica a construção de uma curva de calibração usando soluções de concentração conhecida. As reações Ag-Ac podem ser competitivas ou não competitivas (em “sandwich”) consoante as características do analito que se pretende determinar. Enquanto as técnicas não competitivas implicam excesso de reagente, as técnicas competitivas têm uma quantidade de reagente limitada. Além disso, imunoenaios heterogêneos requerem lavagens para desprever a solução das moléculas não ligadas, enquanto imunoenaios homogêneos excluem este passo (15).



**Figura 8** – Esquema ilustrativo de um Imunoensaio Competitivo. Adaptado de (16)

(A) O antígeno (a) ou anticorpo (c) a determinar na amostra compete pela formação da ligação Ac-Ag com um antígeno (b) ou anticorpo (d) análogo marcado (*tracer*), respetivamente, de concentração conhecida, adsorvido à superfície de uma fase sólida.

(B) Quanto maior a concentração de antígeno da amostra do paciente, menor é o sinal detetado. Ou seja, a quantidade de *tracer* ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à quantidade de antígeno a determinar.



**Figura 9** – Esquema ilustrativo de um Imunoensaio Não Competitivo. Adaptado de (16)

(A) A ligação do antígeno (a) ou anticorpo (b) a determinar na amostra ao Ac ou Ag Ihe específico, imobilizado numa fase sólida, é evidenciada por um anticorpo secundário marcado.

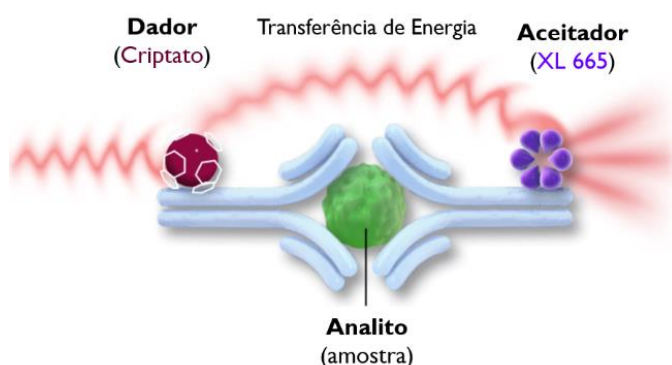
(B) Quanto maior a concentração de analito da amostra do paciente, maior é o sinal detetado. Ou seja, a quantidade de *tracer* ligado ao anticorpo é diretamente proporcional à quantidade de analito a determinar.

## Imunoensaios Enzimáticos – ELISA e FEIA

Os imunoensaios enzimáticos usam anticorpos marcados com enzimas para detetar analitos. Os ensaios de imunoabsorção enzimática (**ELISA**) são técnicas heterogêneas em que é adicionado um substrato cromogénico para evidenciar a ligação do analito capturado por Ac ou Ag imobilizados numa superfície sólida ao anticorpo conjugado. Nos imunoensaios enzimáticos de fluorescência (**FEIA**), por outro lado, o substrato adicionado gera emissão de fluorescência. Por exemplo, no sistema ImmunoCAP™/Phadia™ (Tabela 10), após a adição de reagente revelador, a ligação dos anticorpos anti-IgE humana conjugados com  $\beta$ -galactosidase às IgE específicas da amostra do paciente capturadas pelos alérgenos imobilizados, produz moléculas fluorogénicas.

## Imunoensaio de Fluorescência por Emissão de Criptato Amplificada Tempo-Resolvida (TRACE™)

Esta é uma técnica homogênea não competitiva. Baseia-se na transferência de energia que ocorre entre 2 fluoróforos após excitação luminosa, quando os anticorpos com os quais estão conjugados ligam ao mesmo antígeno-alvo (Figura 10). O fluoróforo dador é o criptato, um quelante de európio (lantanídeo), e o fluoróforo aceitador é o XL 665, uma ficobiliproteína derivada de algas vermelhas. A vantagem deste método consiste na sobreposição de espectros entre os marcadores de emissão e de absorção, que intensifica o sinal fluorescente do dador e estende o tempo de vida do sinal do aceitador, permitindo uma medição tardia da fluorescência de interesse, após o decaimento da fluorescência de fundo de curto tempo de vida que pode ser gerada na amostra biológica (16).



**Figura 10** – Esquema ilustrativo do TRACE™. Adaptado de (17)

### **Imunoensaios Quimioluminescentes (CLIA) e Eletroquimioluminescentes (ECLIA)**

São métodos heterogêneos e usam ensaios competitivos e não competitivos. Têm por base a medição da energia luminosa emitida quando um eletrão retorna ao seu estado basal após a excitação provocada pela oxidação de um substrato luminogénico (ex.: éster de acridínio) por um oxidante (ex.: peróxido de hidrogénio) que ocorre quando Ac ou Ag marcados com uma enzima (ex.: fosfatase alcalina) ligam ao analito-alvo da amostra (15). A luz emitida é medida por um fotomultiplicador e, ao contrário das desintegrações radioativas, estes métodos constituem uma alternativa mais segura, rápida, específica e sensível (16). Os ECLIA diferem dos CLIA no sentido em que a espécie reativa produzida é gerada de forma eletroquímica na superfície de um eléctrodo. O marcador mais usado é um quelante de ruténio e luminescência é gerada através de uma reação de oxidação-redução com tripropilamina após a aplicação de um estímulo elétrico (15). Para a realização das lavagens são usadas esferas paramagnéticas como fase sólida.

### **Imunonefelometria e Imunoturbidimetria**

São técnicas analíticas usadas para medir a dispersão da luz, um fenómeno físico que resulta da interação da luz com partículas em solução – a turbidez diminui a intensidade da luz incidente quando atravessa a solução com complexos Ac-Ag em suspensão. Ao contrário da fluorescência, o comprimento de onda da luz dispersada é o mesmo que o da luz incidente. A imunoturbidimetria mede a luz transmitida através de um espectrofotómetro posicionado perpendicularmente (180°) em relação à fonte luminosa, enquanto a imunonefelometria mede a luz dispersada através de um fotodetector posicionado a um ângulo de 45-90° em relação à fonte de luz (16).

### **Radioimunoensaios (RIA) e Ensaios Imunoradiométricos (IRMA)**

São técnicas manuais, heterogêneas e implicam o uso de compostos radioativos pelo que têm caído em desuso, principalmente devido ao perigo operacional inerente à sua manipulação e ao risco ambiental associado à eliminação de resíduos. Os RIA são métodos competitivos que utilizam um antigénio análogo marcado e são usados para dosear vários analitos, nomeadamente meta e normetanefrinas plasmáticas e urinárias, polipeptídeo pancreático (PP) serotonina e desidroepiandrosterona (DHEA). Em contrapartida, os IRMA são ensaios em “sandwich” que utilizam um anticorpo secundário marcado e permitem dosear analitos como a proteína relacionada com a hormona paratiroideia (PTHrP). O isótopo radioativo usado na marcação é o Iodo<sup>125</sup>, que é detetado e quantificado num contador de radiação gama (15).

### **Ensaio de Liberação de Interferão-Gama (IGRA)**

Técnica automatizada utilizada para auxiliar no diagnóstico de infecções latentes ou ativas por *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes e profissionais de saúde. O processamento de cada amostra de sangue requer um controlo positivo com mitogénios (fitohemaglutinina) que induzem a ativação e proliferação de linfócitos T e a subsequente liberação inespecífica de interferão-gamma (INF- $\gamma$ ), um controlo negativo (sem antigénios) com um nível basal de INF- $\gamma$  e um tubo com péptidos de *M. tuberculosis* que provocarão a liberação específica de INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  destes tubos forma imunocomplexos com anticorpos marcados, sendo quantificados por leitura da fluorescência (FEIA) a partir da qual se obtém um resultado qualitativo.

### **Estudos de Autoimunidade**

Para o rastreio de autoanticorpos é usada a imunofluorescência indireta. Nesta técnica, é incubada uma lâmina coberta com uma cultura celular fixada com diferentes diluições do soro do paciente para que ocorra a ligação entre os antigénios das células e os anticorpos da amostra. Aos autoanticorpos ligam-se anticorpos específicos conjugados com fluoresceína que, por sua vez, se ligam a anticorpos anti-IgG humana. Estes imunocomplexos são visualizados através de um microscópio de fluorescência, sendo avaliados os padrões morfológicos nucleares, citoplasmáticos e mitóticos relativamente à forma, homogeneidade, densidade e intensidade da marcação nas diferentes diluições (18).

Para a deteção e identificação de autoanticorpos, para além do sistema ImmunoCAP™/Phadia™, é também usado o EUROBlotMaster, em que amostra do paciente é incubada com tiras teste revestidas com variados alergénios. Se ocorrer a formação de imunocomplexos, a presença dos autoanticorpos é revelada pela adição de anticorpos secundários conjugados com ALP e de substrato, dando origem a uma reação cromogénica e formação de uma banda na tira, com intensidade proporcional à sua concentração.

### **Quantificação de iodo urinário** baseada na reação de Sandell-Kolthoff

Amostras de urina ocasional centrifugadas (2500 rpm durante 5 minutos) são incubadas com persulfato de amónio a 100°C para eliminar interferentes. Após a digestão, é adicionada uma solução ácida de óxido arsenioso e de sulfato cérico amoniacal (amarelo) que é convertido na sua forma cerosa (incolor) pelo iodo. A concentração de iodo na amostra é determinada pela medição da absorvância que resultou da reação colorimétrica com o auxílio de uma curva de calibração construída com padrões de concentração conhecida. Esta técnica pode ser relevante para pacientes com disfunção tiroideia ou em tratamento com iodo radioativo.

## Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais (MTs) englobam uma ampla gama de moléculas produzidas ou induzidas por células tumorais, o que permite detetar a presença ou desenvolvimento de tumores malignos, bem como avaliar a sua resposta a terapêutica. Podem ser detetados no sangue, urina, fezes e noutros fluidos biológicos. Consoante as suas características, podem ser usados para rastreio, prognóstico e deteção de metastização e recidivas. Porém, os MTs não são específicos do cancro – a maioria são sintetizados e libertados por células normais, razão pela qual estão estabelecidos valores de referência (19).

A especificidade dos MTs enquadra-se na discriminação da origem benigna ou maligna do seu aumento no soro. Elevações isoladas são de pouco valor pelo que se deve ter em conta a história clínica do paciente, a grandeza e o padrão de alterações dos seus valores para avaliar os resultados. É recomendado realizar dois a três doseamentos sequenciais em intervalos superiores ao seu tempo de meia-vida plasmático, o que corresponde a cerca de 15-20 dias para a maioria dos MTs. Aumentos contínuos representam uma grande probabilidade de o tumor ter origem maligna porque reflete o seu crescimento (20).

A sensibilidade dos MTs traduz-se na sua capacidade de detetar a presença de células neoplásicas precocemente. Depende do tamanho do tumor e da sua localização, o que corresponde à sua concentração e à capacidade de chegar à corrente sanguínea, respetivamente. Várias patologias benignas ou danos em determinados tecidos, bem como alterações na função hepática ou renal podem causar aumentos do MT, o que pode levar a falsos positivos. É também importante considerar os efeitos dos tratamentos anticancerígenos.

Para maximizar a sua utilidade, os MTs devem ser determinados em conjunto de forma a complementarem-se devido às suas variáveis especificidades e sensibilidades. Deve-se também ter em atenção possíveis interferências técnicas como reações cruzadas e a presença de anticorpos heterofílicos, e que pode haver discrepâncias entre os resultados obtidos por diferentes métodos comerciais (19).

Abaixo estão descritos MTs séricos frequentemente quantificados no Setor de Imunologia e Hormonologia, a sua aplicabilidade e limitações nos pacientes oncológicos. As técnicas de deteção recorrem a anticorpos monoclonais e as suas vantagens consistem na rapidez de obtenção dos resultados a partir de amostras obtidas por métodos não invasivos.

## Principais Marcadores Tumorais doseados no Setor de Imunologia e Hormonologia

### ➤ **AFP** ( $\alpha$ -Fetoproteína)

Glicoproteína oncofetal sintetizada principalmente pelas células do saco vitelino e hepatócitos fetais, chegando a constituir 1/3 das proteínas no soro do feto. À semelhança da albumina, com a qual partilha sequências homólogas de aminoácidos, a sua função envolve o transporte de diferentes substâncias como ácidos gordos não esterificados, hormonas esteroides e bilirrubina. Após o nascimento, os valores de AFP diminuem até à gama de referência de um indivíduo adulto a partir de cerca de um ano de idade. Este MT é especialmente útil para a deteção do desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares, sendo também usado para o cancro gástrico e carcinomas de células germinativas do testículo e do ovário. No entanto, o seu uso como biomarcador precoce é limitado e podem surgir falsos positivos por causas benignas como a gravidez, patologias hepatobiliares benignas e doenças autoimunes (20).

### ➤ **CEA** (Antigénio Carcinoembrionário)

Glicoproteína oncofetal com uma função que não está completamente esclarecida, mas pensa-se estar associada a mecanismos de reconhecimento ou adesão celular. A sua determinação é indicada para o prognóstico e monitorização terapêutica de pacientes com cancros epiteliais, especialmente tumores gastrointestinais, pulmonares, cancro da mama e cancro medular da tiroide. Porém, como é metabolizado pelo fígado, as decisões clínicas relativas à gestão da doença não se podem basear unicamente neste MT. Podem ocorrer falsos positivos devido a doenças hepáticas, colite ulcerativa, doença de Crohn e insuficiência renal (20).

### ➤ **Tiroglobulina**

Glicoproteína sintetizada pela tiroide e a partir da qual são formadas as hormonas triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) aquando da estimulação pela hormona tiroestimulante (TSH). A sua elevação no soro é um indicador inespecífico de disfunção tiroideia, mas é útil para o acompanhamento de pacientes com carcinomas da tiroide diferenciados, especialmente na fase pós-operatória para detetar a presença de massa tumoral residual. Adicionalmente, devem ser doseados os anticorpos anti-tiroglobulina porque a sua presença produz valores falsamente baixos nos imunoensaios, podendo também ser um marcador de recorrência. Falsos positivos ocorrem durante a gravidez e patologias tiroideias benignas (20).

➤ **hCG** (Gonadotrofina Coriônica Humana)

Hormona glicoproteica sintetizada pelas células trofoblásticas da placenta, atingindo um pico entre a 10<sup>o</sup>-12<sup>o</sup> semana de gestação a partir do qual diminui progressivamente. Tem como função manter a secreção de progesterona e a função do corpo lúteo durante a fase inicial da gravidez. A sua subunidade  $\alpha$  é idêntica à de outras hormonas enquanto a subunidade  $\beta$  é mais específica e confere a atividade biológica à hCG, podendo ser medida sem reações cruzadas com outras hormonas. São produzidas quantidades residuais de hCG total e  $\beta$ -hCG em tecidos como a mama, a hipófise, próstata, testículos e músculo esquelético. Este MT é indicado para o diagnóstico e controlo de pacientes com tumores trofoblásticos e de células germinativas do testículo e do ovário. Podem surgir falsos positivos devido a gravidez, menopausa, doenças autoimunes, insuficiência renal e o uso de canábis (20).

➤ **Calcitonina**

Hormona polipeptídica sintetizada pelas células parafoliculares da tiroide que tem como função baixar os níveis de cálcio no sangue através do bloqueio da reabsorção óssea. É especialmente útil no diagnóstico e monitorização do cancro medular da tiroide, sendo a sua concentração diretamente proporcional à massa tumoral. Também é usado como marcador de cancro pulmonar e da síndrome Zollinger-Ellison. Falsos positivos podem ser causados por insuficiência renal, hipercalcémia, hipergastrinémia, sépsis e doenças autoimunes da tiroide (20).

➤ **B2M** ( $\beta$ -2 Microglobulina)

Componente polipeptídico do Complexo Major de Histocompatibilidade da classe I, expresso na superfície de todas as células nucleadas. A sua produção aumenta na presença de doenças linfoproliferativas, sendo a sua concentração plasmática diretamente proporcional à massa tumoral dos mielomas e linfomas, podendo constituir um indicador da eficácia do tratamento oncológico. Podem surgir falsos positivos devido a doenças hepáticas crónicas, lesões cerebrais, infeções e doenças autoimunes. Adicionalmente, a B2M aumenta no sangue em casos de insuficiência renal porque é filtrada pelos glomérulos renais, reabsorvida e metabolizada pelos túbulos proximais graças ao seu baixo peso molecular (20).

➤ **SCCA** (Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas)

Glicoproteína da família dos inibidores de proteases serínicas detetada no tecido escamoso de órgãos como o colo do útero, pulmão, esófago e pele. A sua expressão aumenta nos carcinomas de células escamosas, sendo usada como MT principalmente no diagnóstico, monitorização de pacientes com cancro do cérvix uterino, do pulmão e cabeça e pescoço. Falsos positivos são devidos a insuficiência renal e patologias dermatológicas (21).

➤ **HER-2/neu**

Glicoproteína transmembranar da família do recetor do fator de crescimento epidérmico, libertada durante o processo de morte celular de células epiteliais neoplásicas. É um MT muito útil para o diagnóstico, prognóstico e monitorização de pacientes com cancro da mama. Apesar da sua elevada especificidade ao cancro, não é tão específico ao tecido, estando ligeiramente aumentado no cancro pulmonar e outros carcinomas epiteliais. Além disso, podem ocorrer pequenas elevações em doença hepáticas severas, insuficiência renal e doenças ginecológicas (20).

➤ **HE4** (Proteína 4 do Epidídimo Humano)

Proteína 4 do epidídimo humano com um papel antimicrobiano e anti-inflamatório na imunidade inata. Está presente principalmente nos tecidos epiteliais do trato reprodutivo e respiratório. Como MT, é essencialmente usado em para pacientes com cancro do ovário, muitas vezes complementado pelo CA 125. Também são observados aumentos noutros cancros ginecológicos e pulmonares. Podem surgir falsos positivos devido a insuficiência renal, efusões e doenças hepáticas (22).

➤ **CYFRA 21-I**

Fragmento da citoqueratina 19 expresso nalguns epitélios, constituindo um MT utilizado para o prognóstico e monitorização da eficácia da terapia em pacientes com cancros epiteliais, mesoteliomas e alguns linfomas e sarcomas. Observam-se falsos positivos devido a doenças hepáticas, insuficiência renal, várias doenças agudas e crónicas e doenças cutâneas sistémicas (20).



➤ **CgA II** (Cromogranina A II)

Glicoproteína armazenada e secretada juntamente com as catecolaminas da medula adrenal e sistema nervoso simpático. É utilizada para a monitorização de tumores neuroendócrinos como os feocromocitomas. Adicionalmente, podem ser detetadas elevações no cancro medular da tiroide e carcinoma do pulmão de células pequenas. Apesar de ter uma elevada sensibilidade, tem pouca especificidade diagnóstica e qualquer debilitação da função renal afeta a sua eliminação. Além disso, os falsos positivos podem ocorrer devido a hipertensão e várias doenças agudas e crónicas, pneumonia, sépsis, cardiopatias, gastrite atrófica e crónica, adenomas da hipófise, hiperparatiroidismo primário e tratamento com inibidores de bombas de prótons (20).

➤ **NSE** (Enolase Neuroespecífica)

Isoenzima glicolítica sintetizada principalmente por neurónios e células neuroendócrinas. É utilizada para o diagnóstico, estadiamento e monitorização de pacientes com cancros neuroectodermis como tumores carcinóides, neuroblastomas e carcinomas de células pequenas do pulmão. Para evitar falsos positivos, devem ser excluídas amostras hemolisadas devido à presença de outras isoformas da enolase nas hemácias. Para além disso, deve-se ter em conta condições clínicas como a insuficiência renal, patologias hepáticas e pulmonares, efusões, neuropatias, isquémia ou hemorragia cerebral (23).

➤ **ProGRP** (Pró-Peptídeo Libertador de Gastrina)

O GRP (Peptídeo Libertador da Gastrina) é um peptídeo expresso por células neuroendócrinas, inclusive do trato gastrointestinal, epitélio brônquico e sistema nervoso. A sua determinação no soro não é relevante devido ao seu curto tempo de meia vida na circulação sanguínea pelo que é doseado o ProGRP, o seu precursor biologicamente inativo. Elevados níveis de ProGRP nos fetos e o seu gradual declínio até a vida adulta demonstra o seu papel na estimulação do crescimento celular. É doseado juntamente com o NSE principalmente nos pacientes com tumores neuroendócrinos e carcinomas de células pequenas do pulmão. Podem ocorrer falsos positivos devido a insuficiência renal, doenças hepáticas e efusões (24).

➤ **SI00**

Proteína envolvida na apoptose, proliferação e diferenciação celular na presença de cálcio. É encontrada nas células do sistema nervoso central (SNC), melanócitos, tecido renal e músculo esquelético e cardíaco. É usada principalmente para o diagnóstico diferencial de melanomas e patologias dermatológicas benignas, bem como no estadiamento, prognóstico e monitorização do paciente oncológico. Tem elevada especificidade no soro, mas também são observados aumentos da sua concentração no fluido cérebroespinal após lesão do SNC. Podem surgir falsos positivos também devido a insuficiência renal, doenças hepáticas e gravidez (25).

➤ **CA 72-4** (Antigénio Hidrocarbonado 72-4)

Glicoproteína mucínica presente em vários tecidos epiteliais. É utilizada para o diagnóstico e monitorização de pacientes com neoplasias gastrointestinais, especialmente carcinomas gástricos, e menos frequentemente, cancro pulmonar, da mama e do ovário. Foram observados falsos positivos devido a tratamento com omeprazole, corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroides (20).

➤ **CA 15-3** (Antigénio Hidrocarbonado 15-3)

Glicoproteína mucínica encontrada principalmente em células mamárias neoplásicas. O CA 15-3 é o MT de eleição no carcinoma da mama, mas não é específico. Também pode ser usado como MT para carcinomas dos ovários, endometriais e pulmonares. Falsos positivos podem dever-se a doenças hepáticas, insuficiência renal, infeções respiratórias, doenças autoimunes e anemias megaloblásticas (20).

➤ **CA 125** (Antigénio Hidrocarbonado 125)

Glicoproteína mucínica presente nas estruturas derivadas dos ductos Müller e células mesoteliais. Por esta razão, é usada como MT para acompanhar pacientes com cancro do ovário, carcinomas endometriais e pulmonares. É importante realizar um diagnóstico diferencial porque as ascites são comuns nos pacientes com cancro do ovário e os derrames são uma das principais causas de falsos positivos. Idealmente, a determinação de CA 125 deveria ser realizada em mulheres pós-menopausa porque o pico ovulatório e a menstruação podem interferir com os resultados. Também se deve ter em atenção a presença de doenças hepáticas, insuficiência renal, síndrome nefrótica, infeções pulmonares, doenças ginecológicas e gravidez. Devido à limitada especificidade e sensibilidade do CA 125, o seu uso é complementado pelo HE4, outro marcador do cancro do ovário (26).

➤ **CA 19-9** (Antigénio Hidrocarbonado 19-9)

Glicoproteína mucínica expressa na superfície celular dos ductos pancreáticos, sistema biliar e células epiteliais do estômago, cólon, útero e glândulas salivares. É indicado para o prognóstico, monitorização terapêutica e deteção de recidivas dos carcinomas do trato digestivo, particularmente do pâncreas, bem como carcinomas mucinosos e carcinomas indiferenciados dos ovários. Assim, podem ocorrer falsos positivos devido a doenças gastrointestinais e hepáticas, insuficiência renal, colestase, pancreatite, doenças pulmonares benignas, endometriose, quistos ováricos e mucinosos, Este MT não é uma ferramenta útil de rastreio, mas tem sido usado como adjunto a estudos imagiológicos na determinação do potencial de ressecção de tumores pancreáticos. Também surgiu uma abordagem de deteção de carcinoma pancreático mais sensível que consiste no uso de CA 19-9 em conjunto sondas de DNA para o oncogene *k-ras*, expresso em mais de 90% dos carcinomas pancreáticos (20).

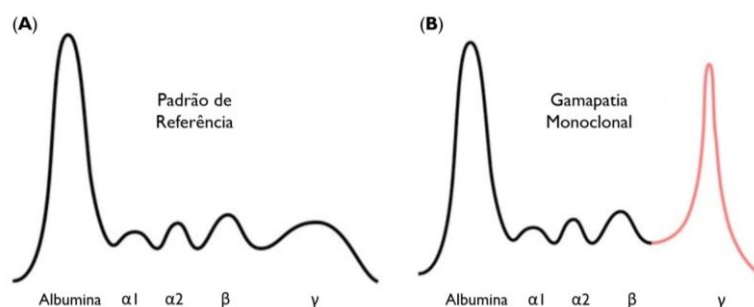
➤ **PSA** (Antigénio Específico da Próstata)

Enzima proteolítica sintetizada pela glândula prostática e secretada no líquido seminal onde tem uma função fluidificante associada à sua atividade enzimática. É o TM de eleição para o cancro da próstata, sendo de grande utilidade no rastreio, diagnóstico, estadiamento, avaliação do prognóstico e na deteção precoce de recidiva tumoral. O PSA circula ligado a proteínas inibidoras de proteases, permanecendo uma pequena fração no estado livre – o doseamento de ambas as formas auxilia no diagnóstico diferencial já que podem surgir falsos positivos devido outras patologias benignas da próstata, bem como devido a insuficiência renal, doenças hepáticas (20).

## Técnicas Eletroforéticas

A electroforese das proteínas séricas ou **proteínograma**, é uma técnica que permite a separação das proteínas de forma a obter padrões de bandas que permitem detetar alterações características de determinadas condições clínicas como a inflamação, síndrome nefrótica e Mieloma Múltiplo (Figura 11). A amostra do paciente é aplicada num gel de agarose em meio alcalino e a aplicação de corrente elétrica leva à migração das proteínas com base na sua carga elétrica e peso molecular. Proteínas carregadas mais negativamente e de menor tamanho migram mais em direção ao ânodo. Após eletroforese, o gel é corado com negro de amido para visualizar as bandas correspondentes a albumina, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas, beta-globulinas e gamaglobulinas. Estas bandas são identificadas qualitativamente visualmente e quantitativamente através de um *scanner* densitométrico. A concentração de cada fração proteica é calculada através da multiplicação das percentagens relativas pela proteína total (medida separadamente) na amostra (20).

As **imunofixações** são realizadas quando é detetado um pico monoclonal no proteínograma. Englobam a eletroforese, a imunoprecipitação com antissoros específicos e coloração com violeta ácido para identificar as classes de imunoglobulinas e cadeias kappa e lambda livres e ligadas presentes (20).



**Figura 11** – Representação esquemática de um perfil eletroforético padrão (A) e de uma Gamapatia Monoclonal (B) que auxilia no diagnóstico de Mieloma Múltiplo.

O **CQI** do Setor de Imunologia e Hormonologia é realizado diariamente em todos os parâmetros dos equipamentos automatizados usando um *software* da Bio-Rad que fornece uma análise estatística dos resultados obtidos de forma a assegurar a sua conformidade com os critérios definidos. Por outro lado, o **CQE** engloba a análise periódica de amostras enviadas pelo INSA a nível nacional e pelo RIQAS a nível internacional. Os controlos das técnicas manuais são realizados durante o processamento das amostras.

**Tabela 10** – Lista dos equipamentos no Setor de Imunologia e Hormonologia do SPC-IPOCFG, com o respectivo tipo de imunoensaio e parâmetros doseados.

<b>Equipamento</b> (Fornecedor)	<b>Metodologia</b>	<b>Parâmetros</b>
IMMULITE® 2000 XPi (Siemens Healthineers)	CLIA	AFP, B2M, CEA, Eritropoietina, Gastrina, hCG, hGH, IGF-I, Imunoglobulina estimuladora da tiroide, TPOA
ADVIA Centaur® XP (Siemens Healthineers)	CLIA	Androstenediona, CK-MB, Estradiol, Ferritina, FSH, HER-2/neu, hsTpl, LH, Mioglobina, NT-proBNP, Prolactina, PSA total e livre, PTH, Testosterona total, TSH, Vitamina D
B R A H M S KRYPTOR™ GOLD (Thermo Fisher Scientific)	TRACE™	CA 15-3, CgA II, NSE, Procalcitonina, SCCA
Cobas® 6000 + Cobas® e 601 (Roche)	ECLIA	Ácido Fólico, ACTH, Anticorpos anti-tiroglobulina, Anticorpos anti-receptor TSH, CA 125, CA 19-9, CA 72-4, Calcitonina, Cortisol total e livre (plasmático, urinário e salivar), CYFRA 21-1, DHEA-SO <sub>4</sub> , HE4, IgG e IgM anti- <i>Treponema pallidum</i> , Insulina, Interleucina 6, T3 total e livre, Osteocalcina, Peptídeo C, ProGRP, S100, T4 total e livre, Tiroglobulina, Vitamina B12
Atellica® NEPH 630 Analyser + BN ProSpec® System (Siemens Healthineers)	Nefelometria	α-1 Antitripsina, α-1 Glicoproteína Ácida, α-2 Macroglobulina, IgA, IgE total, IgG, IgM, Ceruloplasmina, Complementos C3c e C4, Cistatina C, Fator Reumatoide, FLC kappa e lambda, Haptoglobina, Homocisteína, Proteína C Reativa, sTfR, TASO, Transferrina
DS-iSYS Multi-Discipline Automated System (Immunodiagnostic Systems)	CLIA	Aldosterona e Renina plasmática (decúbito e ortostático), Testosterona livre, IgG e IgM anti-Toxoplasma, IgG e IgM anti-Vírus Epstein-Barr, Antígeno Precoce, Antígeno Viral da Cápside e Antígeno Nuclear, IgG e IgM anti-Vírus Herpes simplex 1 e anti-Vírus Herpes simplex 2, IgG e IgM anti-Rubéola
Optilite® (Binding Site)	Turbidimetria	FLC kappa e lambda, IgA e IgG kappa e lambda, IgD
ImmunoCAP™ + Phadia™ Laboratory Systems (Thermo Fisher Scientific)	FEIA	IgE específicas a alérgenos e biomarcadores de inflamação eosinofílica e ativação dos mastócitos
Hydrasis (Sebia) + Scanner EPSON® + Software Phoresis	Proteinograma e Imunofixação	Albumina, α-globulinas, β-globulinas e γ-globulinas, Isoenzimas da ALP, da hemoglobina e da LDH, Proteína de Bence Jones, FLC kappa e lambda
VIDAS® 3 (Biomérieux)	FEIA	Interferão gamma (INF-γ)
EUROIMMUN Analyser I-2P	ELISA	Ácido 5-hidroxiindolacético, Glucagina, IgG anti-SARS-CoV-2

Outros equipamentos incluem três arcas (duas a -80°C e uma a -60°C), cinco frigoríficos, um purificador de água, um banho térmico, uma balança de precisão, um contador de radiação gama, um medidor de pH, uma balança eletrónica, uma hotte, uma máquina de gelo, um leitor ELISA, 1 espectrofotómetro, agitadores e contentores para resíduos de risco.



## Caso Clínico I

O Hipoparatiroidismo é uma condição endócrina caracterizada por hipocalcemia e hiperfosfatemia que resultam de um déficit de PTH. Esta é uma hormona produzida pelas glândulas paratiroides, envolvida na regulação dos níveis de cálcio e fosfato no sangue, atuando quer por via direta no osso e no rim, quer por via indireta no intestino (27).

O exercício físico aumenta a demanda energética do organismo e afeta o metabolismo ósseo e mineral, particularmente o cálcio e fosfato, essenciais para a contração muscular, a sinalização neuromuscular e a biossíntese de ATP (28).

Jovem de 21 anos do sexo feminino queixa-se de fadiga, fraqueza muscular, uma sensação de “formigueiros” pelo corpo, vômitos e diarreia com dejeções líquido-pastosas há três dias. Foi diagnosticada com carcinoma papilar da tiroide em 2015 e realizou uma tireoidectomia total que causou um hipoparatiroidismo iatrogénico e paralisia de uma das cordas vocais. Foi tratada com iodo radioativo. Atualmente, a sua medicação inclui fármacos de reposição hormonal, suplementação de cálcio, hipotensores, diuréticos e anti-depressivos.

Tem antecedentes de hipertensão arterial, mas encontra-se normotensa. Ao exame físico verifica-se que tem obesidade e o abdómen difusamente doloroso. Relata realizar exercício físico intenso três vezes por semana há cerca de três meses e edema com sinal de Godet positivo nos membros inferiores há um mês. Os resultados das análises clínicas realizadas e as alterações observadas estão discriminadas abaixo.

**Tabela II** – Resultados do estudo hematológico da paciente do caso clínico I.

Parâmetro	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Leucócitos	8,4	4,0 - 11,0	10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	5,5	1,8 - 7,0	
Linfócitos	1,9	1,0 - 5,0	
Monócitos	0,7	0,1 - 1,2	
Eosinófilos	0,3	0,0 - 0,6	
Basófilos	0,1	0,0 - 0,2	
Eritrócitos	6,1	4,0 - 5,5	10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	14,5	12,0 - 16,0	g/dL
Hematócrito	42,5	35,0 - 47,0	%
Volume Globular Médio (VGM)	78,6	85,0 - 95,0	fL
Hemoglobina Globular Média (HGM)	26,3	27,0 - 32,0	pg
Concentração Média de Hemoglobina Globular (CHGM)	34,1	32,0 - 36,0	g/dL
Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW)	13,5	11,5 - 14,5	%
Plaquetas	358	140 - 400	10 <sup>3</sup> /μL
Volume Plaquetar Médio (VPM)	11,2	9,4 - 12,6	fL
Tempo de Protrombina (TP)	11,9	11 - 14,6	s
Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)	37,1	30 - 40	
INR	1,02	≤ 1,20	-

No hemograma (Tabela 11) verificou-se um pequeno aumento do número de eritrócitos, uma ligeira diminuição do VGM e HGM, e sem alterações relativas aos leucócitos e plaquetas. O TP e o TTPa estão dentro dos valores de referência. Este pode ser um caso de pseudo-eritrocitose hipocrômica e microcítica que resultou de hemoconcentração devido aos vômitos e diarreia, ou ainda uma compensação ao menor aporte de oxigênio resultante da dificuldade de entrada de ar provocada pela paralisia de uma das cordas vocais. Para esclarecer esta situação pode-se ainda dosear a eritropoietina, por exemplo, para compreender se a origem desta alteração é hormonal.

**Tabela 12** – Resultados bioquímicos da paciente do caso clínico 1.

Parâmetro	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Sódio	141	135 - 145	mmol/L
Potássio	4,2	3,5 - 5,1	
Cloro	104	95 - 107	
Cálcio Ionizado	<b>0,76</b>	1,14 - 1,29	mg/dL
Cálcio Total	<b>8,3</b>	8,6 - 10,5	
Fósforo	<b>7,2</b>	2,5 - 5,0	
Magnésio	25,1	16,0 - 26,0	
Glicose	88	70 - 115	
Ureia	19	10 - 50	
Creatinina	0,9	0,5 - 1,2	g/dL
Bilirrubina Total	0,4	≤ 1,2	
Proteína C Reativa	<b>1,83</b>	≤ 0,30	
Albumina	4,4	3,5 - 5,0	U/L
ALP	65	≤ 117	
AST	<b>62</b>	≤ 40	
ALT	<b>60</b>	≤ 40	
LDH	<b>838</b>	120 - 246	
Amilase	<b>43</b>	28 - 100	
CK Total	<b>1116</b>	0 - 145	
CK-MB	5,0	0,6 - 6,3	
hsTPI	3,71	Feminino ≤ 11,6	ng/mL
TSH	<b>70,10</b>	0,38 - 5,33	pg/mL
T4 livre	0,82	0,61 - 1,12	μU/mL
			ng/mL

Relativamente à bioquímica (Tabela 12), os valores da ureia e creatinina estão dentro do intervalo de referência, indicando que não está a decorrer uma disfunção renal. Apesar dos valores de AST e ALT estarem alterados, a albumina, a ALP e a bilirrubina total encontram-se dentro dos valores de referência, sugerindo que a função hepática não demonstra alterações significativas, podendo os valores das aminotransferases ter outra origem. Quanto aos eletrólitos, verifica-se uma hipocalcemia e hiperfosfatemia. Este desequilíbrio estará associado ao hipoparatiroidismo não controlado, causando as parestesias reportadas pela paciente. Os valores de cálcio poderão ter causado os vômitos e a diarreia. O aumento da atividade física diminui a concentração de cálcio sérico devido ao seu consumo pelos miócitos, situação que pode ter sido exacerbada pela perda de cálcio e dos fármacos de suplementação por via gastrointestinal.



Verifica-se um aumento da LDH, AST, ALT e CK total, ilustrando um processo de destruição celular. Em concordância, o aumento da Proteína C Reativa, uma proteína de fase aguda positiva, indica que está a decorrer inflamação. Como não se observam alterações nos marcadores cardíacos como a CK-MB e hsTPI, pode-se assumir que ocorreu rabdomiólise associada ao exercício físico intenso. Também se verifica que a TSH está aumentada e a T4 livre está dentro dos valores de referência, característico do Hipotireoidismo Subclínico.

O edema nos membros inferiores pode ter várias origens, de entre as quais a inflamação que aumenta a permeabilidade vascular, podendo levar a extravasamento de líquido para o espaço intersticial, ou pode ter uma origem medicamentosa, sendo, por exemplo, um dos efeitos adversos do fármaco usado para tratar a hipertensão. Não terá sido causado por diminuição da pressão oncótica do sangue considerado o aumento da osmolaridade que deverá ter ocorrido devido à destruição celular.

**Tabela 13** – Resultados microbiológicos da paciente do caso clínico I.

Parâmetro (Urina tipo II)	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Cor	<b>Âmbar</b>	-	-
Aspeto	<b>Turvo</b>		
Densidade	<b>1,030</b>	1,016 - 1,022	
pH	5,5	4,8 - 7,4	
Leucócitos	<b>45</b>	0 - 10	/µL
Eritrócitos	(-)	(-)	
Nitritos	(-)	(-)	-
Proteínas	<b>12</b>	0 - 10	mg/dL
Glicose	0	0 - 30	
Corpos Cetónicos	0	0 - 5	
Urobilinogénio	<b>1,1</b>	0 - 1	
Bilirrubina	0,1	0,0 - 0,2	
Células Epiteliais	<b>Muitas</b>	-	-
Leucócitos	<b>&gt; 20</b>		/campo
Eritrócitos	< 3		
Bactérias	(-)	(-)	-

A urina do tipo II e a análise microscópica do sedimento urinário (Tabela 13) revelou uma cor âmbar, um aspeto turvo, a presença de alguns leucócitos, raros eritrócitos, muitas células epiteliais de descamação, e vestígios de proteínas e urobilinogénio. Isto pode dever-se à citotoxicidade da mioglobina a nível renal, libertada pela destruição das células musculares.

A resposta endócrina do organismo à atividade física depende da sua duração, intensidade e do estado de saúde de um indivíduo. Assim, pacientes com Hipoparatiroidismo devem ser individualmente e especialmente acompanhados na decisão de iniciar uma rotina de exercício físico de forma a otimizar a sua qualidade de vida criando um plano adequado à sua clínica e adaptando a sua medicação.



## Caso Clínico 2

Paciente de 54 anos do sexo feminino relata dor abdominal intensa, espasmos generalizados, perda de mobilidade, passando a maior parte do tempo acamada, com desequilíbrio e queda quando se levanta e tenta caminhar. Em 2021, foi diagnosticada com cancro da mama e fez uma mastectomia direita. Recentemente foi diagnosticada com carcinoma do pâncreas pouco diferenciado, tendo iniciado quimioterapia.

Tem antecedentes de hipertensão arterial, mas encontra-se hipotensa. Ao exame físico, observa-se fragilidade clínica, perda de peso, lentificação psicomotora, edema bilateral dos membros inferiores com sinal de Godet positivo, movimentos esporádicos, ligeira distensão abdominal e uma coloração amarelada da pele.

A imagiologia revelou ascite e dilatação das vias biliares intra e extra-heptáticas. Os resultados das análises clínicas realizadas e encontram-se nas tabelas seguintes.

**Tabela 14** – Resultados do estudo hematológico da paciente do caso clínico 2.

Parâmetro	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Leucócitos	11,0	4,0 - 11,0	10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	<b>15,2</b>	1,8 - 7,0	
Linfócitos	3,0	1,0 - 5,0	
Monócitos	0,4	0,1 - 1,2	
Eosinófilos	0,0	0,0 - 0,6	
Basófilos	0,1	0,0 - 0,2	
Eritrócitos	<b>3,32</b>	4,0 - 5,5	10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	<b>9,7</b>	12,0 - 16,0	g/dL
Hematócrito	<b>28,7</b>	35,0 - 47,0	%
Volume Globular Médio (VGM)	86,6	85,0 - 95,0	fL
Hemoglobina Globular Média (HGM)	29,2	27,0 - 32,0	pg
Concentração Média de Hemoglobina Globular (CHGM)	33,7	32,0 - 36,0	g/dL
Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW)	14,4	11,5 - 14,5	%
Plaquetas	<b>438</b>	140 - 400	10 <sup>3</sup> /μL
Plaquetócrito	<b>0,39</b>	0,16 - 0,35	%
Distribuição do Tamanho das Plaquetas (PDW)	<b>16,5</b>	9,8 - 16,1	fL
Volume Plaquetar Médio (VPM)	<b>9,0</b>	9,4 - 12,6	
Tempo de Protrombina (TP)	<b>16,9</b>	11 - 14,6	s
Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)	<b>24,2</b>	30 - 40	
INR	<b>1,43</b>	≤ 1,20	-

A neutrofilia observada no hemograma (Tabela 14) pode estar associada à inflamação decorrente da neoplasia pancreática, a uma infeção ou a certos medicamentos. A anemia normocrómica normocítica verificada, na presença de trombocitose, pode ser associada a hemorragia, já que é libertada trombopoetina durante reações de fase aguda. As alterações nos testes de coagulação também podem dever-se a inflamação.

**Tabela 15** – Resultados bioquímicos da paciente do caso clínico 2.

Parâmetro	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Sódio	<b>134</b>	135 - 145	mmol/L
Potássio	<b>4,5</b>	3,5 - 5,1	
Cloro	<b>109</b>	95 - 107	
Cálcio Ionizado	<b>1,05</b>	1,14 - 1,29	mg/dL
Cálcio Total	<b>7,7</b>	8,6 - 10,5	
Fósforo	<b>4,1</b>	2,5 - 5,0	
Magnésio	<b>24,7</b>	16,0 - 26,0	
Ácido Úrico	<b>3,4</b>	3,1 - 8,5	
Glicose	<b>100</b>	70 - 115	
Ureia	<b>149</b>	10 - 50	
Creatinina	<b>1,4</b>	0,5 - 1,2	
Bilirrubina Total	<b>12,2</b>	≤ 1,2	
Bilirrubina Direta	<b>9,6</b>	≤ 0,3	
Proteína C Reativa	<b>14,80</b>	≤ 0,30	g/dL
Albumina	<b>4,5</b>	3,5 - 5,0	
ALP	<b>1207</b>	≤ 117	U/L
AST	<b>89</b>	≤ 40	
ALT	<b>57</b>	≤ 40	
Gamaglutamiltransferase	<b>962</b>	≤ 49	
LDH	<b>253</b>	120 - 246	
Procalcitonina	<b>1,65</b>	≤ 0,50	ng/mL
CEA	<b>28,0</b>	≤ 5,0	
CA 19.9	<b>432,9</b>	≤ 37,0	U/mL
CA 72.4	<b>148,1</b>	≤ 6,9	

Relativamente à bioquímica (Tabela 15), verificam-se alterações insignificantes relativas ao sódio e cloro. O aumento dos valores da ureia e creatinina sugerem que está a decorrer uma disfunção renal, o que pode explicar a anemia já que os rins são responsáveis pela produção de eritropoietina.

A hipocalcemia observada terá causado os espasmos e dificuldades psicomotoras reportadas pela paciente e pode ser justificada pelo papel endócrino dos rins na homeostase mineral. Sendo um dos órgãos efetores da paratormona, a disfunção renal causará a diminuição da reabsorção de cálcio a nível renal. Sendo o cálcio essencial para a coagulação sanguínea, a hipocalcemia também pode explicar as alterações no coagulograma.

O aumento da LDH, AST e ALT sugere um processo de destruição celular com envolvimento hepático. Em conformidade, o aumento da Proteína C Reativa indica que está a decorrer inflamação, que juntamente com o aumento da procalcitonina, aponta para uma bacteriemia associada a sépsis.

A função hepática também demonstra alterações já que a bilirrubina, a fosfatase alcalina e a  $\gamma$ -GT estão aumentadas, o que pressupõe um processo colestático, frequente em pacientes com cancro pancreático, confirmado pelo exame imagiológico. A albumina encontra-se dentro dos valores de referência, pelo que a função de síntese hepática não estará comprometida.

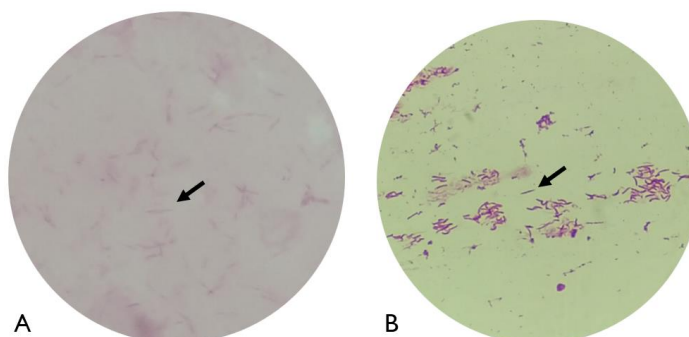
Neste contexto, o edema e a ascite também resultam da neoplasia do pâncreas, monitorizada através de marcadores tumorais como o CEA, CA 19-9 e CA 72-4.

**Tabela 16** – Resultados microbiológicos da paciente do caso clínico 2.

Parâmetro (Urina tipo II)	Resultado	Intervalo de Referência	Unidades
Cor	Âmbar	-	-
Aspeto	Turvo		
Densidade	1,030	1,016 - 1,022	
pH	5,5	4,8 - 7,4	
Leucócitos	75	0 - 10	/µL
Eritrócitos	(-)	(-)	
Nitritos	(+)	(-)	-
Proteínas	15	0 - 10	mg/dL
Glicose	30	0 - 30	
Corpos Cetônicos	5	0 - 5	
Urobilinogénio	4	0 - 1	
Bilirrubina	3	0,0 - 0,2	
Células Epiteliais	Algumas		-
Leucócitos	> 20	-	/campo
Eritrócitos	< 3		
Bactérias	(+)	(-)	-

A avaliação da urina do tipo II e a análise microscópica do sedimento urinário (Tabela 16) revelou uma cor âmbar, um aspeto turvo e respetiva elevada densidade, um aumento de proteínas, urobilinogénio e bilirrubina, o que está em concordância com a colestase e subsequente icterícia observada. Também se observaram muitos leucócitos, algumas células epiteliais e nitritos. Por outro lado, a cultura bacteriológica da urina revelou-se negativa, discordante com a leucocitúria, presença de nitritos e bactérias na urina. Por esta razão, o exame cultural e sumária de urina foram confirmados por duplo ensaio com a mesma amostra.

Esta situação podia justificar-se com uma colheita de urina contaminada com fluido vaginal, com a entrega da amostra de urina colhida noutra dia ou a antibioterapia prévia à colheita. No entanto, a hemocultura de sangue periférico positivou pouco depois. Após a coloração de Gram do esfregaço de sangue, observaram-se bacilos Gram negativo compridos ao microscópio (Figura 12), posteriormente identificados como *Fusobacterium nucleatum*. Esta bacteriémia explica a Urocultura negativa, já que esta bactéria é anaeróbia fastidiosa.



**Figura 12** – Imagens de microscopia ótica (objetiva x100) de *Fusobacterium nucleatum* (setas) obtidas a partir de esfregaços de sangue de hemocultura (A) e colónias de meio de cultura (B) após coloração de Gram. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC-IPOCFG)

*Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria comensal na cavidade oral, ausente ou raramente detetada noutras zonas do corpo em condições normais, mas é considerada um patógeno emergente. É um dos agentes etiológicos da doença periodontal e pode causar infeções oportunistas graves se não for tratada adequadamente. É recomendada antibioterapia combinada de um  $\beta$ -lactâmico e um antibiótico contra bactérias anaeróbias como o Metronidazol ou a Clindamicina (29).

Já foi associada a várias patologias e sabe-se que promove respostas inflamatórias e tem a capacidade de ligar e/ou invadir vários tipos celulares. Tem um carácter tumorigénico, sendo considerada uma oncobactéria porque cria um microambiente que potencia uma proliferação celular descontrolada, contribuindo para a sua instabilidade genómica e evasão imunológica (29).

Neste sentido, está principalmente associada a cancro colorretal, mas também já foram encontradas espécies de *F. nucleatum* no tecido de tumores pancreáticos, o que reportadamente confere um pior prognóstico, podendo servir como um biomarcador para avaliar a evolução deste tipo de neoplasia (30).

## **Conclusão**

As Análises Clínicas são imprescindíveis a um diagnóstico, prevenção, tratamento e monitorização clínica adequados. A realização deste estágio foi fundamental para a consolidação e aplicação prática dos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado de Análises Clínicas. O contacto com a realidade profissional também me permitiu compreender a gestão de um laboratório clínico, sendo também uma oportunidade para refletir sobre o mérito e responsabilidade incumbida nos profissionais de saúde perante um doente.

## Bibliografia

- (1) Liga Portuguesa Contra o Cancro – **Sobre o Cancro**. [Acedido a 5 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ligacontracancro.pt/>
- (2) IPO Coimbra – **Institucional**. [Acedido a 5 de junho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ipocoimbra.min-saude.pt/>
- (3) BADRICK, Tony – **The quality control system**. The Clinical Biochemist Reviews, 2008. 29 Suppl 1, S67–S70
- (4) MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C. – **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6ª Ed. St. Louis, MO, USA: Elsevier Saunders, 2019. ISBN 9780323482127
- (5) SMITH, Heidi R.; BROWN, Alfred E. – **Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology**. 14ª Ed. New York, NY, USA: McGraw-Hill Education, 2017. ISBN 9781259705236
- (6) MORELLO, Josephine A.; GRANATO, Paul A.; MIZER, Helen E. – **Laboratory Manual and Workbook in Microbiology: Applications to Patient Care**. 7ª Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2002. ISBN 0072463546
- (7) MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. – **Medical Microbiology**. 8ª Ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2015. ISBN 9780323299565
- (8) PROCOP, Gary W. et al. – **Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7ª Ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health, 2017. ISBN 9781469829401
- (9) KIRN, T.J.; WEINSTEIN, M.P. – **Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret**. Clinical Microbiology and Infection, 2013. 19(6), 513–520
- (10) KIM, Sohn.; COVINGTON, April; PAMER, Eric G. – **The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens**. Immunological Reviews, 2017. 279: 90-105
- (11) REYGAERT, Wanda C. – **An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bactéria**. AIMS Microbiology, 2018. 4(3): 482–501
- (12) VAN DUINA, David; DOIB, Yohei – **The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence**, 2016. 8(4):00-00
- (13) Infarmed – **Medicamentos de uso humano**. [Acedido a 23 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/>
- (14) DELVES, Peter J. – **Fundamentos de Imunologia**. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. ISBN 9788527721424



- (15) KRICKA L.J.; PARK, J.Y. – **Assay Principles in Clinical Pathology**. In: MCMANUS, Linda M.; MITCHELL, Richard N. – Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2014. ISBN 9780123864567, páginas 3207-3221
- (16) WILD, David – **The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques**. 4<sup>a</sup> Ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2013 ISBN 9780080970370
- (17) Thermo Fisher Scientific – **KRYPTOR Analysers: TRACE Technology**. [Acedido a 3 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.brahms.de>
- (18) LING, Morris; MURALI, Mandakolathur – **Antinuclear Antibody Tests**. Clinics in Laboratory Medicine, 2019. 39(4)
- (19) FARIA, S. C. et al. – **Tumor markers: myths and facts unfolded**. Abdominal Radiology, 2018. 44(4):1575-1600
- (20) MCPHERSON Richard A.; PINCUS Matthew R. – **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 24<sup>a</sup> Ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2021 ISBN 9780323673204
- (21) ZHU, Huange – **Squamous Cell Carcinoma Antigen: Clinical Application and Research Status**. Diagnostics, 2022. 12(5), 1065
- (22) SPEECKAERT, Marijn M.; SPEECKAERT, Reinhart; DELANGHE, Joris R. – **Human Epididymis Protein 4 in Cancer Diagnostics: A Promising and Reliable Tumor Marker**. Advances in Clinical Chemistry, 2013. 59:1-21
- (23) ISGRÒ, Maria Antonietta; BOTTONI, Patrizia; SCATENA, Roberto – **Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects**. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015. 867:125-143
- (24) WOJCIK, Ewa; KULPA, Jan Kanty – **Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) as a biomarker in small-cell lung cancer diagnosis, monitoring and evaluation of treatment response**. Lung Cancer: Targets and Therapy, 2017. 8:231–240
- (25) ALLGÖWER, Chantal et al. – **Friend or Foe: S100 Proteins in Cancer**. Cancers, 2020. 12(8):2037
- (26) BOTTONI, Patrizia; SCATENA, Roberto – **The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects**. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015. 867:229-244

- (27) BONAVOLONTÀ, V. et al. – **Which physical activity in patients affected by hypoparathyroidism? A review of the literature and practical recommendations.** Journal of Endocrinological Investigation, 2022. 45:1289–1295
- (28) LOMBARDI, Giovanni et al. – **Physical Activity-Dependent Regulation of Parathyroid Hormone and Calcium-Phosphorous Metabolism.** International Journal of Molecular Sciences, 2020. 21(15):5388
- (29) BRENNAN, Caitlin A.; GARRETT, Wendy S. – ***Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium.** Nature Reviews Microbiology, 2018. 17(3):156-166
- (30) MITSUHASHI, Kei et al. – **Association of *Fusobacterium* species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis.** Oncotarget, 2015. 6:7209-7220