



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês de Figueiredo e Sousa Pimentel Carranca

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

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

Setembro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Inês de Figueiredo e Sousa Pimentel Carranca

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

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

Estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E, no período entre 17 de janeiro e 15 de julho de 2022

Abordagem às áreas clínicas de Microbiologia e Imunologia e Hormonologia, com referência sucinta a Bioquímica e Hematologia

Setembro de 2022

Agradecimentos

Às Professoras Doutoradas Ana Miguel e Bárbara Rocha, coordenadoras do Mestrado em Análises Clínicas, por toda a dedicação e preocupação com os alunos durante estes dois anos de mestrado.

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela disponibilidade e orientação na execução deste relatório de estágio.

Ao Doutor Luís Nina pela oportunidade de realizar o estágio no serviço de Patologia Clínica do IPOCFG.

Aos orientadores de cada setor do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG, à Dra. Ana Catarina da Bioquímica, ao Dr. Jorge Reis da Hematologia, ao Dr. Nuno Cunha, Dr. Jorge Pimenta e Dra. Sofia Carreiro da Imunologia e Hormonologia, e à Dra. Maria Alexandre e Dr. Nuno Gonzaga da Microbiologia por todos os conhecimentos transmitidos, pelo acompanhamento e ajuda durante estes 6 meses. Com especial agradecimento à Dra. Maria Alexandre, à Dra. Sofia Carreiro e ao Dr. Nuno Cunha pela disponibilidade na correção e revisão do texto.

Aos meus pais, por todo o apoio, dedicação e motivação em todo o meu percurso.

Aos meus avós por todo o carinho e dedicação.

Aos meus colegas do mestrado, especialmente à Anastasiya que partilhou esta experiência comigo.

E por último, aos meus amigos, por estarem sempre lá para mim, especialmente ao André e à Inês.

Obrigado!

Índice

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 Introdução.....	1
2 Caracterização do Laboratório	2
3 Bioquímica.....	3
4 Hematologia.....	5
5 Microbiologia.....	7
5.1 A importância da Fase Pré-analítica.....	7
5.2 Exame direto e técnicas de coloração	8
5.3 Meios de cultura e inoculação.....	10
5.4 Colheita, Transporte e Processamento das Amostras.....	13
5.4.2 Sangue.....	15
5.4.3 Cateteres intravenosos.....	16
5.4.4 Biópsias	17
5.4.5 Exsudatos purulentos.....	17
5.4.6. Fezes.....	18
5.4.7. Exsudato vaginal e Exsudato uretral.....	19
5.4.8 Secreções Respiratórios	20
5.4.9. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	22
5.4.10. Líquidos orgânicos	23
5.4.11. Raspados de Fâneros.....	23
5.5 Identificação e métodos de suscetibilidade a antimicrobianos	23
5.5.1 Provas Clássicas	24

5.5.2	Identificação Definitiva e Antibiograma	25
5.5.3	Método de difusão em disco e E-teste	27
5.5.4	Pesquisa de mecanismos de resistência	27
5.5.5	Biologia molecular	30
6	Imunologia E Hormonologia.....	31
6.1	Amostras e o seu percurso	31
6.2	Princípios dos imunoenaios	33
6.2.1	Imunoenaios Competitivos	33
6.2.2	Imunoenaios não competitivos – ou <i>sandwish</i>	34
6.3	Métodos de deteção de imunocomplexos.....	34
6.3.1	Quimiluminescência (CLIA).....	34
6.3.2	Eletroquimiolumeniscência (ECLIA)	35
6.3.3	Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)	35
6.3.4	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	36
6.3.5	Nefelometria e Imunoturbidimetria	37
6.3.6	Radioimunoenaios (RIA) e Imunorradiométricos (IRMA)	37
6.4	Marcadores Tumorais	38
6.4.1	Antigénios Oncofetais	39
6.4.2	Hormonas	40
6.4.3	Glicoproteínas.....	40
6.4.4	Glicoproteínas do grupo das mucinas.....	41
6.4.5	Enzimas	42
6.4.6	Citoqueratinas.....	43
6.4.7	Proteínas.....	43
6.4.8	Metabolitos	46
6.5	Métodos Eletroforéticos	47
6.5.1	Eletroforese das proteínas séricas (EPS) – Proteínograma.....	48
6.5.2	Imunofixação (IF)	49

6.5.3 Pesquisa da proteína de Bence-jones na urina.....	49
7 Virologia.....	50
8 Controlo de Qualidade.....	50
8.1 Controlo de qualidade Interno (CQI)	50
8.2 Controlo de qualidade Externo (CQE)	50
9 Caso Clínico	52
10 Conclusão	57
Referências Bibliográficas.....	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Cocos Gram positivo corados pela coloração de Gram.....	9
Figura 2 - Bacilos Gram Negativo corados pela coloração de Gram.....	9
Figura 3 - Células leveduriformes coradas pela coloração de Gram.....	9
Figura 4 - BAAR corados pela coloração de Kinyoun.....	10
Figura 5 - Técnica de esgotamento do produto na superfície do meio.....	10
Figura 6 - Sementeira Semiquantitativa.....	10
Figura 7 - Teste de suscetibilidade à Optoquina.....	25
Figura 8 - Pesquisa de mecanismos de resistência: ESBL (A), Carbapenemases (B) e AmpC (C), pelo método de difusão em disco no meio de MHE.....	28
Figura 9 - Esquema do percurso das amostras pelos diferentes equipamentos presentes no Setor de Imunologia e Hormonologia do SPC do IPOCFG.....	32
Figura 10 - Imunoensaio competitivo.....	33
Figura 11 - Imunoensaio não competitivo.....	34
Figura 12 - Imunoensaio de Quimioluminescência.....	34
Figura 13 - Imunoensaio de Eletroquimioluminescência.....	35
Figura 14 - Imunoensaio de TRACE.....	36
Figura 15 - Imunoensaio de ELISA.....	36
Figura 16 - Ensaio de nefelometria e Turbidimetria.....	37
Figura 17 - Radioimunoensaio.....	37
Figura 18 - Perfil eletroforético das proteínas séricas.....	48
Figura 19 - Alterações no perfil eletroforético das proteínas séricas numa situação de gamopatia monoclonal.....	49
Figura 20 - Esquema do processamento da amostra.....	53

Índice de Tabelas

Tabela I - Equipamentos do Setor de Bioquímica do SPC.....	4
Tabela II - Equipamentos do Setor de Hematologia do SPC	6
Tabela III - Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia do SPC com respectiva classificação.....	11
Tabela IV - Critérios de Murray-Washington para avaliar a qualidade de uma expectoração. 20	
Tabela V - Interpretação de esfregaços para pesquisa de BAAR pela coloração de Kinyoun.21	
Tabela VI - Cartas de identificação VITEK, microrganismos identificados por cada carta e respectiva densidade necessária para a suspensão	25
Tabela VII - Cartas de TSA VITEK e respectivos microrganismos a que se destinam.....	26
Tabela VIII - Resultados da Urina Tipo II.....	52
Tabela IX - Antibiograma.....	54

Abreviaturas

5-HIAA – Ácido 5-Hidroxiindolacético, do inglês *5-Hydroxyindoleacetic Acid*

AAG – Alfa 1-Glicoproteína Ácida, do inglês *Alpha-1-Acid-Glycoprotein*

AAT – Alfa-1-antitripsina

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*

AFP – Alfa Fetoproteína

ATCC – *American Type Culture Collection*

BAAR – Bacilo Ácido-Álcool Resistente

BAAF – Biópsia Aspirativa de Agulha Fina

BHI – *Brain Heart Infusion*

BMG – β 2-Microglobulina

C3 – Fator 3 do Complemento

C4 – Fator 4 do Complemento

CA 15.3 – Glicoproteína 15.3, do inglês *Carbohydrate Antigen 15.3*

CA 19.9 – Glicoproteína 19.9, do inglês *Carbohydrate Antigen 19.9*

CA 72.4 – Glicoproteína 72.4, do inglês *Carbohydrate Antigen 72.4*

CA 125 – Glicoproteína 125, do inglês *Carbohydrate Antigen 125*

CAM – *Campylobacter agar*

CDC – *Anaerobe Agar + 5% Sheep Blood*

CEA – Antígeno Carcinoembrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*

CGA – Cromogranina A

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CK-MB – Creatina Cinase MB

CLED – *Cistine Lactose Electrolyte Deficient*

CLIA – Ensaio Químioluminescente, do inglês *Chemiluminescent Immuno Assay*

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CMV – Citomegalovirus

CNA – *Colistin and Nalidixic Acid agar*

CO₂ – Dióxido de Carbono

COMT – Catecol O-Metiltransferase

COS – *Columbia agar + 5% Sheep Blood*

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DHEA – Dehidroepiandrosterona

EBV – Epstein-Barr Vírus

ECLIA – Ensaio

Eletróquimioluminescente, do inglês *Electrochemiluminescent Immuno Assay*

EDTA-K₃ – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Tripotássio, do inglês

Ethylenediaminetetraacetic Acid Tripotassium

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPS – Eletroforese de Proteínas Séricas

ESBL – β -Lactamases de Espectro

Alargado, do inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamase*

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FISH – Hibridização *In Situ* por Fluorescência, do inglês *Fluorescence In situ Hybridization*

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

HAE – *Haemophylus*

HbA1c – Hemoglobina Glicosilada

HCG – Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*

HE-4 – Proteína Epididimal Humana 4, do inglês *Human Epididymis Protein 4*

HER-2 – Recetor do fator de crescimento epidermal humano, do inglês *Human Epidermal growth factor Recetor 2*

HKT –Hektoen

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HSV – Herpes Simplex Vírus

HVA – Ácido Homovalilmandélico

IF – Imunofixação

IgA – Imunoglobulina A

IgD – Imonoglobulina D

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I, do inglês *Insulin-like Growth Factor I*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-6 – Interleucina 6

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPOCFG – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

ITU – Infecção do Trato Urinário

KCS – Meio Líquido *Schaedler*

KOH – Hidróxido de Potássio

KV –*Kanamycin-Vancomycin*

LBA – Lavado Broncoalveolar

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LJ – *Löwenstein Jensen*

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

MBL – Metalo-β-Lactamases

MCK –*MacConkey*

MGIT – Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias, do inglês *Mycobacteria Growth Indicator Tube*

MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado, do inglês *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MHE – Meio Mueller-Hinton E

MHF – Meio Mueller-Hinton *Fastidious*

MM – Mieloma Múltiplo

MRSA – *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

NaCL – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NSE – Enolase Neuro Específica, do inglês *Neuron Specific Antigen*

PBPs – Proteínas de Ligação à Penicilina

PCR – Proteína C Reativa

PNAEQ – Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

PTH – Paratormona

PSA – Antígeno Específico da Próstata, do inglês *Prostatic Specific Antigen*

PVX –PolyViteX

RIA – Radioimunoensaio

RIQAS –*Randox International Quality Assesement Scheme, External Quality Assesement*

RT-PCR – Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real, do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*

SCC – Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas, do inglês *Squamous Cell Carcinoma*

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

SCS – *Schaedler + 5% Sheep Blood agar*

SGC2 – *Sabouraud Gentamicin and Cloranphenicol*

SNC – Sistema Nervoso Central

SPC – Serviço de Patologia Clínica

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TG – Tiroglobulina

TRACE – *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

TSA – Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

TSDT – Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica

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

TSI – Imunoglobulina Estimuladora da Tiróide, do inglês *Thyroid-Stimulating Immunoglobulin*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VCS – Volume, Condutividade, Dispersão de Luz, do inglês *Volume, Conductivity and Scatter*

VMA – Ácido Vanilmandélico, do inglês *Vailmandelic Acid*

VS – Velocidade de Sedimentação

XLD – Xilose-Lisina-Desoxicolato

Resumo

O presente relatório reflete todos os conhecimentos adquiridos e atividades realizadas durante o estágio curricular realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil de 17 de janeiro a 15 de julho de 2022, no âmbito da unidade curricular Estágio/Projeto do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Este estágio teve como objetivo a aplicação e consolidação de conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do referido mestrado.

As Análises Clínicas integram um diagnóstico multidisciplinar, sendo uma ferramenta essencial para uma correta avaliação do doente. São fundamentais no diagnóstico, prognóstico e monitorização da doença e da terapêutica, quer seja em meio hospitalar quer seja em meio comunitário. Assim, o rigor e qualidade dos resultados são imprescindíveis nesta área da saúde. Estas características são garantidas pelo controlo de qualidade e por uma interpretação cuidadosa dos resultados atendendo, quando possível, à história clínica do doente.

Com a inovação tecnológica cada vez mais é possível a obtenção de resultados fidedignos através de técnicas mais sensíveis e mais específicas.

Neste relatório são abordadas com maior detalhe as áreas de Microbiologia e Imunologia, sendo esta última focada nos Marcadores Tumoriais. É feita uma breve referência às áreas de Hematologia, Bioquímica e Virologia, é caracterizado o laboratório onde foi realizado o estágio e também é destacado a importância do controlo de qualidade num Laboratório de Análises Clínicas.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Microbiologia, Imunologia, Marcadores Tumoriais e Diagnóstico.

Abstract

This report reflects all the knowledge acquired and activities carried out during the curricular internship held at the Serviço de Patologia Clínica of the Portuguese Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil from January 17 to July 15, 2022, within the scope of the Estágio/Projeto of the Master's Degree in Clinical Analysis at the Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. This internship aimed at the application and consolidation of theoretical-practical knowledge acquired during the aforementioned master's degree.

Clinical Analysis integrates a multidisciplinary diagnosis, being an essential tool for a correct evaluation of the patient. They are fundamental in the diagnosis, prognosis and monitoring of the disease and therapy, whether in a hospital environment or in a community environment. Thus, the rigor and quality of the results are essential in this area of health. These characteristics are guaranteed by quality control and by a careful interpretation of the results, taking into account, whenever possible, the clinical history of the patient.

With technological innovation, it is increasingly possible to obtain reliable results through more sensitive and more specific techniques.

In this report, the areas of Microbiology and Immunology are addressed in greater detail, the latter being focused on Tumor Markers. A brief reference is made to the areas of Hematology, Biochemistry and Virology, the laboratory where the internship took place is characterized and the importance of quality control in a Clinical Analysis Laboratory is also highlighted.

Keywords: Clinical Analysis, Microbiology, Immunology, Tumor Markers and Diagnosi

I Introdução

A área das análises clínicas faz parte do grupo de áreas que auxiliam no diagnóstico médico. Assim, apesar de ser fundamental, todos os resultados obtidos têm de ser integrados com as outras áreas e com a história clínica. sendo cada vez mais necessário a intercomunicação dos diferentes profissionais de saúde em prol do doente.

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, surge da transformação de células normais em células tumorais num processo de vários estágios que geralmente progride de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno. Essas mudanças são o resultado da interação entre os fatores genéticos e agentes externos. Atualmente, entre 30 e 50% dos cancros podem ser prevenidos evitando fatores de risco e implementando estratégias de prevenção e deteção precoce, já que muitos tumores têm grande chance de cura se diagnosticados precocemente e tratados adequadamente.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas foi realizado no Laboratório do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil sob orientação do Dr. Luís do Espírito Santo Nina e com uma duração de 6 meses, de janeiro a julho de 2022.

Tive a oportunidade de integrar a rotina dos diferentes setores que constituem o SPC e ainda de acompanhar a colheita das amostras colhidas em regime ambulatorio. Em cada setor além de acompanhar o percurso e processamento das amostras e de realizar técnicas manuais, ainda acompanhei a manutenção dos equipamentos, o controlo de qualidade interno e externo e a validação de resultados analíticos.

As áreas que vou desenvolver neste relatório são a Microbiologia e Imunologia, destacando os marcadores tumorais na área da Imunologia.

2 Caracterização do Laboratório

A história do IPOCFG tem início em 1953 com a aquisição de uma pequena vivenda, com o objetivo de criar um centro anticanceroso que desse resposta à população da zona centro do país. A sua atividade começou em 1962 e desde então a instituição não tem parado de crescer e sempre com o objetivo da excelência do bem cuidar o doente oncológico, considerando-se uma instituição de referência para os cidadãos que serve.

A direção técnica do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do IPOCFG é da responsabilidade do Dr. Luís do Espírito Santo Nina, médico especialista em Patologia Clínica. A equipa que integra o SPC do IPOCFG é constituída por Médicos especialistas em Patologia Clínica, Farmacêuticos, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) e Assistentes Técnicos e Operacionais.

Fisicamente, o espaço possui a receção e área administrativa, sala de espera, salas de colheitas, sala de lavagens, arrumos, gabinete médico, sala do diretor técnico, sala polivalente e salas para os diferentes setores. que integram o SPC: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Hormonologia e Virologia.

O fluxo de utentes diários é de 400 a 500. De modo a contribuir para a rastreabilidade das amostras, a cada utente é atribuído um número do dia, constituído por 9 algarismos, sendo os primeiros 4 a data de colheita e os últimos 3 o número da amostra.

As amostras que são analisadas no SPC podem ser colhidas pelos TSDT. A colheita de sangue venoso pode ser feita no ambulatório ou no internamento, sendo que no ambulatório há prioridade para utentes em cadeiras de rodas, macas, diabéticos e colheitas urgentes. A colheita e transporte de urina, fezes, expectoração e saliva é, geralmente, da responsabilidade do doente. Amostras como sangue arterial para gasometria e Biopsia Aspirativa de Agulha Fina (BAAF) necessitam de uma colheita invasiva que é realizada por um médico. Colheitas de alguns produtos biológicos para exames microbiológicos podem ser feitas por médicos ou enfermeiros, consoante o tipo de amostra.

As amostras devem ser identificadas com o nome completo do utente, número do processo individual, número do dia da amostra e em alguns casos, a acompanhar o produto biológico dever estar a requisição dos exames pretendidos.

No caso de determinações que o SPC não realize, a amostra é enviada para um laboratório referenciado.

3 Bioquímica

No setor de bioquímica tive a oportunidade de integrar a rotina do laboratório desde a receção de amostras até ao controlo de qualidade.

A avaliação automatizada dos parâmetros bioquímicos permite avaliar a função renal, hepatobiliar, pancreática e o equilíbrio eletrolítico, assim como as vias metabólicas associadas aos diferentes órgãos fornecendo informação que auxilia no acompanhamento do doente pelos clínicos. O produto biológico usado para a grande parte das determinações é o soro, obtido por centrifugação a 3000 R.P.M durante 10 minutos de sangue venoso colhido para tubos com esferas de sílica ativadoras da coagulação.

O soro é, então, analisado pelo autoanalisador *Atellica CH Analyzer* da **Siemens Healthineers**[®], que realiza a determinação da maioria dos parâmetros bioquímicos, por diferentes métodos (enzimáticos, químicos, potenciometria) usando a espectrofotometria e a potenciometria para fazer a leitura. Para além do soro, este equipamento determina parâmetros bioquímicos em alíquotas de urina de 24 horas, líquido cefalorraquidiano e outros líquidos orgânicos, com destaque para o líquido ascítico. A determinação da hemoglobina glicada (HbA1C) é realizada em sangue total com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Tripotássio (EDTA-K₃).

Os Analisadores de gases no sangue, *ABL 800 FLEX* da **Radiometer**[®], que usam potenciometria direta para avaliar os gases, metabolitos, eletrólitos e oximetria no sangue total venoso e arterial, fazem também a quantificação do cálcio ionizado (livre) em sangue total colhido para umas seringas especiais que contém um agitador magnético e anticoagulante, e gasometrias em sangue arterial cuja colheita é feita por um clínico.

Os equipamentos *RAPIDChem 744 Analyzer* da **Siemens Healthineers**[®] e *Reflotron Plus* da **Roche Diagnostics**[®] servem de apoio, sempre que necessário, na confirmação de resultados de ionograma e resultados dos parâmetros medidos por espectrofotometria, respetivamente, obtidos no autoanalisador.

Na tabela I estão representados os equipamentos presentes no setor de Bioquímica e a respetiva função.

Neste setor ainda são realizadas técnicas manuais, qualitativas e semi-quantitativas, que assentam, na sua maioria, em reações antigénio-anticorpo, cujos resultados são passíveis de serem lidos e interpretados macroscopicamente, sendo que geralmente a aglutinação representa um resultado positivo e a não aglutinação um resultado negativo, em algumas

técnicas cujo resultado seja positivo é necessário determinar o título, através de diluições sucessivas.

Tabela I - Equipamentos do Setor de Bioquímica do SPC

Equipamento	Parâmetros
<i>Atellica CH Analyzer</i> da Siemens Healthineers [®]	Parâmetros Bioquímicos
<i>ABL 800 FLEX</i> da Radiometer [®]	Ca ²⁺ livre
	Gasometria
<i>RAPIDChem 744 Analyzer</i> da Siemens Healthineers [®]	Confirmação de resultados obtidos no <i>Atellica CH Analyzer</i> da Siemens Healthineers [®]
<i>Reflotron Plus</i> da Roche Diagnostics [®]	

4 Hematologia

No setor de Hematologia é efetuada a determinação de parâmetros hematológicos em diferentes amostras e produtos biológicos.

A amostra mais comum é o sangue total venoso colhido para um tubo que contém EDTA-K₃, amostra na qual se realiza o hemograma, a contagem diferencial da linha celular branca e contagem de reticulócitos. Estas determinações são realizadas através do analisador hematológico *DxH 900 Analyzer* da **Beckman Coulter**[®], que usa o Princípio de Coulter ou Impedância elétrica, a tecnologia VCS (Volume condutividade e dispersão da luz) para fazer a contagem diferencial da linhagem branca, dando origem ao histograma, permitindo a visualização das diferentes populações de leucócitos, e a espectrofotometria para a determinação da hemoglobina.

No sangue total anticoagulado com EDTA-K₃ determina-se a velocidade de sedimentação (VS) no *Test 1 BCL* da **ALIFax**[®] que usa a Fotometria Capilar Quantitativa, permitindo obter o resultado, expresso em mm/hora. No caso de haver volume insuficiente, procede-se à determinação manual da VS através de uma pipeta graduada de *Westergreen*.

Em casos que é necessário confirmar os valores do hemograma, de fazer contagem diferencial das células brancas ou a pesquisa de células anómalas ou características de doenças hematológicas, é realizado um esfregaço de sangue periférico para avaliação microscópica. Este é feito manualmente com o sangue total anticoagulado com EDTA K3, posteriormente corado automaticamente pelo *Aerospray Hematology Pro Cytocentrifuge* da **Wescor**[®], que usa a coloração Wright-Giemsa, sendo depois observado ao microscópio ótico. Com a observação microscópica é ainda possível pesquisar a presença de parasitas.

Consoante pedido do médico é realizada a pesquisa do gene de fusão BCR ABL por *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) no *Gene Xpert* da **Cepheid**[®] usando o lisado obtido a partir de uma amostra de sangue total em EDTA-K₃. Este estudo é feito com o objetivo de monitorizar e avaliar do tratamento e determinar o prognóstico de doentes com Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Neste setor é ainda realizada a pesquisa de alterações genéticas por Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH).

A segunda amostra mais frequente é sangue total colhido para um tubo com citrato de sódio 9:1, que é centrifugada a 3000 r.p.m durante 10 minutos com o objetivo de obter um plasma pobre em plaquetas, diminuindo a sua interferência na avaliação da hemóstase. De seguida, as amostras são introduzidas no *ACL TOP 350* da **Werfen**[®], onde vão ser realizadas

as provas de coagulação, doseamento dos fatores da coagulação e estudo da presença do inibidor lúpico, que têm por base a formação de um coagulo que é detetado por turbidimetria.

A este setor também chegam aspirados e esfregaços de medula óssea. Acolheita é realizada por um médico hematologista, algumas lâminas são coradas automaticamente pela coloração de Wright-Giemsa para a avaliação da celularidade da medula óssea e de outros parâmetros e outras lâminas são coradas manualmente pela coloração de Perls com o objetivo de avaliar as reservas de ferro nos eritroblastos.

No setor de Hematologia, faz-se estudos de imunofenotipagem em diferentes produtos biológicos, desde sangue total, aspirados de medula óssea até biopsias de gânglios e de outros tecidos. A imunofenotipagem realiza-se através de citometria de fluxo pelo *Cytomics FC500* da **Beckman Coulter**[®].

Na tabela II estão descritos quais parâmetros cada equipamento presente no setor determina.

Tive a oportunidade de participar no dia-a-dia do setor de hematologia, na receção das amostras, no encaminhamento destas para os respetivos equipamentos, realização de esfregaços sanguíneos e observação microscópica dos mesmos e de esfregaços de medula óssea, e realização da preparação da amostra para a pesquisa do gene de fusão BCR ABL por RT-PCR.

Tabela II - Equipamentos do Setor de Hematologia do SPC

Equipamento	Parâmetros
<i>DxH 900 Analyzer</i> da Beckman Coulter [®]	Hemograma
	Contagem diferencial de leucócitos
	Contagem de reticulócitos
	Contagem de Plaquetas
<i>Test I BCL</i> da ALIFax [®]	Velocidade de Sedimentação Globular
<i>ACL TOP 350</i> da Werfen [®]	Estudos de hemostase
<i>Cytomics FC500</i> da Beckman Coulter [®]	Imunofenotipagem por citometria de fluxo
<i>GeneXpert</i> da Cepheid [®]	RT-PCR

5 Microbiologia

O laboratório de Microbiologia clínica desempenha um papel importante no diagnóstico e controlo de doenças infecciosas, já que o estudo dos microrganismos é fundamental para a descoberta de novos agentes infecciosos e novas formas de transmissão de doenças e para o desenvolvimento de vacinas e fármacos.

No entanto, esse papel é dependente da qualidade da amostra, do seu transporte, do paciente até ao laboratório, e das técnicas disponíveis para a identificação do microrganismo na amostra. Como a maioria dos testes diagnósticos se baseiam na capacidade de crescimento do microrganismo, as condições de transporte devem garantir a sua viabilidade e a amostra deve ser representativa do local da infeção (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

A interação entre um microrganismo e o hospedeiro humano é complexa, podendo resultar numa colonização transitória, numa relação simbiótica de longo prazo ou doença. A virulência do organismo, o local de exposição e a capacidade do hospedeiro de responder ao organismo determinam o resultado dessa interação. Assim, estes fatores devem ser considerados na terapêutica. (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

5.1 A importância da Fase Pré-analítica

O diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas requer que a amostra apropriada seja colhida e entregue o mais rapidamente possível ao laboratório, num meio de transporte apropriado e processada de forma a maximizar a probabilidade de deteção dos microrganismos. Assim, caso a colheita seja feita pelo doente, é fundamental fornecer informações sobre como deve proceder. O clínico deverá fornecer informação sobre o estado clínico do paciente, para que haja a seleção de testes mais adequados ao diagnóstico correto.

A fase pré-analítica é de elevada importância num laboratório de Microbiologia. Assim na receção das amostras é realizada a verificação da correta identificação da amostra e a avaliação da sua qualidade. A amostra deve ser acompanhada pela respetiva requisição, a qual indica os exames a realizar, a identificação do doente e do médico, a data da colheita, origem do produto e ainda informações clínicas relevantes. O cumprimento dos requisitos de qualidade da amostra é fundamental, devendo-se recusar amostras cuja qualidade é duvidosa. Entre os critérios de rejeição das amostras está o volume insuficiente, amostra não identificada ou com discrepância entre a identificação na requisição e no produto, recipiente inadequado ou em contentor visivelmente conspurcado (Fonseca *et. al.*, 2004).

5.2 Exame direto e técnicas de coloração

O exame direto ao microscópico de produtos clínicos é utilizado para detetar células bacterianas, elementos fúngicos e estruturas parasitárias (ovos, larvas ou formas adultas). As propriedades morfológicas características podem ser usadas para a identificação preliminar da maioria das bactérias e são usadas para a identificação definitiva de fungos filamentosos e parasitas.

Na microscopia de campo claro, a ampliação total da imagem é o produto das ampliações das lentes da objetiva e ocular. A ampliação de 10x é usada para uma observação geral da amostra, a de 40x é usada para procurar microrganismos de maiores dimensões, como parasitas e fungos filamentosos, e a objetiva de imersão em óleo de 100 x permite observar bactérias, leveduras e detalhes morfológicos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016). Os microrganismos devem ser corados para que possam ser observados neste tipo de microscopia já que, os microscópios de campo claro têm um poder de resolução menor quando comparados com outras técnicas de microscopia (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

A preparação da amostra para exame direto a fresco pode ser uma suspensão em água ou solução salina ou mistura com hidróxido de potássio (KOH) para dissolver o material, por exemplo no caso de cabelo, pele e unhas (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

O exame microscópico direto é muito útil porque fornece informações rápidas, como a qualidade da amostra, indicação do processo infeccioso envolvido e permite correlacionar os isolados bacterianos obtidos em cultura com os tipos de microrganismos observados no esfregaço, podendo alertar para a presença de organismos adicionais que não crescem nas culturas de rotina, como os anaeróbios, e pode indicar a necessidade de testes adicionais (Mahon e Lehman, 2019).

Coloração de Gram

A coloração de Gram é a coloração mais realizada num laboratório de microbiologia. Esta coloração constitui a base para a classificação fenotípica das bactérias, separando-as em dois principais grupos: bactérias Gram positivo e Gram negativo.

A coloração de Gram consiste na fixação do esfregaço e a adição de quatro componentes sequenciais: o cristal violeta (corante primário), iodo (mordente), álcool ou uma solução de álcool-acetona (descolorante) e fucsina diluída (corante secundário) (Mahon e Lehman, 2019).

A estrutura da parede celular determina as características de coloração de Gram de uma espécie. As bactérias são inicialmente coradas de roxo pelo cristal violeta, que se liga à parede celular com o auxílio do iodo. As bactérias Gram positivo pela sua camada espessa de peptidoglicano retêm o complexo violeta de genciana – mordente, quando expostas ao álcool, ficando coradas de roxo (Figura 1), o que não ocorre com bactérias Gram negativo. Estas, devido à sua camada fina de peptidoglicano não retêm este complexo, sendo posteriormente coradas de rosa com o segundo corante, a safranina (Figura 2) (Li, 2020).

Células epiteliais, glóbulos brancos, eritrócitos e material de fundo amorfo, também é corado, apresentando a cor rosa, leveduras podem ser coradas com este método ficando coradas de roxo (Figura 3) (Mahon,2019; Murray,2016).

Coloração de Kinyoun

As micobactérias são difíceis de corar devido à presença, na sua parede celular, de grandes quantidades de lípidos, os ácidos micólicos, moléculas hidrofóbicas que afetam a permeabilidade da parede celular (Mahon e Lehman, 2019). Assim, o uso da coloração de Gram tradicional é de pouco ou nenhum valor, uma vez que os corantes geralmente não entram na parede das micobactérias. Os métodos mais utilizados para corar as micobactérias são as colorações de carbolfucsina (Kinyoun ou Ziehl-Neelsen), sendo métodos mais rápidos para a detecção de micobactérias, porém não substituem a cultura (Garcia, 2010).

Os métodos convencionais de coloração ácido-resistente, Ziehl-Neelsen e Kinyoun, usam carbolfucsina como corante primário, que cora os bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) de vermelho (Figura 4), o álcool ácido como diferenciador e um corante secundário, o azul de metileno, que cora de azul as células descoradas pelo diferenciador. A coloração de Ziehl-Neelsen requer aquecimento da amostra durante o procedimento de coloração e por este motivo muitos laboratórios, como é o caso do

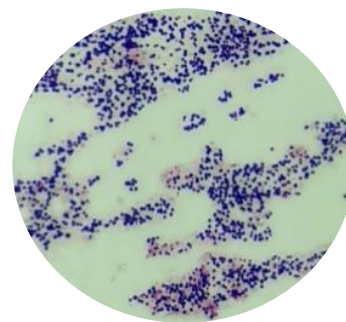


Figura 1 - Cocos Gram positivo corados pela coloração de Gram. (Fonte: Setor de Microbiologia do

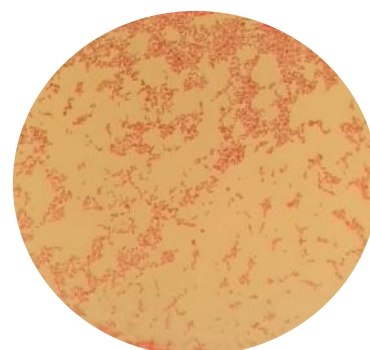


Figura 2 - Bacilos Gram Negativo corados pela coloração de Gram. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG)

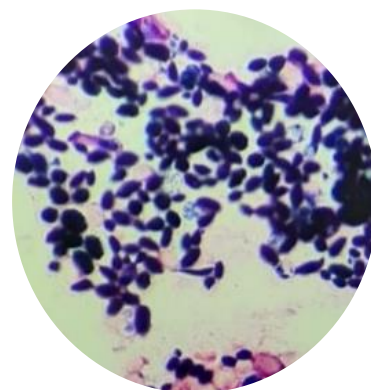


Figura 3 - Células leveduriformes coradas pela coloração de Gram. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG)

laboratório de Microbiologia do SPC, substituíram este método pelo corante ácido-resistente a frio - método Kinyoun (Mahon e Lehman, 2019). Os esfregaços são preparados diretamente a partir de amostras clínicas e de amostras digeridas, descontaminadas e concentradas. As lâminas são examinadas ao microscópio ótico usando a objetiva de imersão em óleo (X100). É necessário visualizar o esfregaço completo, já que na presença de apenas um bacilo, o teste é considerado positivo.

5.3 Meios de cultura e inoculação

Os meios de cultura podem ser: meios enriquecidos, que suportam o crescimento da maioria dos organismos, sem requisitos de crescimento exigentes; meios seletivos, suplementados com inibidores que impedem o crescimento de microrganismos indesejados; meios diferenciais aos quais são adicionadas substâncias específicas que permitem a identificação de um microrganismo numa mistura (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

O método de inoculação de um meio varia com o tipo de amostra e com o exame pretendido. As amostras podem ser inoculadas por esgotamento do produto na superfície do meio de cultura (Figura 5), por sementeira semiquantitativa (Figura 6) ou por inundação (Mahon e Lehman, 2019).

As condições de incubação, como a temperatura e atmosfera são determinadas pelo tipo de amostra e pelos microrganismos que possam estar presentes (Mahon e Lehman, 2019). A maioria das culturas de bactérias são incubadas a 37°C. Os anaeróbios não podem crescer na presença de oxigênio e requerem uma atmosfera anaeróbia, para isso são usados sacos com saquetas com reagentes que reduzem rapidamente a concentração de oxigênio no interior do saco; este sistema de sacos também é usado para bactérias microaerófilas e capnófilas.

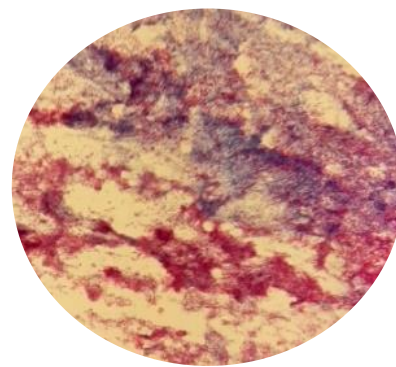


Figura 4 - BAAR corados pela coloração de Kinyoun. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG)

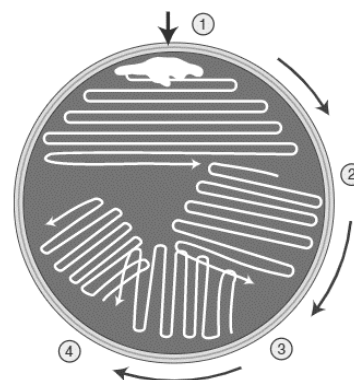


Figura 5 - Técnica de esgotamento do produto na superfície do meio. (Adaptada de: Textbook of Diagnostic Microbiology)

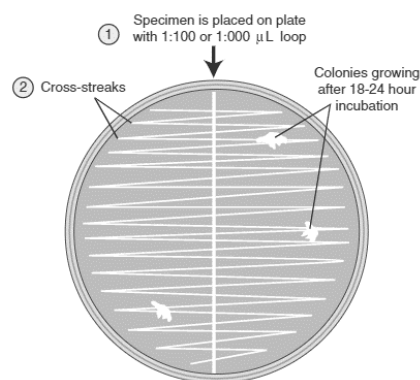


Figura 6 - Sementeira Semiquantitativa. (Adaptada de: Textbook of Diagnostic Microbiology)

Os meios usados no Setor de Microbiologia do SPC e a sua respetiva classificação estão representados Tabela III.

Tabela III - Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia do SPC, com respetiva classificação

Meio de Cultura	Classificação	Observações
Gelose Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro (COS)	Não seletivo	Adequado para a cultura de vários microrganismos; a adição do sangue a 5% permite fornecer o fator X (Hemina) e permite a deteção e classificação da atividade hemolítica.
Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	Não seletivo	Meio de isolamento que permite o crescimento de espécies exigentes como <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .; é composto por uma base nutritiva enriquecida em fatores X (Hemina) e V (NAD).
Gelose de sangue para anaeróbios (CDC)	Não seletivo	Meio útil para o isolamento de anaeróbios exigentes, em particular para o isolamento de cocos Gram-positivo anaeróbios.
Gelose Schaedler + 5% de sangue de carneiro (SCS)	Não seletivo	Utilizado para o isolamento de bactérias anaeróbias.
Caldo Brain Heart Infusion (BHI)	Enriquecimento	Meio líquido de nutritivo, não seletivo, para o enriquecimento de microrganismos em geral, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos em amostras clínicas.
Caldo Schaedler + Vitamina K3 (KCS)	Enriquecimento	Usado para o enriquecimento de microrganismos anaeróbios fastidiosos.
Gelose Mueller-Hinton (MHE)	Não seletivo	Meio útil para testar a suscetibilidade bacteriana a agentes antimicrobianos; este meio suporta o crescimento da maioria das bactérias.
Gelose Mueller-Hinton 5% sangue de cavalo + 20mg/l de β -NAD (Fastidious) (MHF)	Não seletivo	Meio usado para realizar TSA de microrganismos fastidiosos que necessitam dos fatores X(hemina) e V (NAD)
Gelose deficiente em eletrólitos com cistina e lactose (CLED)	Não seletivo e diferencial	Utilizado na diferenciação e contagem de bactérias na urina; pela deficiência em eletrólitos impede a proliferação indevida (<i>swarming</i>) de espécies de <i>Proteus</i> spp.; permite a diferenciação de fermentadores e não fermentadoras da lactose pela presença de lactose e do azul de bromotimol com indicador de pH.
Gelose Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro + Colistina + Ácido Nalidíxico (CNA)	Seletivo	Meio seletivo para bactérias Gram positivo, especialmente estafilococos e estreptococos; os antibióticos adicionados inibem a flora Gram negativa; permite a deteção e classificação da hemólise.
Gelose MacConkey (MCK)	Seletivo e diferencial	Meio seletivo para Enterobactérias e outros bacilos Gram negativo; os sais biliares e o cristal violeta inibem a maioria dos organismos Gram positivos; os fermentadores da lactose produzem

		colónias rosa ou vermelhas devido ao indicador de pH vermelho neutro; os não fermentadores de lactose produzem colónias incolores ou transparentes.
Caldo Selenito F	Enriquecimento e seletivo	Utilizado no enriquecimento e isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.. Com capacidade de inibir o crescimento de coliformes e outras espécies da flora entérica e promover o crescimento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.
Caldo GN	Enriquecimento e seletivo	O caldo GN permite o enriquecimento seletivo de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> a partir de amostras de fezes e alimentos
Gelose Hektoen (HKT)	Seletivo e diferencial	Usado para o isolamento direto de patógenos entéricos a partir de fezes e para o isolamento indireto a partir de caldos de enriquecimento seletivos.
Gelose Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD)	Seletivo e diferencial	Usado para isolar <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. de fezes; o desoxicolato de sódio inibe cocos Gram positivo e alguns bacilos Gram negativo; o meio contém três açúcares (sacarose e lactose e xilose) permitindo a distinção entre fermentadores e não fermentadores; o vermelho de fenol serve como indicador de pH e o tiosulfato de sódio atua como uma fonte de enxofre a partir da qual os organismos podem produzir sulfureto de hidrogénio (H ₂ S), que se combina com citrato férrico amoniacal para produzir sulfureto ferroso, um precipitado preto; <i>Salmonella</i> spp. e a <i>Shigella</i> spp. produzem colónias características, <i>Salmonella</i> spp. produz colónias vermelhas com centro preto, e <i>Shigella</i> spp. colónias vermelhas.
Gelose Schaedler Kanamicina-Vancomicina + 5% de sangue de carneiro ia (KV)	Seletivo	Usa como meio de base o meio Schaedler e é suplementado com kanamicina e vancomicina; a kanamicina inibe os bacilos Gram negativo anaeróbios facultativos e várias outras bactérias facultativas, enquanto que a vancomicina inibe as bactérias Gram positivo; a adição destes agentes antimicrobianos torna o meio selectivo para os anaeróbios estritos Gram negativo como por exemplo <i>Bacteroides</i> spp..
Gelose <i>Campylobacter</i> (CAM)	Seletivo	Meio seletivo para <i>Campylobacter</i> spp..
Gelose <i>Haemophilus</i> (HAE)	Seletivo	Meio seletivo para o isolamento de <i>Haemophilus</i> spp..
Sistema de tubo indicador de crescimento micobacteriano (MGIT) - caldo <i>Middlebrook 7H9</i>	Seletivo	O oxigénio presente no meio estéril extingue a fluorescência; o crescimento bacteriano consome o oxigénio, observando-se fluorescência quando o tubo é exposto à luz UV; para inibir o crescimento de não-micobactérias, são adicionados agentes antimicrobianos.
Meio Löwenstein-Jensen (LJ)	Seletivo	Meio usado para a recuperação de <i>Mycobacterium</i> spp.; a seletividade deste meio baseia-se na presença de verde de

		malaquite e sais minerais que inibem o crescimento da maioria dos organismos contaminantes; o crescimento das micobactérias é promovido pelos nutrientes adicionados, incluindo ovo.
Gelose <i>Sabouraud</i> com Gentamicina e Cloranfenicol (SGC2)	Seletivo	Utilizado para o isolamento e cultura de fungos leveduriformes e filamentosos.
Sistema Mycoline (Sabouraud/Sabouraud + actidiona)	Seletivo	Este sistema possui dois meios, um é o meio de <i>Sabouraud</i> com gentamicina e cloranfenicol e o outro é o meio <i>Sabouraud</i> com cloranfenicol e actidiona; este último promove o crescimento de dermatofitos.

5.4 Colheita, Transporte e Processamento das Amostras

A seleção, colheita e transporte apropriados das amostras são essenciais para que os resultados laboratoriais estabeleçam um diagnóstico correto e um tratamento adequado. Existem princípios básicos de colheita de amostras fundamentais para garantir o processamento adequado das amostras, como por exemplo, sempre que possível, a colheita deve ser realizada durante a fase aguda da infecção e antes da administração de antibióticos. O local anatômico, técnica e quantidade devem ser adequados para minimizar a contaminação com a microbiota normal (Mahon e Lehman, 2019).

5.4.1 Urina

A urina é uma das amostras mais frequentemente submetidas para cultura, já que as infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas mais comuns, ocorrendo com mais frequência em mulheres. Outros grupos de risco para ITU incluem idosos, mulheres grávidas, pacientes que fizeram transplante renal, pacientes com cateteres e pacientes com anormalidades do trato geniturinário (Mahon e Lehman, 2019).

As infecções do trato urinário podem ser distinguidas, por localização, em superior e inferior. As infecções superiores envolvem o parênquima renal (pielonefrite) ou os ureteres (ureterite), enquanto as infecções inferiores envolvem a bexiga (cistite), a uretra (uretrite) e, nos homens, a próstata (prostatite) (Mahon e Lehman, 2019).

Pacientes hospitalizados desenvolvem infecções do trato urinário com mais frequência em comparação com pacientes do ambulatório, já que há maior probabilidade de cateterização do trato urinário e maior incidência de anormalidades anatômicas ou funcionais do trato genitourinário (Mahon e Lehman, 2019). Estas infecções são as infecções hospitalares mais comuns, estando 95% delas relacionados com o cateterismo vesical. Em um paciente

cateterizado, o risco de adquirir infecção depende da duração do cateterismo, dos cuidados apropriados com o cateter e da suscetibilidade do hospedeiro (Mahon e Lehman, 2019).

Os microrganismos mais comuns causadores de infecções do trato urinário são enterobacterias como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (Fonseca et. al., 2004).

A colheita de urina é feita normalmente pelo utente, devendo ser colhido o jato intermédio da primeira urina da manhã, para que se possa obter uma amostra mais concentrada e representativa da bexiga. Devido à variedade de bactérias que coloniza a uretra, a primeira porção de urina coletada por micção ou cateterização deve ser descartada. A colheita de urina também pode ser realizada através de punção de cateter urinário, punção supra-púbica e drenagem de nefrostomia/ureterostomia.

Urocultura

As amostras de urina são inoculadas através de um isolamento semiquantitativo, no qual é usada uma ança calibrada para fornecer um volume específico de urina (1 µl). Os meios de cultura nos quais a amostra é semeada são o CLED, CNA, MCK e se for pedido pelo clínico exame micológico também é inoculado um meio SGC2 (*Sabouraud* com gentamicina e cloranfenicol). Os meios são incubados a 37° C durante 24 a 48 horas. O meio CLED é usado para realizar a contagem de microrganismos, sendo que a urocultura se considera positiva para valores iguais ou superiores a 10⁵ UFC/ ml. Quando a contagem apresenta valores entre 10⁴ e 10⁵ UFC/ ml deve-se avaliar a história clínica e histórico de infecções do trato urinário, porque consoante a situação clínica do paciente a contagem pode ser valorizada. Amostras com mais do que três tipos de colónias em que nenhuma delas tenha contagem igual ou superior a 10⁵ são consideradas polimicrobianas, sugerindo contaminação e, portanto, é pedido nova colheita. Em amostras cuja colheita se realizou através de punção supra-púbica ou cateter urinário, qualquer tipo de crescimento microbiano é valorizado, excluindo microrganismos comensais da pele. A seguir à contagem e respetiva valorização, procede-se à identificação do microrganismo e realização do antibiograma.

Sumária de Urina

A análise sumária de urina ou urina tipo II, consiste na avaliação macroscópica, microscópica e bioquímica da amostra.

A avaliação macroscópica da urina corresponde à observação da cor e aspeto da amostra. A determinação de parâmetros bioquímicos como a densidade, pH, leucócitos,

nitritos, proteínas, glucose, corpos cetônicos, urobilinogênio, bilirrubina e eritrócitos é realizada através de tiras reativas *Combur* que estão impregnadas com reagentes que permitem a análises semi-quantitativa destes parâmetros, sendo que a presença de leucócitos e nitritos positivos sugerem infecção do trato urinário. Para a avaliação microscópica do sedimento urinário uma alíquota de 10 ml de amostra é centrifugada a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, e o sedimento é observado ao microscópio, entre lâmina e lamela, podendo-se observar células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cristais e microrganismos. A presença de células epiteliais em abundância pode traduzir uma má colheita da amostra.

5.4.2 Sangue

Bacteriemia é a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea. Infecções com risco de vida causadas por bacteremias são uma preocupação em pacientes hospitalizados, estando frequentemente associadas à cateterização (Mahon e Lehman, 2019).

A infecção sistêmica por qualquer microrganismo pode causar sépsis, que na maioria dos casos fatais envolve bactérias Gram negativo, já que a membrana externa das bactérias Gram negativo contém lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que estimula a resposta inflamatória.

Os microrganismos mais comuns são enterobactérias, como *Escherichia coli*, alguns anaeróbios como *Bacteroides* spp., e bactérias ambientais como *Pseudomonas aeruginosa* (Nester *et. al.*, 2012).

A maioria dos pacientes sépticos tem menos de um microrganismo por mililitro de sangue, logo, recuperação cultural desses microrganismos requer a inoculação de um grande volume de sangue em caldos de enriquecimento (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

A colheita é realizada através de punção venosa, com a devida desinfecção do local de punção, passo que é determinante para o sucesso da análise. A septicemia pode ser contínua ou intermitente, a septicemia contínua ocorre principalmente em pacientes com infecções intravasculares, já a septicemia intermitente ocorre em pacientes com infecções localizadas (por exemplo, pulmões, trato urinário, tecidos moles). Assim, o momento da colheita de sangue não é importante para pacientes com septicemia contínua, mas pode ser importante para pacientes com septicemia intermitente (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

Para realizar a análise, o sangue venoso é colhido através de duas venopunções diferentes com o objetivo de inocular duas garrafas para aerobiose e duas garrafas para anaerobiose. As garrafas contêm meio de cultura que permite a recuperação de microrganismos e, no caso das garrafas para aerobiose, possuem esferas de resina com função

quelantes de antibióticos que possam ter sido administrados antes da colheita. O exame bacteriológico compreende inoculação das garrafas em aerobiose e anaerobiose, enquanto que o exame micológico é realizado apenas utilizando as garrafas de aerobiose.

As garrafas de hemocultura são colocadas no equipamento que as monitoriza, agita e incuba continuamente, o BD BACTEC™ 9020. É um sistema automatizado que deteta o crescimento de microrganismos através da deteção de fluorescência emitida por um sensor de dióxido de carbono (CO₂) presente nos frascos com meio de cultura. O tempo de incubação para o exame bacteriológico é de 7 dias e para o exame micológico de 14 dias, ao fim dos quais se não se detetar crescimento de microrganismos, o resultado é dado como negativo.

No caso de uma hemocultura positiva, faz-se um esfregaço para exame direto com coloração de Gram, e faz-se a inoculação num meio COS no caso de positivar apenas a hemocultura em aerobiose. No caso de positivar a hemocultura em anaerobiose, são semeados o meio COS e os meios de anaerobiose (SCS, KV e CDC).

Perante uma hemocultura positiva o sistema Accelarate Pheno™ é usado. É uma técnica de Hibridização in Situ de fluorescência (FISH) para identificar o microrganismo e realizar a análise morfocinética, obtendo-se um antibiograma em algumas horas. Apesar desta técnica não ser usada como identificação definitiva, dá um resultado preliminar ao clínico, podendo assim avançar para a terapêutica.

5.4.3 Cateteres intravenosos

O envio de cateter para exame bacteriológico só é aconselhado se existirem sinais de infeção relacionadas com o cateter (Fonseca *et. al.*, 2004).

Para ser processado, o cateter deve ter 5 cm. É usada a técnica de Maki, técnica de cultura semiquantitativa na qual o cateter é rodado sobre a superfície de uma placa de ágar COS. A recuperação de mais de 15 colónias no meio COS associado ao mesmo microrganismo isolado em hemocultura é sugestiva de infeção relacionada ao cateter, se o paciente apresentar sinais e sintomas clínicos e não houver outra fonte do microrganismo além do dispositivo médico (Mahon e Lehman, 2019). Após a inoculação do meio COS pela técnica de Maki, o cateter é colocado num meio líquido, BHI, com posterior repicagem para COS.

5.4.4 Biópsias

As biópsias são maceradas com NaCl 0-9% num vidro de relógio. Para o exame bacteriológico são inoculados os meios sólidos COS e PVX, os meios líquidos BHI e KCS e é realizado um esfregaço para posterior coloração de Gram. Caso o clínico requirite o exame micológico também é feito uma sementeira em dois meios de *Sabouraud*, sendo um incubado a 37° C e o outro a 30°C. Se o exame micobacteriológico for pedido, realiza-se um esfregaço para posterior coloração de Kinyoun e a amostra é armazenada para posterior descontaminação e inoculação em meio de MGIT e LJ. Também pode ser solicitado a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* por biologia molecular que é feita através de RT-PCR.

5.4.5 Exsudatos purulentos

Uma grande variedade de microrganismos que residem na pele e nas mucosas do corpo, bem como aqueles encontrados no ambiente, podem causar infeções de pele e tecidos moles. Os agentes mais comuns causadores de infeções de pele e tecidos são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias, estreptococos beta-hemolíticos e uma variedade de anaeróbios. A infeção pode ser causada por mais de um microrganismo.

Amostras obtidas por agulha e seringa ou por biópsia com agulha fina são as melhores para a cultura microbiológica (Garcia, 2010). Feridas abertas e drenantes podem estar, frequentemente, contaminadas com organismos potencialmente patogénicos não relacionados ao processo infeccioso específico. Portanto, é muito importante colher amostras do fundo da ferida após a limpeza da superfície. A colheita recorrendo-se ao uso de zaragatoas é de evitar, pois é difícil obter uma amostra representativa sem contaminação com organismos que colonizam a superfície (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

Os exsudatos purulentos são classificados como superficiais ou profundos, consoante o local anatómico de onde são colhidos e o tipo de ferida. Por exemplo uma ferida resultante de uma cirurgia é considerada um exsudato purulento profundo, enquanto uma lesão aberta da pele processa-se como um exsudato purulento superficial.

Estes produtos são semeados nos meios sólidos COS, PVX, HAE e SGC2 e nos meios líquidos BHI e KCS e é realizado um esfregaço para coloração de Gram. Os meios líquidos não são inoculados quando a amostra foi colhida através de zaragatoa. No caso de exsudatos purulentos profundos transportados em anaerobiose poder-se-á ainda fazer a pesquisa de anaeróbios.

5.4.6. Fezes

A amostra de escolha para a detecção de patógenos gastrointestinais são as fezes. Se houver suspeita de infecção bacteriana, três amostras devem ser colhidas, uma por dia durante 3 dias. Se houver suspeita de parasitas, a colheita de três amostras deve ser realizada em dias alternados num espaço de 10 dias para que a probabilidade de encontrar estruturas parasitárias aumente (Mahon e Lehman, 2019).

O processamento deste tipo de amostra começa com o exame macroscópico, avaliando o aspeto e cor, já que pode ser útil para direcionar a escolha dos testes a realizar.

Exame bacteriológico

Para o exame bacteriológico são inoculados os meios sólidos XLD e Hektoen, e os meios líquidos GN e Selenito F. Depois de 24 horas de incubação a 37° C os meios líquidos são repicados para os meios sólidos XLD e Hektoen. As bactérias *Salmonella* e *Shigella* produzem doenças gastrointestinais em humanos, e nenhuma destas espécies pertencem à microbiota normal do trato gastrointestinal.

Salmonella spp. é um bacilo, Gram negativo e anaeróbio facultativo. Em meios seletivos e diferenciais produzem colónias vermelhas/salmão e não fermentam a lactose. Colónias com centros pretos são observadas se o meio contiver indicadores para a produção de H₂S, como é o caso do XLD e Hektoen (Mahon e Lehman, 2019).

Shigella spp. não fermenta a lactose e como esta bactéria não produz H₂S, em meios como XLD e Hektoen distingue-se de *Salmonella* spp..

Assim, o resultado do exame bacteriológico é negativo para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., se nos meios sólidos só se observarem colónias lactase positiva (amarelas no XLD e amarela a salmão no Hektoen). Caso se observem colónias lactase negativa (vermelhas no XLD e verde no Hektoen) com ou sem centro negro é de valorizar e procede-se a identificação e respetivo TSA. A valorização de leveduras apenas ocorre na ausência de crescimento bacteriano.

Através de teste imunocromatográfico, o laboratório faz a pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Clostridium difficile*, esta última só deve ser realizada em fezes diarreicas e no caso de positividade segue-se a confirmação por PCR que identifica o gene que codifica a toxina B. No caso de positivo para *Campylobacter* spp., a amostra é semeada no meio *Campylobacter*, um meio de cultura seletivo para esta bactéria, que é incubado a 42°C para fazer a identificação da espécie e TSA.

Exame parasitológico

O exame parasitológico consiste na observação microscópica da amostra após execução de técnicas de concentração, método de Ritchie e do método de Willis (modificado), permitindo, assim, a visualização de estruturas parasitárias. As técnicas de concentração permitem detetar parasitas que podem não ser detetados através de um exame direto a partir da amostra. O objetivo da concentração é agregar os parasitas presentes num pequeno volume da amostra e remover o máximo possível de detritos que possam prejudicar a observação. Estas técnicas permitem a deteção de quistos e ooquistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos. Trofozoítos de protozoários geralmente não sobrevivem a estes procedimentos (Gockel-Blessing, 2013).

O método de Ritchie é um método de sedimentação, cujo princípio é a gravidade específica. Assim, depois de sucessivas centrifugações é adicionado formol e éter, obtendo-se 4 camadas devido às diferentes densidades (éter, rolhão de restos fecais, formol e sedimento) sendo que, se presentes, as estruturas parasitárias encontram-se no sedimento. Com este método é possível observar estruturas como quistos e ovos.

O método de Willis, é um método de flutuação, permitindo a observação de ovos leves de helmintas que não seria possível com um método de sedimentação. É usado uma solução saturada de NaCl, permitindo que as estruturas parasitárias flutuem.

Após os métodos de concentração, a amostra, é observada ao microscópio primeiro com a objetiva de 10x, que permite observar ovos e larvas, e depois com a objetiva de 40x para detetar a presença de quistos.

Por meio de um teste imunocromatográfico, o laboratório faz uma triagem inicial de dois parasitas, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* spp.

5.4.7. Exsudato vaginal e Exsudato uretral

Algumas infeções do aparelho genital, principalmente do aparelho genital feminino, são causadas por microrganismos endógenos cuja patogenicidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita (Fonseca et. al., 2004).

A colheita da amostra é realizada com uma zaragatoa, que é transportada no meio de Amies. O primeiro exame a fazer-se é o exame parasitológico que consiste na observação microscópica da amostra para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. Este exame deve ser feito assim que a amostra chega ao laboratório, pois este parasita perde a viabilidade rapidamente. Infeções causadas por este parasita são diagnosticadas através da visualização do trofozoito flagelado móvel (Garcia, 2010). Nesta observação microscópica é possível observar, ainda,

flora bacteriana, células leveduriformes e *clue cells*, que são células epiteliais revestidas por cocobacilos Gram variável, características de *Chlamydia trachomatis*.

Os meios COS, PVX, HAE e SGC2 são inoculados por esgotamento do produto à superfície do meio e incubados a 37°C durante 24 horas. A inoculação destes meios permitem a recuperação de bactérias como *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus spp.*.

5.4.8 Secreções Respiratórias

As amostras de expetoração são frequentemente colhidas quando há suspeita de pneumonia bacteriana. As amostras do trato respiratório inferior estão entre as amostras mais difíceis de colher adequadamente, porque são contaminadas com a flora da orofaringe. Assim, a primeira amostra da manhã é a recomendada, já que é a mais concentrada em microrganismos. Uma única amostra é adequada para a deteção de infeção bacteriana do trato respiratório inferior. Contudo se houver suspeita de infeções fúngicas ou por micobactérias, amostras de três dias diferentes são mais apropriadas (Mahon e Lehman, 2019).

O trato respiratório inferior geralmente é estéril e não possui microbiota normal. As infeções do trato respiratório inferior são menos comuns do que a do trato respiratório superior, porém são mais graves. A pneumonia é uma doença inflamatória do pulmão na qual o líquido preenche os alvéolos (Nester et. al., 2012).

O processamento da amostra começa com a realização de um esfregaço e posterior coloração de Gram, para exame direto, com o objetivo de avaliar a qualidade da amostra, usando os critérios de *Murray-Washington* (Tabela IV). Assim, se a amostra se enquadrar nos grupos 4 e 5, com 25 ou mais leucócitos por campo e menos de 25 células epiteliais, significa que é representativa do trato respiratório inferior, e como tal, prossegue-se com os exames de rotina. Contrariamente, se a amostra se encontrar nos grupos 1, 2 ou 3, considera-se que é representativa da flora da orofaringe, traduzindo pouca qualidade da amostra e má colheita, sendo necessário uma nova colheita. Este critério não é usado quando se trata de um doente neutropénico.

Tabela IV - Critérios de Murray-Washington para avaliar a qualidade de uma expetoração.

Grupo	Células epiteliais (100x)	Leucócitos (100x)
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	<10	25

Exame bacteriológico e micológico

Para o exame cultural, inoculam-se, por esgotamento do produto na superfície do meio, os meios sólidos COS, PVX, HAE, e dois meios SGC2, que incubam a 37°C durante 24 a 48 horas, exceto um dos meios SGC2 que incubam a 30°C durante um mês, com avaliação

semanal do crescimento para a pesquisa de fungos filamentosos. Caso apresente crescimento de fungo filamentoso, o fungo é repicado para um novo meio de SGC2, para manter a viabilidade, e é preparada uma lâmina pela técnica da fita-cola, usando o corante azul de lactofenol, para exame microscópico, com o objetivo de fazer a identificação definitiva do fungo. Também são inoculados os meios líquidos de enriquecimento BHI e KCS que são posteriormente repicados para meios sólidos.

As placas são avaliadas e se se observar um microrganismo, cuja colônia se distingue das colônias originadas por microrganismos da microbiota comensal, e que se encontre em predomínio em relação aos outros, este é isolado, identificado e é realizado o respectivo TSA.

Exame micobacteriológico

Este exame tem como objetivo a pesquisa de BAAR, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis*.

O espectro das infeções associadas aos BAAR é extenso e inclui infeções cutâneas, doenças pulmonares, sistêmicas e oportunistas (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

Normalmente, é realizado a pesquisa de *M. tuberculosis* através de biologia molecular, por RT-PCR.

A partir do produto realiza-se um esfregaço para posterior coloração de Kinyoun e exame direto, no qual se faz a avaliação da presença de micobactérias e respetiva contagem, que necessita de interpretação como mostra a tabela V.

Tabela V - Interpretação de esfregaços para pesquisa de BAAR pela coloração de Kinyoun.

Número de BAAR observados (100x)	Interpretação
0	Negativo
1-2/300 campos	Duvidoso
1-9/100 campos	1+
1-9/10 campos	2+
1-9/campo	3+
>9/campo	4+

Para a proceder à cultura de micobactérias é necessário realizar a digestão, descontaminação e concentração da amostra, de modo a garantir a sua recuperação. Assim, os objetivos destas etapas são a liquefação da amostra através da digestão do material proteico e eliminação de microrganismos que não sejam micobactérias (Mahon e Lehman, 2019). Para a descontaminação é usado o hidróxido de sódio (NaOH), que também é usado na liquefação juntamente com a N-acetil-cisteína; a concentração faz-se pela centrifugação das amostras. Após este processo obtém-se o homogeneizado, a partir do qual se faz um esfregaço para coloração de Kinyoun, e semeiam-se os meios LJ, MGIT e COS, este último serve de controlo. São incubados a 37°C em aerobiose durante dois meses, com avaliação semanal do crescimento. A avaliação do crescimento no meio MGIT é realizada com o auxílio de um leitor de fluorescência. Se houver desenvolvimento de culturas no meio LJ, com um aspeto de

“couve-flor”, amarelas a brancas, sugestivas de micobactérias, é realizada uma nova coloração de Kinyoun, para avaliar a positividade. Se se confirmar é realizada a identificação por RT-PCR e a amostra é enviada ao Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) para a realização de TSA. Se a biologia molecular não detetar *M. tuberculosis*, e forem observados BAAR no exame direto, podem estar presentes outras micobactérias e neste caso a amostra também é enviada para o CHUC para ser realizada a identificação e respetivo TSA.

Outras amostras do sistema respiratório inferior que chegam ao laboratório são os lavados brônquicos, lavados broncoalveolares (LBA) e aspirados brônquicos cujo procedimento é semelhante ao da expectoração, com a diferença que para os LBA a inoculação dos meios é feita por sementeira semiquantitativa.

5.4.9. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

A meningite bacteriana é uma doença grave associada a alta morbidade e mortalidade se o diagnóstico etiológico for tardio (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

As três espécies mais comuns que causam meningite são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, que podem fazer parte da microbiota normal do trato respiratório superior, e são transmitidos através de gotículas respiratórias e normalmente causam doenças comuns como sinusite ou conjuntivite. Numa pequena percentagem de pessoas infetadas, estes microrganismos invadem a corrente sanguínea e passam para o sistema nervoso central (SNC). Assim, imunodeprimidos, recém-nascidos e idosos são grupos de risco para a meningite (Nester *et. al.*, 2012).

O processamento laboratorial desta amostra é urgente e deve ser imediato. A colheita, é feita por punção lombar, antes do início da terapêutica antimicrobiana, e a amostra deve ser enviada ao laboratório imediatamente após a colheita, e mantida à temperatura ambiente (Fonseca *et. al.*, 2004).

O processamento da amostra inicia-se com a sua centrifugação a fim de a concentrar. É obrigatório fazer um esfregaço, a partir do sedimento, para coloração de Gram e observação microscópica. Em caso de um resultado positivo, a informação da morfologia e Gram do microrganismo deve ser de imediato comunicada ao clínico para que este possa dar início à terapêutica.

É importante observar o aspeto da amostra, já que a turvação sugere infeção bacteriana.

Os meios que são inoculados por inundação são COS, PVX, HAE, SGC2, meios em anaerobiose (CDC, SCS e KV) e também os meios líquidos BHI e KCS para posterior

repicagem e avaliação microscópica. A repicagem do BHI é feita para um meio COS e a repicagem do KCS é feita para meios em anaerobiose (CDC, SCS e KV), com controlo COS em aerobiose. Todos estes meios são incubados 24 a 48 horas a 37°C.

Já que o Líquido Cefalorraquidiano é um líquido estéril, qualquer crescimento é valorizado, identificado e feito o TSA.

5.4.10. Líquidos orgânicos

As amostras de líquidos orgânicos como líquido pleural e ascítico têm um processamento semelhante ao LCR: são centrifugadas, é realizado um esfregaço para coloração de Gram, são inoculados e incubados os meios sólidos (COS, PVX, HAE, SGC2) e líquidos (BHI e KCS). Como normalmente estes líquidos são estéreis, a presença de microrganismos deve ser investigada, valorizada, identificada e feito o antibiograma respetivo. No caso do líquido pleural, faz-se a inoculação de dois SGC2, para pesquisa de fungos filamentosos.

5.4.11. Raspados de Fâneros

Pacientes imunodeprimidos são mais suscetíveis a apresentar doenças fúngicas, podendo ser ameaçadoras de vida. As micoses cutâneas afetam o cabelo, a pele ou as unhas e são causadas por fungos invasores da pele, os dermatófitos (Nester *et. al.*, 2012), sendo os géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, e *Epidermophyton* os agentes causadores de micoses.

Os raspados de fâneros (pele, unhas e cabelo) são das amostras menos comuns que o laboratório recebe. A amostra chega numa caixa de Petri ou entre lâminas, faz-se a sementeira em dois meios de SGC2, incubados a 25°C e 30°C, e no meio Mycoline incubado a 25°C. Também se prepara lâmina para exame direto, usando-se hidróxido de potássio (KOH) a 10% no caso de raspados da pele e KOH a 30% para cabelo e unhas. Caso no exame direto se observem hifas, o médico deve ser notificado para dar início à terapêutica. No exame cultural se se observar crescimento de leveduras, estas são identificadas. No caso de crescimento de fungos filamentosos, a identificação é realizada através de exame direto pela técnica da fita-cola com azul de lactofenol e observação macroscópica da colónia.

5.5 Identificação e métodos de suscetibilidade a antimicrobianos

As bactérias podem ser classificadas pela aparência macroscópica e microscópica, pelo crescimento característico e propriedades metabólicas, pela sua antigenicidade e, finalmente, pelo seu genótipo. As características das diferentes bactérias conferem à colónia

características distintas como cor, tamanho, forma e cheiro e além destas, a capacidade da bactéria de resistir a certos antibióticos, fermentar açúcares específicos, lisar eritrócitos ou hidrolisar lípidos também são características fundamentais na identificação (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016). A aparência microscópica, incluindo tamanho, forma e agrupamento dos organismos (cocos, bacilos, curvos ou espirais) e sua reação á coloração de Gram (Gram positivo ou Gram negativo) são os principais meios para distinguir as bactérias (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

Durante a interpretação e valorização dos resultados é importante integrar esses resultados na situação clínica do paciente. Assim, é fundamental saber qual a origem da amostra, se o local possui microbiota normal ou é estéril, os microrganismos patogénicos mais frequentemente isolados desse produto e se o doente já iniciou terapêutica.

Para a correta identificação do microrganismo causador de infeção, o laboratório dispõe de vários métodos, sendo o mais usado a identificação e realização do TSA através do sistema *Vitek 2 Compact 15*.

5.5.1 Provas Clássicas

A principal função destas provas clássicas é direcionar a escolha do método de identificação definitiva, e escolha apropriada das cartas de TSA.

Catalase

As bactérias que sintetizam a enzima catalase hidrolisam o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio gasoso, o que resulta na liberação de bolhas de gás. O teste é útil na caracterização inicial de cocos possibilitando a diferenciação entre estafilococos e estreptococos, sendo os primeiros catalase positiva e os segundos catalase negativa (Fonseca *et. al.*, 2004).

O procedimento do teste consiste na transferência de uma colónia para uma lâmina e adicionar peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e observar imediatamente se existe ou não a formação de bolhas de oxigénio. Não se deve realizar o teste com colónias retiradas de meios com sangue, pois pode dar origem a um falso positivo, já que os eritrócitos possuem catalase (Fonseca *et. al.*, 2004).

Citocromo-oxidase

A citocromo-oxidase é uma hemoproteína que atua como elo final na cadeia de respiração aeróbia, transferindo eletrões para o oxigénio, com formação de água.

O teste utiliza um corante (fenilenodiamina) que substitui o oxigênio como aceitador de elétrons, levando ao aparecimento de cor (roxo-escuro) (Fonseca *et. al.*, 2004).

É útil na diferenciação entre as enterobactérias, que são oxidase negativa, e as bactérias do gênero *Pseudomonas*, que são oxidase positiva (Mahon e Lehman, 2019).

Teste de Suscetibilidade à Optoquina

A suscetibilidade à optoquina é usada para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de outros estreptococos alfa-hemolíticos. Para realizar este teste inocula-se um meio MHF com uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 McFarland, feita a partir da colônia suspeita de *S. pneumoniae*, pelo método de sementeira em toalha. De seguida, coloca-se na superfície e no centro do meio um disco de optoquina e incuba-se a placa a 37 ° C por 24 horas (Garcia, 2010).

O crescimento do *S. pneumoniae* é caracteristicamente inibido pelo disco de optoquina produzindo um halo maior ou igual a 19 mm (Fonseca *et. al.*, 2004). Se não houve inibição pode-se concluir que não se trata de *S. pneumoniae* (Figura 7).



Figura 7 - Teste de suscetibilidade à Optoquina.
(Fonte: Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG)

5.5.2 Identificação Definitiva e Antibiograma

Regra geral, a identificação definitiva de um microrganismo é obtida através do uso do sistema *Vitek 2 Compact 15*, que possui diferentes tipos de cartas de identificação e TSA (Tabela VI).

Tabela VI - Cartas de identificação VITEK, microrganismos identificados por cada carta e respetiva densidade necessária para a suspensão

Carta	Microrganismos	Densidade McFarland para a suspensão
GN	Bactérias Gram negativo	0,6-0,63
GP	Bactérias Gram positivo	0,6-0,63
ANC	Anaeróbios e <i>Corynebacterium spp.</i>	2,70-3,30
NH	<i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>	2,70-3,30
YST	Leveduras	1,8-2,20

As cartas de identificação possuem 64 poços com substratos, que vão ser utilizados pelos microrganismos, dando origem a compostos corados, obtendo-se um padrão que é comparado com uma base de dados, dando um resultado com uma determinada sensibilidade,

em percentagem. A escolha da carta mais adequada é feita com base no Gram, no crescimento em diferentes meios e no aspeto das colónias.

A partir das placas que foram inoculadas com a amostra, verifica-se se há colónias isoladas, puras, procedendo-se à sua identificação. Se não se observar colónias puras, repica-se para um novo meio, COS ou PVX (no caso de se desconfiar de uma bactéria fastidiosa) e quando se obtiver uma colónia pura, prossegue-se com a identificação.

Para a inoculação das cartas de identificação é usada uma suspensão bacteriana realizada a partir de colónias puras em 3 ml de solução salina, cuja densidade depende da carta a usar (Tabela VI). Depois de preparada a suspensão a carta é incubada no equipamento, que faz a inoculação recorrendo ao vácuo. A suspensão também é usada para inocular um meio, que serve como controlo da pureza, e se for necessário repetir é garantido a viabilidade do microrganismo.

Este procedimento também é usado para o antibiograma. Cada carta possui um determinado número de antimicrobianos com diluições variadas. A escolha tem por base a morfologia, Gram, aspeto das colónias, catalase e oxidase (Tabela VII e Anexo I)

O inoculo para estas cartas é obtido através de uma diluição da suspensão bacteriana usada na identificação. As cartas para a identificação e as cartas para o TSA são tratadas de modo semelhante. O equipamento deteta o crescimento microbiano através da leitura

Tabela VII - Cartas de TSA VITEK e respetivos microrganismos a que se destinam

Carta de TSA	Microrganismos
355	Enterobacterias
373	Pseudomonas e multirresistentes
648	Estafilococos
586	Enterococos, Estreptococos β ou γ - hemolíticos
ST-03	Estreptococos α -hemolíticos
YS08	Leveduras

turbidimétrica a cada 15 minutos, e consegue fornecer o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI), comparando-os com os valores dos *breakpoints* apresentados pelas regras da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) permitindo a interpretação e classificação do microrganismo em relação ao antibiótico como sensível, intermédio ou resistente. Em microrganismos multirresistentes pode ser necessário o uso de mais de uma carta para poder testar um maior número de antibióticos.

Em casos em que o sistema *Vitek 2 Compact 15* é incapaz de identificar, ou a probabilidade da identificação não foi elevada, ou ainda se for necessário testar algum antibiótico que não se encontra nas cartas de TSA, recorre-se a outros métodos, como os painéis de identificação e TSA da Backman Coulter® que possuem poços com substratos que permitem a identificação e poços com antibióticos para determinar o TSA. Os painéis são

incubados a 37°C durante 24 horas. A leitura do painel é realizada e por comparação com padrões disponíveis num *software* é obtida a identificação e o TSA.

5.5.3 Método de difusão em disco e E-teste

Para microrganismos que não são abrangidos pelas cartas de TSA Vitek, como *Haemophilus influenzae* e alguns anaeróbios, ou no caso de ser necessário testar algum antibiótico que não se encontra presente nas cartas Vitek, é realizado o TSA manual.

Para realizar o antibiograma, através do método de Kirby-Bauer, é usado o meio Mueller-Hinton ou MHF, para o caso de microrganismos fastidiosos, que é inoculado por sementeira em toalha, com uma suspensão bacteriana com uma densidade de 0,5 na escala de McFarland e de seguida são colocados os discos. Estes encontram-se impregnados de antibióticos com uma determinada concentração e assim que o disco é colocado no meio, a substância começa a difundir, criando um gradiente de concentração. A bactéria vai-se multiplicando até encontrar uma concentração de antibiótico que a inibe, criando um halo de inibição bem delimitado, cujo diâmetro é medido e comparado com os *breakpoints* apresentados pelo EUCAST, permitindo a classificação quanto à suscetibilidade do microrganismo a um determinado antibiótico. Este método é qualitativo.

Em alternativa, é usado o E-teste, um método quantitativo, que utiliza tiras de teste impregnadas na superfície inferior com um gradiente de concentração do antibiótico e marcadas na superfície superior com uma escala de concentração. As tiras são colocadas na superfície de uma placa de ágar que foi inoculada de maneira semelhante à de um teste de difusão em disco. Após a incubação, os resultados do teste são lidos, sendo possível visualizar a área inibitória elíptica. A CMI é determinada onde a elipse de crescimento cruza a tira E-test (Mahon e Lehman, 2019).

5.5.4 Pesquisa de mecanismos de resistência

Beta-lactamases de espectro alargado (ESBL)

As Beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) são um problema de saúde pública. As ESBL são resultado de mutações pontuais nos genes que codificam beta-lactamases comuns, hidrolisando ou inativando cefalosporinas, aztreonam e penicilinas de espectro alargado. São bloqueadas por inibidores da beta-lactamases, como o ácido clavulânico, e os testes laboratoriais para detetar bactérias produtoras de ESBL são baseados nesta propriedade (Garcia, 2010).

Assim, testa-se a amoxicilina com ácido clavulânico, pelo método de Kirby-Bauer, colocando um disco de ácido clavulânico e 2 cm ao lado um disco de uma cefalosporina de 3ª geração. As ESBL vão ser inibidas havendo um aumento do halo de inibição (sinergismo) da cefalosporina, caso o microrganismo testado seja produtor de ESBL. Para aumentar a sensibilidade do teste pode-se usar duas cefalosporinas (Figura 8-A). No caso de um microrganismos com AmpC constitutivas, utiliza-se uma cefalosporina de 4ª geração.

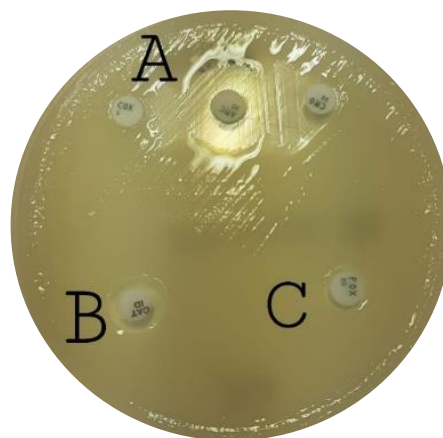


Figura 8 - Pesquisa de mecanismos de resistência: ESBL (A), Carbapenemases (B) e AmpC (C), pelo método de difusão em disco no meio de MHE. (Fonte: Setor de Microbiologia do SPC do IPOCFG)

Carbapenemases

Espécies de enterobactérias produtoras de carbapenemases são cada vez mais detetadas em situações clínicas. Estas bactérias possuem genes de resistência aos antibióticos carbapenêmicos, muitas vezes transportados em plasmídeos. A sua deteção é importante para uma terapêutica adequada e o controlo de infeções. Bactérias que possuem estas enzimas são frequentemente resistentes a um ou mais carbapenemos (Mahon e Lehman, 2019).

Segundo o EUCAST, a suspeita de que um determinado microrganismo é produtor de carbapenemases dá-se quando a CIM para o ertapeneme ou meropeneme é maior do que 0,5µg/ml. Assim, é feito um teste imunocromatográfico que além da presença da enzima consegue indicar qual a carbapenemase presente (OXA-48, KPC, NDM) e paralelamente é testado, pelo método de difusão em disco, um carbapenemo (Faropeneme) que se for resistente traduz a presença de carbapenemases (Figura 8-B). Se a suspeita é elevada e este teste é negativo recorre-se ao RT-PCR com pesquisa das carbapenemases, anteriormente referidas e adicionalmente IMP e VIM.

Beta-lactamases AmpC

As β -lactamases AmpC são cefalosporinases clinicamente importantes codificadas por cromossomas de muitas Enterobacteriaceae e alguns outros organismos, que medeiam a resistência à cefalotina, cefazolina, ceftioxina, a maioria das penicilinas e combinações com inibidores de β -lactamases. Em muitas bactérias, as enzimas AmpC são indutíveis e podem ser expressas em altos níveis por mutação. Assim, a sobreexpressão confere resistência a

cefalosporinas de espectro alargado, incluindo cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona (Jacoby, 2009).

A pesquisa deste mecanismo de resistência faz-se pelo estudo da suscetibilidade à cefoxitina: caso seja sensível (diâmetro do halo de inibição ≥ 19 mm) é considerado *AmpC* negativo (Figura 8-C); se for resistente (diâmetro do halo de inibição < 19 mm) é considerado produtor de *AmpC*.

Metalo-Beta-lactamases (MBL)

Estas enzimas comprometem a atividade dos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam. As MBL não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases, porém são inibidas por quelantes de íons (*in Vitro*), já que no seu centro ativo possuem íons divalentes, normalmente o zinco (Zn^{2+}). Suspeita-se da presença destas enzimas quando se obtém uma CIM $> 1 \mu\text{g/ml}$ para o imipeneme. Para confirmação da presença de metalo-beta-lactamases, é realizado um e-Teste imipeneme/imipeneme + EDTA (IMI/IMD). É inoculado um meio Mueller-Hinton com uma suspensão bacteriana com uma densidade de 0,5 na escala de McFarland e colocada a tira do E-teste com duas escalas, em que numa ponta possui imipeneme e na outra imipeneme em combinação com EDTA. Se o microrganismo testado for MBL positivo, vai haver inibição das enzimas aumentando a elipse de inibição. A leitura faz-se no ponto em que a elipse cruza a escala, em ambos os lados. Um ratio IMI/IMD maior ou igual a $8 \mu\text{g/ml}$ é sugestivo da presença de MBL.

Staphylococcus aureus Meticilina-Resistente (MRSA)

S. aureus é um patógeno humano proeminente que pode causar uma gama diversificada de doenças que vão desde infecções de pele, relativamente menores, até infecções graves e com risco de vida, como endocardite, pneumonia e sépsis. A terapêutica para infecções por *S. aureus* é dificultada devido ao desenvolvimento de resistência a alguns antimicrobianos. Dentro destas resistências destaca-se o MRSA que é resistente a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos no caso de estirpes comunitárias e adicionalmente, macrólidos e quinolonas no caso de estirpes hospitalares.

Os β -lactâmicos ligam-se às proteínas de ligação à penicilina (PBPs) essenciais para a biossíntese da parede celular e inibem a formação de ligações cruzadas de peptidoglicanos, levando à lise celular bacteriana. Na presença do gene *mecA* ou *mecC* ocorre uma alteração conformacional nas PBPs conferindo resistência aos β -lactâmicos (Paterson, Harrison e Holmes, 2014).

Usando o sistema automatizado Vitek 2, o gene MRSA *mecC* produz um perfil de suscetibilidade a antibióticos distinto em comparação com MRSA *mecA*. O *mecA* apresenta resistência à oxacilina e à cefoxitina, enquanto a maioria dos MRSA *mecC* mostra resistência à cefoxitina e, portanto, são relatados como MRSA, mas mostram suscetibilidade à oxacilina. Assim, a resistência à cefoxitina é um parâmetro mais sensível e confiável para a detecção de MRSA.

5.5.5 Biologia molecular

No laboratório de Microbiologia é utilizado o sistema *GeneXpert*® para realizar os testes moleculares, através de uma Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR). O principal uso da biologia molecular é a detecção de *M. tuberculosis*, toxina B e toxina binária de *C. difficile*, pesquisa de Carbapenemases, identificação de *S. aureus* e MRSA em hemoculturas positivas para cocos Gram positivo em cacho e identificação de portadores de MRSA.

A PCR em tempo real pode ser usada para quantificar a quantidade de DNA ou RNA sendo a cinética da reação proporcional à quantidade do ácido nucleico na amostra (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

6 Imunologia E Hormonologia

As descobertas de *Edward Jenner* deram início à imunologia, mais tarde, as descobertas de *Robert Koch* e *Louis Pasteur* vieram ajudar a imunologia a ser considerada uma disciplina científica. Com a descoberta da função de fagocitose, neutralização de toxinas bacteriana por anticorpos, descoberta da bacteriólise pelo complemento e a opsonização por anticorpos, a imunologia surgiu associada à microbiologia médica (Kaufmann, 2019). Estas últimas duas descobertas forneceram as primeiras evidências sobre a cooperação entre imunidade adquirida e a inata (Kaufmann, 2019).

A imunidade inata consiste em quatro barreiras: a barreira anatômica, que inclui a pele e as membranas mucosas; a barreira fisiológica, que consiste no aumento da temperatura, o baixo pH do estômago, e em mediadores químicos; e as últimas duas barreiras são a fagocitose, e o processo de inflamação (Owen, Punt e Stranford, 2009). Em contraste com a imunidade inata, a imunidade adaptativa tem a capacidade de reconhecer e eliminar de forma seletiva, assim, a imunidade adaptativa possui quatro características: especificidade antigénica, diversidade, memória imunológica e o reconhecimento “self” (Owen, Punt e Stranford, 2009).

6.1 Amostras e o seu percurso

Ao setor de Imunologia e Hormonologia chegam diversos tipos de amostras, sendo o mais comum o soro, que é obtido por centrifugação dos tubos de sangue sem anticoagulante e com um gel de separação a 2100 Gs durante 10 minutos. Depois da centrifugação estado é feita a avaliação visual do soro para verificar a existência de hemólise, lipemia ou icterícia, ou a presença de fibrina, que possa interferir com a pipetagem nos equipamentos. Após esta avaliação, as amostras iniciam o seu percurso pelos diferentes autoanalisadores. O percurso é um circuito definido, que permite a rastreabilidade das amostras e uma rotina de trabalho eficiente e está ilustrado no esquema (Figura 9). Cada tubo possui na etiqueta, para além da identificação do utente, a identificação dos equipamentos aonde deve ser colocado, que depende dos parâmetros prescritos. Ao finalizar este circuito, as amostras são arrumadas por ordem numérica, e o soro é aliquoteado, caso existam pedidos para estudos analíticos que envolvam técnicas manuais ou semi-automáticas, como é o caso dos estudos Eletroforéticos de proteínas, imunofluorescência indireta, técnicas de ELISA e RIA.



Figura 9 - Esquema do percurso das amostras pelos diferentes equipamentos presentes no Setor de Imunologia e Hormonologia do SPC do IPOCFG.

O Anexo II apresenta os diferentes equipamentos utilizados na rotina do setor de Imunologia e Hormonologia, os repetitivos métodos de detecção de imunocomplexos, assim como os parâmetros testados.

A segunda amostra mais comum é a o sangue total colhido em tubo com EDTA–k3, que posteriormente é centrifugado a 2100 Gs durante 10 minutos, e o plasma obtido é utilizado no doseamento dos marcadores cardíacos (Troponina I, mioglobina e a CK-MB) e a Paratormona (PTH). A Hormona Adrenocorticotrófica (ACTH) e o aminoácido Homociteína também são doseados em plasma, porém a colheita, o transporte e a centrifugação são efetuados a frio. As amostras de sangue total com anticoagulante, heparina de lítio, têm o mesmo processamento das amostras descritas anteriormente (2100Gs a frio) mas o plasma é usado na quantificação dos metabolitos da adrenalina, noradrenalina e dopamina: metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina, respetivamente.

A urina pontual é o produto biológico usado na determinação do iodo urinário, enquanto que a urina colhida durante 24 horas em contentores próprios sem ácido é usada no doseamento da proteína de Bence Jones e cortisol livre. Para a quantificação das Metanefrinas fraccionadas e dos ácidos 5-OH Indolacético, Vanilmandélico e Homovanílico, a urina de 24h é recolhida em contetores com HCL 6N. No Setor, a urina é posteriormente homogeneizada, o volume total é medido e o pH das alíquotas é acertado de acordo com o protocolo em vigor.

A partir da lavagem da agulha de uma biopsia aspirativa de agulha fina (BAAF) com 1ml de solução salina (NaCl a 0,9%) e posterior centrifugação a 1500 Gs durante 2 minutos, é efetuado o doseamento de tiroglobulina, anticorpos anti-tiroglobulina e calcitonina no equipamento Cobas e601 da **Roche Diagnostics**®. A biópsia é realizada pelo radiologista ou pelo endocrinologista em adenomegalias suspeitas de metastização por carcinomas diferenciados ou medulares da tiroide.

A saliva é usada para o doseamento do cortisol livre no equipamento Cobas e601 da **Roche Diagnostics**®, em doentes suspeitos de Síndrome de *Cushing*. A colheita é efetuada às 23h com a ajuda de um cilindro de algodão tamponado que o doente coloca na boca durante

um minuto. O algodão é posteriormente colocado num tubo de fundo cónico e enviado para o Serviço aonde é centrifugado para extrair a saliva.

6.2 Princípios dos imunoensaios

Nos imunoensaios, o anticorpo reconhece e liga-se a um antígeno formando um complexo, a molécula alvo pode ser o antígeno ou o anticorpo. Esta ligação depende da concentração de cada reagente, da especificidade do anticorpo para o antígeno, da afinidade e da avidéz e das condições ambientais (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

6.2.1 Imunoensaios Competitivos

No ensaio competitivo, a concentração de antígeno marcado é constante e limitada. Durante a incubação, quanto maior for a concentração do antígeno a dosear, mais este se liga ao anticorpo, resultando numa menor ligação de antígeno marcado. Estes ensaios são muito sensíveis porque baixas concentrações de antígeno de interesse produzem um grande sinal mensurável (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

O ensaio pode ser realizado numa única etapa, na qual são incubados, em simultâneo todos os reagentes e a amostra (Figura 10). Após a incubação e separação do antígeno marcado não ligado, o antígeno marcado ligado é medido.

Alternativamente, o ensaio competitivo pode ser realizado em etapas sequenciais. Primeiro, o antígeno de interesse é incubado com o anticorpo, em seguida, o antígeno marcado é adicionado. Após um tempo de incubação mais longo e uma etapa de separação, o antígeno marcado ligado é quantificado. Esta abordagem aumenta a sensibilidade analítica do ensaio.

Nestes tipos de ensaios a concentração do analíto é inversamente proporcional ao sinal medido no ensaio.

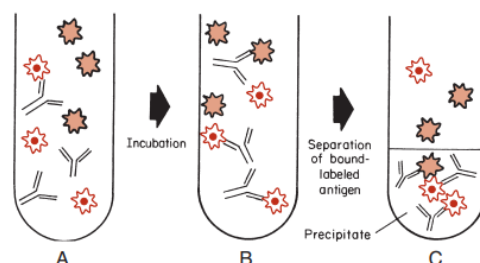


Figura 10 - Imunoensaio competitivo (Adaptada de: Clinical Chemistry)

6.2.2 Imunoensaios não competitivos – ou *sandwich*

Imunoensaios não competitivos usam um anticorpo marcado em excesso para detectar o antígeno de interesse. No ensaio “*sandwich*” um anticorpo não marcado imobilizado numa superfície (anticorpo primário) captura o antígeno de interesse, posteriormente o anticorpo marcado liga-se também ao antígeno de interesse, emitindo um sinal proporcional à concentração de analito presente na amostra (Figura 11 - A) (Bishop, Fody e Schoeff, 2010). Este ensaio também pode ser realizado para detectar anticorpos, nesse caso, a única diferença é, no lugar de um anticorpo, existe um antígeno fixo a uma superfície (Figura 11 - B).

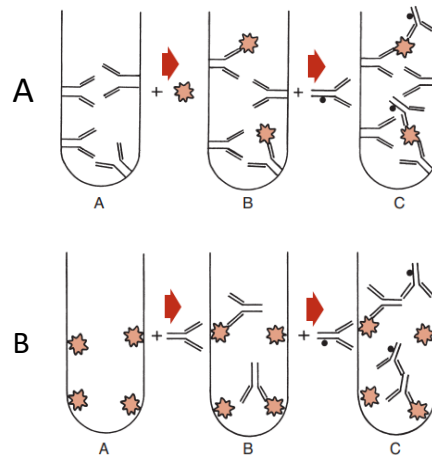


Figura 11 - Imunoensaio não competitivo. A: analito é um antígeno e B: analito é um anticorpo (Adaptada de: Clinical Chemistry)

6.3 Métodos de detecção de imunocomplexos

6.3.1 Quimiluminescência (CLIA)

A medição da luz produzida por quimioluminescência durante certas reações químicas fornece uma alternativa conveniente e altamente sensível às medições de absorbância em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), assim o substrato luminogénico substitui o substrato cromogénico, aumentando a sensibilidade (Owen, Punt e Stranford, 2009).

Nas reações de quimioluminescência, parte da energia química gerada produz intermediários excitados que decaem para um estado fundamental com a emissão de fótons, que são detetados por um luminómetro. O evento de excitação é causado por uma reação química com compostos como ésteres de acridínia (DMEA), substratos de 1,2-dioxetano e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A luz é emitida a partir do produto excitado formado numa reação de oxidação catalisada por enzimas como a fosfatase alcalina, peroxidase de rábano silvestre (Figura 12) (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).



Figura 12 - Imunoensaio de Quimioluminescência. (Adaptada de: Siemens Healthineers)

6.3.2 Eletroquimioluminescência (ECLIA)

Na eletroquimioluminescência as espécies reativas que produzem a reação quimioluminescente são geradas electroquimicamente a partir de precursores estáveis na superfície de um elétrodo depois de aplicado uma diferença de potencial (Burtis e Bruns, 2014).

O método caracteriza-se pela competição do analito com um antígeno marcado com rutênio (Ru^{2+}) por um anticorpo biotiniado e adição de esferas magnéticas revestidas por estreptavidina que liga à biotina do anticorpo promovendo a sua ligação à fase sólida, pela reação redox entre o rutênio e a tripropilamina (TPA), iniciada pela aplicação de um potencial elétrico, obtém-se o sinal quimioluminescente que é detetado e medido (Figura 13) (Burtis e Bruns, 2014).

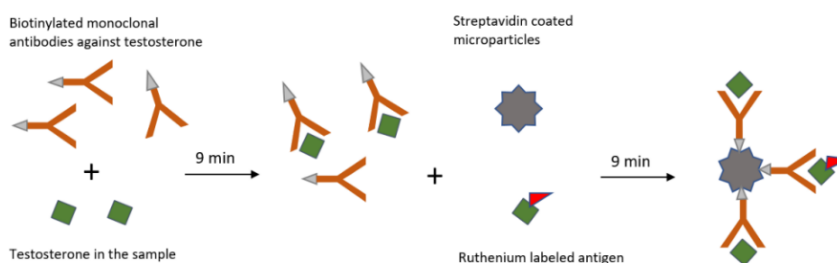


Figura 13 - Imunoensaio de Eletroquimioluminescência. (Adaptada de: Testosterone Use and Abuse Methodological Aspects)

6.3.3 Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)

TRACE é uma tecnologia baseada na transferência de energia não radiante da molécula doadora (criptato de európio) para a molécula aceitadora (XL665) no seguimento da formação de um imunocomplexo, esta transferência intensifica o sinal, aumentando a sensibilidade (Figura 14).

A tecnologia TRACE[®] está disponível exclusivamente nos analisadores KRYPTOR[®]. A fluorescência específica que é proporcional à concentração do antígeno é obtida através de uma dupla seleção: espectral e temporal (Bereciartura, 2020).

A tecnologia TRACE permite medições em uma fase homogénea, fornecendo resultados precisos em um curto tempo de reação, sem passos de lavagem, o que diminui a possibilidade de erro.

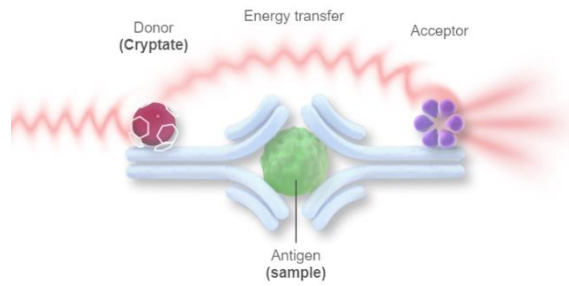


Figura 14 - Imunoensaio de TRANCE (Adaptada de: Thermo Fisher Scientific)

6.3.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio de ELISA, usa uma enzima conjugada com um anticorpo reage com um substrato incolor (substrato cromogénico) para gerar um produto de reação com cor. As enzimas mais usadas são: a fosfatase alcalina, peroxidase de rábano e a β -galactosidase (Figura 15) (Owen, Punt e Stranford, 2009). A sensibilidade destes ensaios aproxima-se da sensibilidade dos radioimunoensaios (RIA) e têm a vantagem de não utilizar radioisótipos. Variações ao imunoensaio de ELISA foram desenvolvidas, permitindo deteção qualitativa ou medição quantitativa de antigénio ou anticorpo (Owen, Punt e Stranford, 2009).

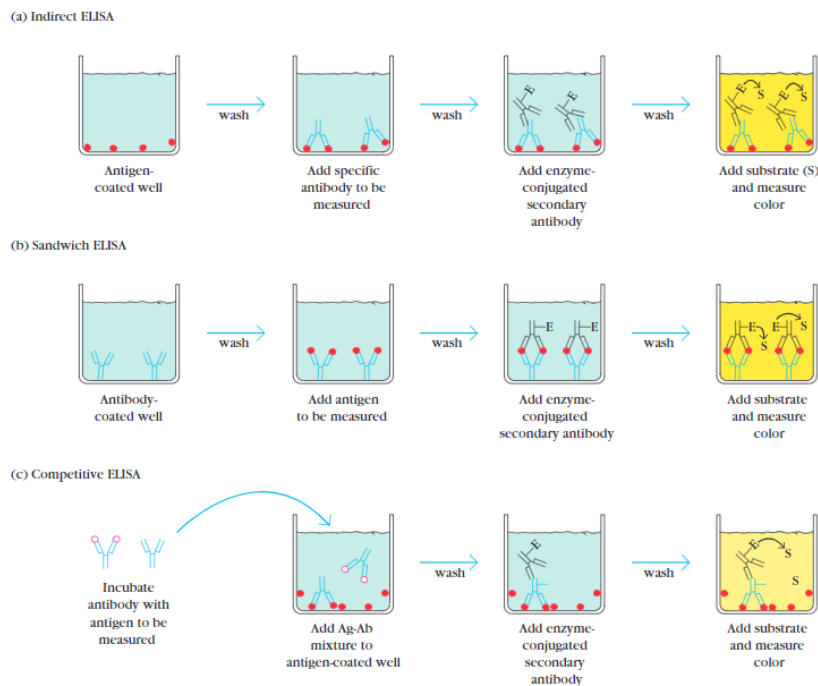


Figura 15 - Imunoensaio de ELISA (Adaptada de: Kuby Immunology)

6.3.5 Nefelometria e Imunoturbidimetria

Estes imunoenaios são baseados numa reação de aglutinação induzida pela ligação antígeno-anticorpo (Koivunen e Krogsrud, 2006), são técnicas muito usadas na medição da taxa de formação de imunocomplexos *in vitro*.

A turbidez diminui a intensidade do feixe de luz incidente ao passar por uma solução de partículas, a turbidimetria mede essa diminuição, ou seja, a intensidade da dispersão da luz, que é lida por um detetor colocado a um ângulo de 180°, em relação à luz incidente (Figura 16) (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

Os ensaios nefelométricos utilizam o fato de que os complexos antígeno-anticorpo em solução dispersam a luz em vários ângulos, que é detetada por fotodetetores que podem estar em ângulos de 30° a 90° em relação à luz incidente (Figura 16) (Bishop, Fody e Schoeff, 2010). Os nefelómetros comuns medem a luz espalhada em ângulos retos (90°) com a luz incidente. Os métodos nefelométricos em geral são mais sensíveis do que os ensaios turbidimétricos e têm um limite de detecção inferior (Bishop, Fody e Schoeff, 2010).

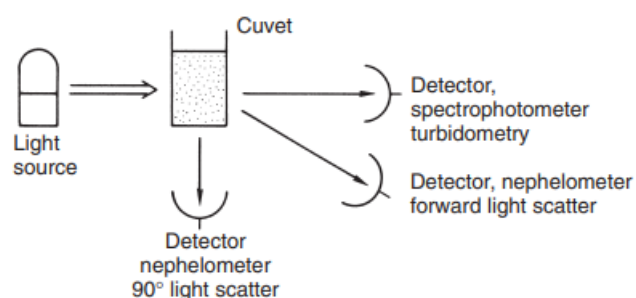


Figura 16 - Ensaio de nefelometria e Turbidimetria (Adaptada de: Clinical Chemistry)

6.3.6 Radioimunoensaios (RIA) e Imunorradiométricos (IRMA)

Uma das técnicas mais sensíveis para detetar antígeno ou anticorpo é a técnica de radioimunoensaio (RIA), que envolve a ligação competitiva de antígeno marcado com o radioisótopo iodo-125 (^{125}I) e um antígeno não marcado (antígeno de interesse) a um anticorpo de alta afinidade em fase sólida. O antígeno marcado é misturado com o anticorpo com concentração suficiente para saturar os sítios de ligação ao anticorpo. À medida que a concentração de antígeno não marcado aumenta, mais antígeno marcado será deslocado dos sítios de ligação (Figura 17). A diminuição da quantidade de antígeno radiomarcado ligado ao anticorpo específico na presença da amostra é medida para

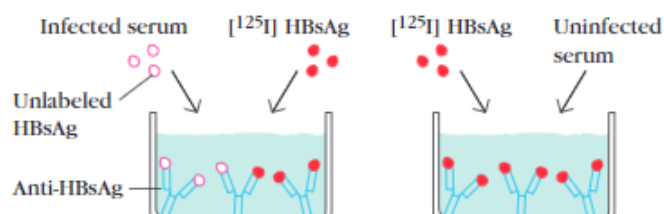


Figura 17 - Radioimunoensaio (Adaptada de: Kuby Immunology)

antígeno radiomarcado ligado ao anticorpo específico na presença da amostra é medida para

determinar a quantidade de antígeno presente na amostra (Owen, Punt e Stranford, 2009). Para determinar a quantidade de antígeno marcado ligado, o complexo antígeno-anticorpo é precipitado para separá-lo do antígeno livre (antígeno não ligado ao anticorpo) e a radioatividade no precipitado é medida por um contador de raios gama.

○ Ensaio imunorradiométrico (IRMA) é um ensaio não competitivo que utiliza um anticorpo secundário marcado. Assim, o sinal obtido é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra.

Estes ensaios têm vantagem na especificidade da interação antígeno-anticorpo e na capacidade dos elementos radioativos de medir quantidades muito baixas, mas têm vindo a cair em desuso devido ao perigo do manuseamento dos reagentes e produtos radioativos (Burtis e Bruns, 2014).

6.4 Marcadores Tumorais

○ termo marcador tumoral refere-se a moléculas complexas, principalmente proteínas, que são produzidas diretamente por células neoplásicas ou por outras células, em resposta a certas condições malignas ou não malignas (Holdenrieder *et. al.*, 2016). Estas moléculas podem estar associadas à proliferação celular neoplásica de um órgão específico, como por exemplo o PSA no carcinoma da próstata e a tiroglobulina no carcinoma da tiroide, porém marcadores tumorais, como o caso do CA 19-9, podem estar elevados em vários carcinomas (pâncreas, hepatobiliar e adenocarcinoma gástricos). Além disso, os marcadores tumorais não se encontram, uniformemente, elevados em todos os pacientes diagnosticados com uma neoplasia específica.

Antes da introdução das técnicas imagiológicas modernas e dos recentes desenvolvimentos no diagnóstico molecular, os marcadores tumorais estavam entre as poucas ferramentas de diagnóstico disponíveis (Holdenrieder *et. al.*, 2016), já que são facilmente obtidos a partir de amostras de sangue, colhidas por técnicas minimamente invasivas e cómodos para os pacientes com custos associados reduzidos. O uso de apenas um marcador tumoral para a monitorização de um tumor está sob escrutínio devido à baixa sensibilidade e especificidade quando usado desse modo. No entanto, pesquisas recentes mostraram um desempenho superior quando há uma combinação de vários marcadores tumorais (Holdenrieder *et. al.*, 2016).

Acredita-se que a concentração de marcadores tumorais no sangue reflita a atividade e o volume tumoral (Burtis e Bruns, 2014). Clinicamente, um marcador tumoral ideal deve ser

específico de um determinado tipo de tumor e sensível o suficiente para detetar tumores pequenos ou fazer diagnóstico precoce ou *screening* (Burtis e Bruns, 2014).

O uso mais comum e mais bem estabelecido dos marcadores tumorais é a monitorização da terapêutica instituída, ao permitir aos oncologistas obter uma fotografia dinâmica do sucesso ou não do tratamento (Holdenrieder *et. al.*, 2016). Além disso, é importante realçar que a especificidade é um problema menor em pacientes já diagnosticados com um carcinoma, o que aumenta ainda mais a utilidade destas moléculas nesse cenário. Por outro lado, em indivíduos com massas tumorais suspeitas, os marcadores podem ser muito úteis para diminuir os potenciais diagnósticos diferenciais.

No entanto, para uma interpretação clínica correta da cinética dos marcadores tumorais, a manutenção dos mesmos métodos de medição é fundamental e as determinações de parâmetros laboratoriais adicionais, como creatinina, transaminases e níveis de Proteína C Reativa (PCR) são úteis para controlar potenciais situações clínicas que levem a falsos positivos, como insuficiência renal e hepática ou inflamações (Holdenrieder *et. al.*, 2016).

No caso da vigilância de recidivas ou progressão da doença, deve ser salientado que os princípios de monitorização de marcadores tumorais, ou seja, a manutenção dos mesmos métodos, e interpretação das alterações em relação aos valores de base individuais e não de acordo com pontos de corte fixos, foram as pré-condições para desenvolver o procedimento de monitorização mais eficiente (Holdenrieder *et. al.*, 2016).

6.4.1 Antígenos Oncofetais

6.4.1.1 Antígeno Carcinoembrionário (CEA)

O antígeno Carcinoembrionário é um antígeno oncofetal, que é usado como um marcador de recidiva tumoral. 30% a 40% de recidivas de carcinoma do colón apresentam valores muito elevados, por outro lado, elevações transitórias são observadas durante a quimioterapia ou imunoterapia adjuvante em indivíduos sujeitos à ressecção tumoral (Chang *et. al.*, 2016).

Tem utilidade no prognóstico e estadiamento de carcinoma do colón. Esta molécula não é um marcador tumoral específico (Molina *et. al.*, 2013).

6.4.1.2 Alfa-fetoproteína (AFP)

A alfa-fetoproteína é uma α I-globulina que é secretada pelos hepatócitos fetais. Fisiologicamente, encontram-se valores elevados em grávidas. A sua síntese aumenta quando os hepatócitos se tornam células tumorais (Raziky *et. al.*, 2013).

É considerada um marcador tumoral de diagnóstico e prognóstico para carcinoma hepatocelular, 70% destes doentes oncológicos apresentam níveis séricos elevados (Hayashi *et. al.*, 2021).

6.4.2 Hormonas

6.4.2.1. Subunidade β da Hormona gonadotrofina coriônica Humana (β -hCG)

A gonadotrofina coriônica humana é uma glicoproteína produzida pelos trofoblastos fetal da placenta durante a gravidez e é secretada para a circulação sanguínea materna (Lenhard *et. al.*, 2012). Esta hormona é constituída por duas subunidades, α e β , enquanto a subunidade α é comum a outras hormonas, a β é exclusiva da hCG. As duas subunidades são codificadas por genes diferentes.

Os tumores trofoblásticos e de células germinativas são produtores de HCG total e a produção apenas da subunidade β tem sido observada em tumores não trofoblásticos, sendo que o principal uso deste marcador tumoral na clínica é a monitorização do tratamento e progressão dos tumores trofoblásticos (Burtis e Bruns, 2014).

6.4.2.2 Calcitonina (CT)

A calcitonina é uma hormona peptídica secretada pelas células C da tiroide em resposta ao aumento da concentração sérica de cálcio. Atua no osso, inibindo os osteoclastos e consequentemente a reabsorção óssea e no rim, diminui a reabsorção do cálcio (Srinivasan, Wong e Karponis, 2020). Aumentos nos níveis de calcitonina estão associados ao carcinoma medular da tiroide (Burtis e Bruns, 2014), já que este tumor se desenvolve a partir das células C da tiroide (Emmertsen, 1985). Concentrações elevadas desta hormona também são encontradas em doentes com outros tipos de tumores como por exemplo tumores carcinoides, carcinoma do pulmão, mama, rim e fígado, e também em patologias não malignas como a doença pulmonar, pancreatite, hiperparatiroidismo, anemia perniciososa, doença óssea e até em situações fisiológicas como a gravidez (Burtis e Bruns, 2014).

6.4.3 Glicoproteínas

6.4.3.1 Antígeno do carcinoma de células escamosas (SCCA)

O antígeno do carcinoma de células escamosas é uma glicoproteína do grupo de inibidores da serina protéase, expressa células normais do epitélio escamoso e em carcinomas de células escamosas. Foram identificados dois genes que dão origem a duas proteínas: a SCCA-1 e SCCA-2. A SCCA-1, quando presente em um carcinoma, inibe a apoptose induzida pela

terapêutica anticancerígena. A função do SCCA-2 está descrita como inibição da catepsina G e quimase dos mastócitos, ou seja, protege as células epiteliais do processo inflamatório provocado pelas protéases (Suminami, Nawata e Kato, 1998).

Níveis aumentados de SCCA são usados para a monitorização e prognóstico de carcinoma de células escamosas em diferentes órgãos, nomeadamente do cérvix, cabeça e pescoço, pulmão, esófago e vulva, já que elevados níveis deste biomarcador são encontrados em indivíduos com estes carcinomas, contudo há evidencia que há um aumento desta proteína em doenças inflamatórias da pele como por exemplo psoríase e dermatite atópica (Chechlinska, 2010).

6.4.3.2 Proteína epididimal Humana (HE-4)

A HE-4 é uma glicoproteína expressa em determinados tecidos, como o epidídimo, traqueia, ovário e endométrio, e é sobreexpressa em carcinoma de ovários e endométrio, sendo que é possível detetar esta proteína no soro de doentes com tumores do ovário. Este biomarcador apresenta elevada sensibilidade para o tumor do ovário, ou seja, permite diferenciar doenças benignas de doenças malignas (sensibilidade de 72,9% e especificidade de 95%), porém a sensibilidade para a deteção de um carcinoma do ovário pode ser aumentada se em conjunto com este se dosear o CA-125 (Li, 2009; Drapkin, 2005).

6.4.4 Glicoproteínas do grupo das mucinas

6.4.4.1 CA 15.3

Este antigénio 15-3 faz parte de uma proteína transmembranar, é um epítipo localizado na proteína mucina I (Moll *et. al.*, 2020). É principalmente utilizado na monitorização terapêutica, na avaliação da progressão de metástases e no prognóstico de doentes diagnosticados com carcinoma da mama, sendo o marcador mais usado deste tipo de tumor (Duffy, Evoy e McDermott, 2010; Burtis e Bruns, 2014).

A sua falta de especificidade para o este carcinoma impede o seu uso para o diagnóstico precoce do carcinoma da mama, e embora sejam encontrados valores elevados desta mucina em pacientes com carcinoma da mama metastizado, níveis elevados podem ocorrer em vários adenocarcinomas, como carcinomas do ovário, pâncreas, estomago e pulmão (Molina *et. al.*, 2013).

6.4.4.2 CA 19.9

O antígeno carboidrato 19.9 é o marcador tumoral mais usado para o diagnóstico de carcinoma do pâncreas em doentes sintomáticos e para a monitorização da terapêutica em doentes diagnosticados com adenocarcinoma pancreático. É sintetizado por células pancreáticas e dos ductos biliares, mas também pode ser produzido pelo epitélio gástrico, endometrial, salivar e do cólon (Scarà, Bottoni e Scatena, 2015).

6.4.4.3 CA 72.4

O CA 72-4 é expresso em carcinomas gastrointestinais, do cólon e ovário, sendo raramente expresso em células de tecidos adultos ou em doenças benignas (Mariampillai *et. al.*, 2017).

A combinação do CEA, CA 19.9 e CA 72.4 aumenta significativamente a sensibilidade sem prejudicar a especificidade no caso de carcinomas gastrointestinais (Ning *et al.*, 2018).

6.4.4.4 CA 125

O CA 125 é uma glicoproteína usada como um marcador tumoral para o diagnóstico e monitorização do carcinoma do ovário, já que é expressa por esse tipo de tumor por estruturas derivadas dos ductos paramesentéricos e células mesoteliais (Molina *et. al.*, 2013), porém sozinha não é o suficiente para fazer o *screening* e o diagnóstico diferencial desse carcinoma, já que possui uma elevada taxa de falsos positivos em doenças ginecológicas benignas (Kim *et. al.*, 2018) e também se encontra aumentada em outros carcinomas, como endometrial, pancreático, pulmonar, da mama e do cólon. A concentração de CA 125 correlaciona-se com o tamanho da massa tumoral e com o estágio em que se encontra (Burtis e Bruns, 2014).

6.4.5 Enzimas

6.4.5.1 Enolase Neuro-Específica (NSE)

Trata-se de uma isoenzima da enzima glicolítica enolase, expressa por neurónios e células neuroendócrinas. É um marcador de carcinomas neuroendócrinos, mais especificamente o carcinoma do pulmão de células pequenas (Lu *et. al.*, 2022), tendo uma boa especificidade e sensibilidade para tal. A sobreexpressão de NSE promove a migração e invasão celular dando origem a metástases (Zha *et al.*, 2021). Dado que os eritrócitos são ricos noutra isoenzima enolase (alfa-gamma) é importante usar o soro como amostra e descartar amostras hemólisadas para evitar falsos positivos (Molina *et. al.*, 2013).

6.4.5.2 Antígeno Específico da Próstata (PSA) total e livre

O Antígeno Específico da Próstata é uma glicoproteína, uma serina protéase, produzida exclusivamente pelas células dos ácinos e dos ductos da glândula prostática e a sua função é liquidificar fluido seminal para promover a mobilidade dos espermatozoides e a dissolução do muco cervical (Pezaro, Woo e Davis, 2014).

Esta glicoproteína é um marcador tumoral importante no diagnóstico precoce, estadiamento e monitorização do carcinoma da próstata, porém não é suficiente para fazer o diagnóstico (Pannek e Partin, 1998) por se verificar que há aumentos em hipertrofias benignas de próstata (Pezaro, Woo e Davis, 2014). Os níveis de PSA dependem da raça e idade (Aranha e Vaishampayan, 2003). Enquanto PSA total traduz a quantidade total de PSA, ou seja, o PSA livre e o PSA complexado com proteínas inibidoras das proteases (alfa 1-antitripsina e alfa 2-macroglobulina), o PSA livre é a população das diferentes formas inativas de PSA (Ferguson *et. al.*, 2019).

Indivíduos diagnosticados com carcinoma da próstata possuem valores menores de PSA livre e maiores de PSA ligada a inibidores de proteases, comparativamente a indivíduos sem tumor, assim, realizam-se as duas medições para que seja possível determinar o rácio PSA livre/PSA total (Burtis e Bruns, 2014).

6.4.6 Citoqueratinas

6.4.6.1 CYFRA 21-1

CYFRA 21-1 é um fragmento da citoqueratina 19, uma proteína estrutural de filamentos encontrados em células epiteliais. A degradação destas células produz fragmentos solúveis que podem ser doseados no sangue de pacientes com carcinomas do pulmão, podendo ser usado como marcador tumoral e de prognóstico, porém não deve ser usado na diferenciação entre doentes com carcinoma do pulmão e indivíduos com doenças respiratórias. (I e CHO, 2015).

6.4.7 Proteínas

6.4.7.1 Oncoproteína HER-2 – Recetor do fator de crescimento epidermal humano

O recetor do fator de crescimento epidermal humano pertence à família de recetores com atividade tirosina cinase, sendo um recetor com uma porção extracelular, transmembranar e intracelular. Ao dimerizar, resulta na autofosforilação dos resíduos de tirosina levando à ativação de uma grande variedade de vias de sinalização que culminam na proliferação celular (Iqbal e Iqbal, 2014). A sobreexpressão do HER-2 ocorre

aproximadamente em 15 a 30% dos carcinomas da mama e 10 a 30% nos carcinomas gastroesofágicos. Esta molécula possui valor de prognóstico. Atualmente, a doentes diagnosticados com carcinomas da mama HER-2 positivo pode-lhes ser administrada terapêutica com inibidores (anticorpos monoclonais direcionados contra o recetor – trastuzumab (Olayioye, 2001)) desta proteína (Iqbal e Iqbal, 2014).

6.4.7.2 Cromogranina A (CGA)

As graninas são proteínas ácidas localizadas nos grânulos secretores de células neuroendócrinas envolvidas na síntese de moléculas sinalizadoras e são libertadas em conjunto com hormonas e neurotransmissores. A Cromogranina é armazenada e libertada em simultâneo com as catecolaminas dos grânulos da medula adrenal ou com a paratormona (PTH) da glândula paratiroideia em resposta a hipocalcemia, sendo a medula adrenal a principal fonte de CGA (D'amico *et. al.*, 2014).

Por estar presente nos tecidos neuroendócrinos, a CGA pode ser usada como um biomarcador útil na monitorização de neoplasias neuroendócrinas (Bottoni, Michele e Scatena, 2015), porém não é um biomarcador robusto já que apresenta uma limitação quanto ao seu valor preditivo. Atualmente, o seu uso na clínica ganhou interesse como biomarcador de doenças cardiovasculares já que concentrações aumentadas de CGA na circulação estão associadas a um mau prognóstico e morte de doentes com síndromes coronárias agudas ou insuficiência cardíaca crónica (Goetze *et al.*, 2014).

É de salientar que a insuficiência renal causa grandes aumentos no valor de CGA, que pode chegar até 30 vezes o valor normal, gastrites e terapêutica com inibidores da bomba de protões podem também levar a um aumento nos níveis de CGA. A CGA não é específica de tumores neuroendócrinos, já que se verificou um aumento do analito em tumores não neuroendócrinos como é o caso de tumores da próstata, pâncreas e colón (Molina *et. al.*, 2013).

6.4.7.3 S100B

As S100 pertencem a uma família de proteínas diméricas que ligam o cálcio, presentes em diversos tecidos (como em células do SNC, da glia, células Schwann, melanócitos, células de Langerhans, musculo esquelético, miocárdio e tecido renal (Molina *et. al.*, 2013)) podendo ser homodímeros (S-100 $\alpha\alpha$ ou S-100 $\beta\beta$) ou heterodímeros (S-100 $\alpha\beta$).

O principal uso clínico para o S100B é a monitorização, estadiamento e prognóstico no melanoma maligno.

6.4.7.4 Pro peptídeo libertador da gastrina (Pro GRP)

O peptídeo libertador da gastrina está amplamente distribuído por todo o sistema nervoso, trato gastrointestinal e pulmonar, e também é produzido pelas células do carcinoma de células pequenas do pulmão (SCLC), no entanto é uma molécula instável no sangue, a sua semi-vida é de 2 minutos, fazendo com que o seu precursor, que apresenta uma maior estabilidade, seja usado como um marcador específico para o SCLC (Molina, Filella e Augé, 2014).

O precursor do peptídeo libertador da gastrina é secretado por tumores neuroendócrinos (Kiseli *et. al.*, 2018) e pode atuar como fator de crescimento autócrino para as células do carcinoma de células pequenas do pulmão (Cavalieri *et. al.*, 2018). É mais sensível do que o NSE para SCLC, porém sugere-se o uso dos dois para a monitorização da terapêutica (Molina, Filella e Augé, 2014).

6.4.7.5 Tiroglobulina (Tg)

A tiroglobulina é uma proteína homodimérica sintetizada no retículo endoplasmático dos tirócitos e as suas funções incluem o armazenamento de iodo e a síntese das hormonas tiroideas, Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) sob estimulação da Hormona estimuladora da tiroide (TSH) (Jeso e Arvan, 2016; Coscia *et. al.*, 2020).

Devem dosear-se os anticorpos anti-tiroglobulina, já que interferem com o imunoensaio de medição da tiroglobulina, e são encontrados, frequentemente em doentes com Carcinoma diferenciado da tiroide.

Os valores séricos de tiroglobulina e de anticorpos anti-tiroglobulina em pacientes diagnosticados com carcinoma diferenciado da tiroide com supressão da hormona tiroideia são geralmente medidos a cada 3 a 6 meses durante o primeiro ano após a terapêutica inicial. Estes parâmetros são úteis no caso de pacientes que foram submetidos a tireoidectomia total, para a monitorização de tiroglobulina residual, já que um aumento na ausência de anticorpos interferentes, pode refletir a presença de tecido maligno. Em pacientes com lobectomia, os níveis séricos de Tg são menos úteis porque não refletem a presença ou ausência de tecido maligno, porque depende do volume remanescente do lobo tireóideo (Prpić *et. al.*, 2018).

6.4.7.6 β 2-microglobulina (BMG)

A β 2-microglobulina é uma proteína de baixo peso molecular, que faz parte do complexo de histocompatibilidade II, sintetizada por todas as células nucleadas. Verificaram-

se aumentos em doenças linfoproliferativas, como o Mieloma Múltiplo (MM), sendo usada como um fator de prognóstico nesta neoplasia, em indivíduos sem comprometimento da função renal, já que no caso de insuficiência renal também há um aumento dos níveis desta proteína. (Bataille, Grenier e Sany, 1984).

6.4.8 Metabolitos

As catecolaminas e a serotonina são aminas biogênicas que ativam a sinalização neuro-hormonal de vários processos fisiológicos. A dopamina e a norepinefrina funcionam como neurotransmissores no cérebro e nos nervos simpáticos periféricos, enquanto a epinefrina funciona como hormona libertada pela medula adrenal (Burtis e Bruns, 2014). A serotonina (5-hidroxitriptamina) atua como um neurotransmissor no cérebro e como um modificador das funções vasculares e gastrointestinais (Burtis e Bruns, 2014). A produção anormal de catecolaminas pode ocorrer em vários tumores neuroendócrinos como feocromocitomas (quando o tumor se localiza na medula adrenal), paragangliomas (em locais extra-adrenais) e neuroblastomas. A produção anormal de serotonina ocorre normalmente em tumores carcinoides, onde os sinais e sintomas cínicos refletem as propriedades farmacológicas das aminas secretadas (Burtis e Bruns, 2014).

Tumores secretores de dopamina são raros e, portanto, a dopamina plasmática e seu metabólito 3-metoxitiramina não são testados rotineiramente (Farrugia *et. al.*, 2017).

6.4.8.1 Metanefrinas e Normetanefrinas

As metanefrinas plasmáticas ou urinárias costumam ser suficientes para estabelecer a presença de feocromocitoma na maioria dos casos, com exceção de tumores pequenos (<1 cm) que não libertam catecolaminas, e de tumores que apenas produzem dopamina (Farrugia *et. al.*, 2017).

As catecolaminas são continuamente libertadas pelos grânulos de secreção e são inativadas pela enzima catecol O-metiltransferase (COMT) em normetanefrina e metanefrina livres. Estas circulam no plasma em baixas concentrações e têm tempos de semi-vida curtos, sofrendo conjugação com sulfato pela isoenzima sulfotransferase (Farrugia *et. al.*, 2017). Em contraste com os metabolitos livres, as metanefrinas sulfatadas estão presentes em concentrações 20 a 40 vezes maiores, possuem o tempo de semi-vida mais longo e são eliminadas por excreção urinária (Farrugia *et. al.*, 2017), permitindo a sua medição no plasma e na urina. O aumento de valores de metanefrinas plasmáticas superiores 4 vezes o limite

superior de referência está associado a cerca de 100% de probabilidade de existência de tumor (Farrugia *et. al.*, 2017).

6.4.8.2 Ácido Vanilmandélico e Ácido Homovanílico

O ácido vanilmandélico (VMA) é o principal produto final do metabolismo da norepinefrina e da epinefrina, enquanto o ácido homovanílico (HVA) é o principal produto final do metabolismo da dopamina. Ambos são excretados na urina em grandes quantidades, tornando sua análise simples, sendo usados para diagnóstico de neuroblastoma (Burtis e Bruns, 2014).

6.4.8.3 Ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA)

O ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) é o produto final do metabolismo da serotonina e reflete melhor o volume tumoral do que a serotonina (Burtis e Bruns, 2014). Tanto a serotonina como o 5-HIAA podem ser usados como marcadores de secreção tumoral para investigar e monitorizar pacientes com síndrome carcinoide. Cerca de 10% da serotonina está localizada nos neurónios do sistema nervoso central, os restantes 90% estão localizados nas células enterocromafins (células neuroendócrinas encontradas no epitélio gastrointestinal e respiratório) (Corcuff *et. al.*, 2017). O 5-HIAA é produzido no fígado e excretado pelo rim, sendo a sua determinação na urina a mais recomendada (Corcuff *et. al.*, 2017).

6.5 Métodos Eletroforéticos

As técnicas eletroforéticas usadas no doseamento de proteínas estão intimamente relacionados com o diagnóstico de gamopatias monoclonais, que incluem uma ampla gama de condições hematológicas que vão desde distúrbios indolentes, como Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) até doenças graves e com risco de vida, como Mieloma Múltiplo (MM) ou Amiloidose de cadeia Leve. A base do diagnóstico e monitorização destes distúrbios é a avaliação de uma imunoglobulina monoclonal anormal, a componente M ou paraproteína, no soro ou na urina, por meio de eletroforese e imunofixação (Tosi *et. al.*, 2013).

Essa imunoglobulina monoclonal, pode ser a imunoglobulina intacta, polímeros de imunoglobulinas, cadeia leve ou pesada livre ou ainda fragmentos de imunoglobulinas. Cerca de 60% das paraproteínas estão associadas a neoplasias de células plasmáticas (Mieloma Múltiplo ou plasmocitoma solitário), cerca de 15% são devido à sobreprodução de linfócitos B, principalmente em gânglios linfáticos ou pacientes com linfomas, leucemia linfocítica, macroglobulinemia de Waldenström (proliferação maligna de células plasmocitárias

produtoras de IgM) ou doença de cadeia pesada (Burtis e Bruns, 2014). Até 25% das paraproteínas são benignas e têm sido denominadas Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) que é caracterizada por concentrações de paraproteína inferior a 3 g/L, plasmócitos clonais na medula óssea inferiores a 10% e falta de evidência de lesão de órgão relacionada à paraproteína. Esta gamapatia pode evoluir para Mieloma Múltiplo (Burtis e Bruns, 2014). A concentração de paraproteína no momento do diagnóstico correlaciona-se frequentemente com a extensão da doença, e a taxa de aumento da concentração é indicativa da expansão do clone que produz a paraproteína (Burtis e Bruns, 2014).

As técnicas eletroforéticas realizadas incluem a eletroforese de proteínas no soro, imunofixação de soro, eletroforese de hemoglobinas e de isoenzimas como a fosfatase alcalina e a lactato desidrogenase e a imunofixação da proteína de Bence Jones na urina de 24 horas.

6.5.1 Eletroforese das proteínas séricas (EPS) – Proteínograma

A eletroforese de proteínas séricas (Proteínograma) é uma técnica usada para a pesquisa de proteínas monoclonais no soro, auxiliando no diagnóstico de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM) e outros distúrbios de proteínas séricas. Em mais de 80% destes pacientes, proteínas anormais podem ser detetadas pela técnica de EPS.

A EPS separa as proteínas séricas em seis frações principais (Figura 18): albumina, alfa-1 globulinas, alfa-2 globulinas, beta-1 globulinas, beta-2 globulinas e gama-globulinas, de acordo com sua carga a um determinado pH (Nordin *et. al.*, 2020). Em comparação com o padrão sérico normal, o paciente com MM geralmente produz um padrão sérico anormal que pode ser avaliado visualmente no gel de EPS e também por eletroferogramas gerados depois de coloração e medição por um densitômetro (Nordin *et. al.*, 2020).

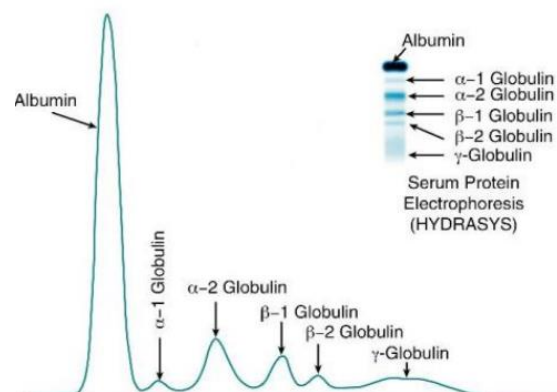


Figura 18 - Perfil eletroforético das proteínas séricas. (Adaptada de: Sebia)

Uma corrente elétrica é aplicada fazendo com que proteínas com carga negativa se movam em direção ao ânodo (polo positivo) e proteínas com carga positiva em direção ao cátodo (polo negativo). Após a separação eletroforética, as proteínas presentes no suporte sólido são coradas com corantes, como negro de amido. A intensidade da coloração das diferentes bandas é proporcional à quantidade de proteína presente em cada banda (Burtis e Bruns, 2014).

É possível interpretar padrões como consistentes com processos particulares de doença, tais como inflamação aguda, síndrome nefrótica, ou crónica na inflamação. Porém a principal aplicação atual do ESP é a deteção ou quantificação de imunoglobulinas monoclonais que ocorrem no mieloma múltiplo. As imunoglobulinas monoclonais geralmente aparecem como aumentos acentuados na região γ (Figura 19) (Burtis e Bruns, 2014).

A confirmação da presença e identificação do tipo de proteína monoclonal pode ser realizada por imunofixação (IF).

6.5.2 Imunofixação (IF)

A Imunofixação (IF) ganhou ampla aceitação como um método imunoquímico usado para identificar proteínas. O primeiro passo consiste na eletroforese em gel de agarose para fazer a separação das proteínas séricas, de seguida faz-se a aplicação de anticorpos específicos anti classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) e anti cadeias livres. Estes ao ligarem-se às proteínas formam um complexo que precipita, sendo posteriormente corado.

Imunoglobulinas policlonais dão origem a bandas difusas, enquanto imunoglobulinas monoclonais resultam numa banda nítida, que apenas reage com um único anticorpo anti cadeia livre e um único anticorpo anti classe de imunoglobulinas permitindo assim a sua identificação, sendo este o seu uso principal num laboratório clínico (Burtis e Bruns, 2014).

6.5.3 Pesquisa da proteína de Bence-jones na urina

Em mais de 75% dos doentes com MM é possível detetar, na urina de 24h, a presença de cadeias leves livre, através da Imunofixação de Bence Jones, que utiliza antissoros específicos anti-cadeias leves livres Kappa e Lambda (Willrich e Katzmann, 2016).

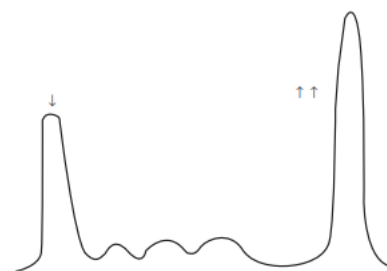


Figura 19 - Alterações no perfil eletroforético das proteínas séricas numa situação de gamopatia monoclonal. (Adaptada de: Eletroforese de Proteínas Séricas Interpretação e correlação Clínica)

7 Virologia

O setor de virologia foi criado em 2020 com o objetivo de dar resposta à pandemia Sars-CoV-2. Assim o trabalho realizado neste setor é a pesquisa do vírus Sars-CoV-2 por RT-PCR e a formulação de novos protocolos para futuro estabelecimento de novas análises.

8 Controlo de Qualidade

Os laboratórios de Análises Clínicas devem fornecer um serviço de alta qualidade, produzindo dados exatos, precisos, relevantes e abrangentes que possam ser aplicados ao tratamento médico dos pacientes.

8.1 Controlo de qualidade Interno (CQI)

O controlo de qualidade interno consiste no conjunto de ações que se destinam a assegurar a qualidade de resultados. O CQI permite o controlo da reprodutibilidade, a identificação de tendências e a incidência de erros fortuitos. Com os valores do CQI obtidos diariamente é realizado um gráfico – Carta de Levey – Jennigs, que é analisado segundo as regras do *Westgard*, que se baseiam em métodos estatísticos.

Os setores de Bioquímica, Hematologia e Imunologia e Hormonologia fazem o controlo diário, no início do dia de trabalho, dos equipamentos com soros comerciais de 3 níveis (baixo, normal e alto), e os resultados são avaliados segundo as regras do *Westgard*. Assim, caso uma regra de atuação não seja cumprida, as medidas adequadas vão ter de ser tomadas.

No Setor de Microbiologia o controlo de qualidade interno baseia-se no controlo diário da temperatura, humidade e CO₂ (quando aplicável) das estufas e frigoríficos e da esterilidade da solução salina. O controlo dos meios de cultura é realizado quando há mudança de lote. Mensalmente é feito o controlo das cartas VITEK, dos discos de antibióticos usados para realizar antibiogramas manuais e do sistema Accelarate Pheno[®] com estirpes ATCC (*American Type Culture Colletion*).

8.2 Controlo de qualidade Externo (CQE)

O controlo de qualidade externo é assegurado pela participação em programas de controlo de qualidade externa. Os setores de Bioquímica, Hematologia e Imunologia e Hormonologia participam em dois programas: o Programa Nacional de Avaliação Externa da

Qualidade (PNAEQ) do Instituto Dr. Ricardo Jorge (INSA); e o *Randox International Quality Assesment Scheme, External Quality Assesment (RIQAS)* da RANDOX Laboratories. Enquanto o setor de Microbiologia participa num programa internacional, o *External Quality Assesment Programmers, LabQuality, Finland*, que avalia as áreas da Bacteriologia e Micologia, e também participa no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do INSA para avaliação da área da Parasitologia.

A participação em programas de avaliação externa da qualidade provoca uma melhoria da qualidade ao longo do tempo (Badrack, 2021).

9 Caso Clínico

História Clínica: Indivíduo do sexo masculino, 59 anos, diagnosticado com adenocarcinoma do reto justa-anal T2N0M0, sujeito a ressecção anterior do reto interesfintérica laparoscópica, em janeiro de 2019 e metastatização para os gânglios linfáticos regionais em agosto de 2021. Diagnosticado com insuficiência renal crônica em dezembro de 2021, realização de nefrostomias bilaterais e colocação de sonda vesical. No dia 13 de abril de 2022 é internado com um quadro suboclosivo intestinal, sujeito a ileostomia lateral. Dia 17 de abril apresenta pico febril e os valores de Proteína C Reativa aumentados.

Médico pede urina tipo II e urocultura.

Resultados Laboratoriais:

Amostra de urina colhida através de drenagem de nefrostomia.

Tabela VIII - Resultados da Urina Tipo II

Urina Tipo II		
Sumária de urina	Resultado	Valor de referência
Densidade	1000	1,016 – 1,022
pH	5,5	4,8 – 7,4
Leucócitos	500 /μL	0 – 10 / μ L
Nitritos	Positivo	
Proteínas	15 mg/dL	0 – 10 mg/dL
Glucose	Normal	0 - 30
Corpos cetônicos	Negativo	0 - 5
Urobilinogénio	Normal	0 - 1
Bilirrubina	Negativo	0,0 – 0,2
Eritrócitos	300 /μL	0 – 5 / μ L
Cor	Amarelo	
Aspeto	Turvo	
Sedimento Urinário		
Células epiteliais	Raras	
Eritrócitos	< 3/ campo	
Leucócitos	10 – 20 /campo	

Exame bacteriológico: **Positivo**

Amostra inoculada por esgotamento quantitativo nos meios de cultura CLED e Columbia CNA.

Verificou-se crescimento em ambos os meios: o meio CLED com 3 tipos de colónias diferentes, umas esverdeadas, umas brancas maiores e outras brancas menores; o meio Columbia CNA com 2 tipos de colónias, umas com β -hemólise e outras com γ -hemolíticas. Considerou-se que as duas colónias presentes na gelose Columbia CNA correspondiam às

colónias brancas no meio CLED. Para os 3 tipos de colónias a contagem foi superior a 10^5 UFC/ml. No meio CLED desenvolveram-se, para além dos cocos Gram positivo que se desenvolveram também em CNA, bacilos Gram negativo (as colónias esverdeadas). Procedeu-se ao isolamento das 3 colónias diferentes (Figura 20). Os bacilos Gram negativo foram isolados para um novo meio CLED; os cocos β -hemolíticos para uma gelose COS (gelose de sangue de carneiro) e os cocos não hemolíticos também para uma gelose COS. Após ± 18 h de incubação a 37°C verificou-se crescimento em todos os meios e que se tratava de colónias puras. Procedeu-se, então, aos testes de identificação: a prova de oxidase para as colónias de bacilos Gram negativo cujo resultado foi positivo; prova da catalase para as 2 colónias de cocos, que para os cocos β -hemolíticos foi positiva e para os cocos γ -hemolíticos foi negativa. Estes resultados direcionam a escolha das cartas de TSA a usar para cada microrganismo.

Fez-se então a identificação e antibiograma dos 3 microrganismos, sendo que os resultados foram:

Bacilos Gram negativo oxidase + com colónias esverdeadas em CLED	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cocos Gram positivo β -hemolíticos catalase +	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Cocos Gram positivo γ -hemolíticos catalase -	<i>Enterococcus faecalis</i>

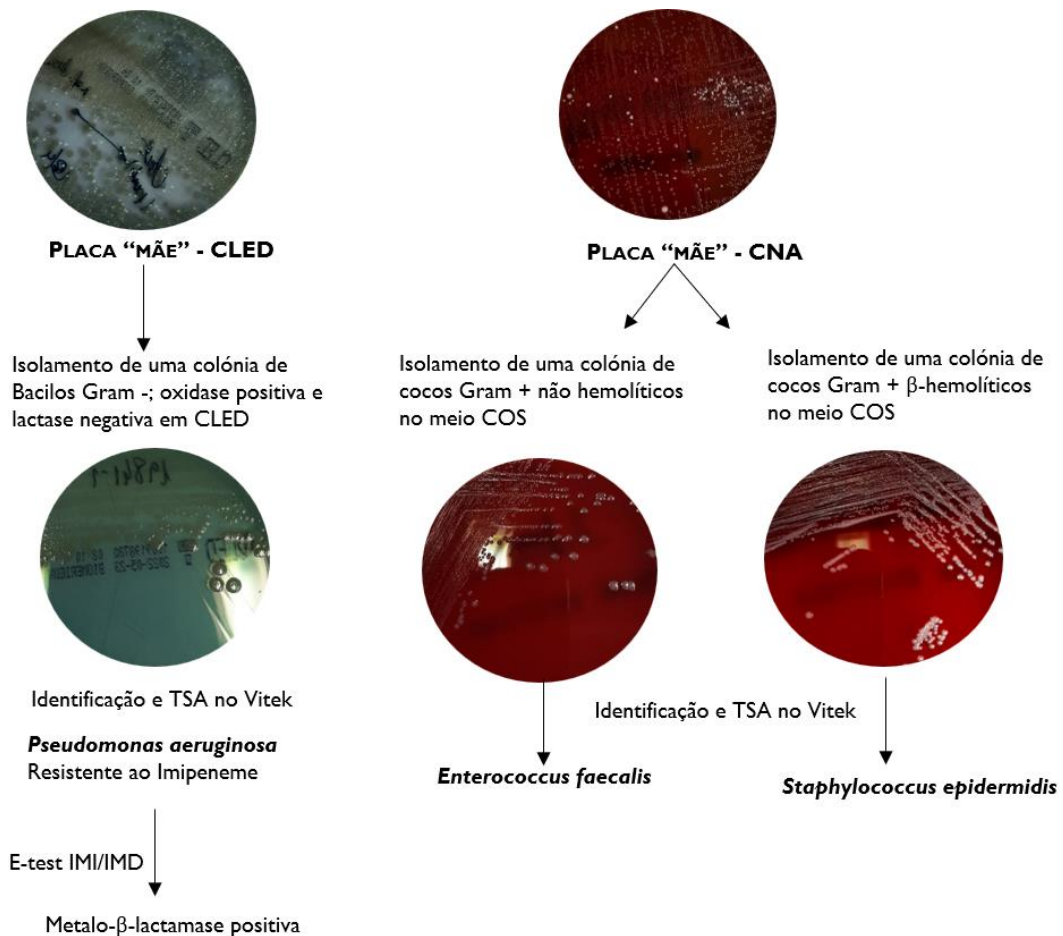


Figura 20- Esquema do processamento da amostra

Resultado do antibiograma:

Pelo antibiograma obtido verificou-se que a *P. aeruginosa* era resistente ao imipeneme (Tabela IX) o que sugere que este microrganismo possa ser produtor de metalo- β -lactamases e, por isso, realizou-se um E-test Imipene/Imipeneme + EDTA que confirmou a presença deste mecanismo de resistência.

Tabela IX - Antibiograma

Agente Antimicrobiano	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>
Amoxicilina		S	R
Amoxicilina/ácido clavulânico		S	R
Ampicilina		S	
Ampicilina/Sulbactam		S	
Cefoxitina			R
Ceftazidima	I		
Ciprofloxacina	R	S	R
Clindamicina			S
Eritromicina			R
Flucloxacina			R
Gentamicina			S
Gentamicina alta concentração (synergy)		S	
Imipeneme	R	I	R
Levofloxacina	R	S	R
Linezolid		S	S
Meropeneme	S		
Nitrofurantoína		S	
Oxacilina			R
Piperacilina/Tazobactam	I	S	R
Teicoplanina		S	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol			R
Vancomicina		S	S

Diagnóstico mais provável: Pielonefrite provocado por *Pseudomonas aeruginosa* Metalobetalactamases positiva, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*.

Discussão:

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é um bacilo Gram negativo oxidase positiva, produtora de pigmentos (pioverdina e piocianina) que originam a cor esverdeada. Outra característica deste bacilo é o brilho metálico que apresenta no agar de sangue de carneiro.

Pseudomonas aeruginosa contribui para 5% a 15% das infecções nosocomiais, nomeadamente pneumonia e bacteriemia e pode ainda causar infecções nosocomiais do trato urinário, endocardites, infecções em queimados e em casos mais raros, meningites.

Esta bactéria pode produzir uma variedade de fatores de virulência como endotoxinas, pili, cápsula e algumas exotoxinas. Além destes fatores de virulência, apresenta resistência intrínseca a alguns agentes antimicrobianos, como penicilina, ampicilina, cefalosporinas de primeira e segunda geração, trimetropim/sulfametoxazol, cloranfenicol e tetraciclina.

Mecanismo de resistência – Metallo-β-lactamases

As metallo-β-lactamases pertencem à classe B Ambler (classificação de β-lactamases) e são enzimas que se ligam não covalentemente ao anel β-lactâmico, inativando-o. Caracterizam-se por necessitar de dois íons divalentes, normalmente o zinco, como co-fator para poderem realizar a reação catalítica. São inibidas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Enterococcus faecalis

E. faecalis é um coco Gram positivo, que coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais. Provoca infecções nosocomiais, sendo a infecção urinária a mais comum. Estas infecções estão muitas vezes associadas a pacientes algaliados e/ou cateterizados.

Staphylococcus epidermidis

S. epidermidis, coco Gram positivo, catalase positiva, é um patógeno oportunista, ou seja, por si só não é responsável por infecções, porém pode provocar infecções pela formação de biofilmes em cateteres ou algalias e, por isso, a maioria das infecções provocadas são infecções do trato urinário nosocomiais. Também pode provocar endocardite em pacientes com válvulas cardíacas.

Neste caso, se a urina tivesse sido colhida pela técnica do jato intermédio e a contagem fosse inferior a 10^5 UFC/ml esta bactéria não era valorizada. Porém trata-se de um paciente com nefrostomias e sonda vesical, daí valorizar-se este estafilococo.

Nefrostomia

O cateter de nefrostomia é colocado diretamente no rim, fica habitualmente localizado na região lombar e fixo à pele. É um procedimento realizado no bloco operatório. A nefrostomia é, frequentemente, necessária para evitar insuficiência renal em doentes oncológicos, com uropatias ou com incontinência. Este procedimento em doentes oncológicos está associado a elevadas taxas de pielonefrite.

Pielonefrite

A pielonefrite normalmente é causada por uma infeção do trato urinário inferior que ascende até ao rim. Entre os sintomas destaca-se febre, náusea e vómitos.

As infeções do trato urinário são as infeções adquiridas em ambiente hospitalar mais comuns, nas quais 95% estão relacionadas com cateterização. O risco para um doente adquirir a infeção depende do tempo de duração da cateterização, da sua manutenção e monitorização, e suscetibilidade do indivíduo. Os microrganismos causadores mais comuns são enterobacterias, enterococos, leveduras e estafilococos (Chen *et. al.*, 2019).

Infeções polimicrobianas, como é caso, são frequentes, e podem estar associadas a cálculos renais, e a microrganismos multirresistentes.

Os resultados da análise sumária de urina corroboram o diagnostico de pielonefrite de causa bacteriana, pois há leucocitúria, proteinúria, hematória, e presença de nitritos.

10 Conclusão

Este relatório e o estágio curricular representam o culminar do meu trabalho realizado durante estes dois anos de mestrado.

O estágio curricular é, sem dúvida, uma mais-valia já que a interligação da componente teórica do mestrado com a realidade de um laboratório de análises Clínicas é fundamental. Durante estes 6 meses além de aplicar os conhecimentos adquiridos durante a o mestrado, obtive novos conhecimentos e competências.

O tempo que estive no SPC do IPOCFG permitiu-me perceber e integrar a dinâmica diária de um laboratório de análises clínicas e a importância da qualidade e rigor do trabalho desenvolvido, já que atrás de cada parâmetro analisado está uma pessoa com a sua história.

Este mestrado e mais especificamente o estágio curricular promoveram o meu crescimento pessoal e profissional, e incentivaram a minha vontade de aprender mais. Sem minimizar todos os ensinamentos teóricos e práticos, a maior lição que retiro deste percurso é a necessidade do espírito crítico em qualquer área, particularmente nas análises clínicas.

Referências Bibliográficas

ARANHA Olivia e VAISHAMPAYAN Ulka - **PSA relapse prostate cancer: the importance of tailored therapy. Urologic Oncology.** 2003. 22(1):62-9

BADRICK Tony - **Integrating quality control and external quality assurance. Clinical Biochemistry,** 2021. 95:15-27.

BAHU Ramez *et. al.* - **Nephrostomy Tube Related Pyelonephritis in Patients with Cancer: Epidemiology, Infection Rate and Risk.** The journal of urology, 2012. 189(1):130-5

BATAILLE R., GRENIER J. E SANY J. - **Beta-2-Microglobulin in Myeloma: Optimal Use for Staging, Prognosis, and Treatment — A Prospective Study of 160 Patients.** Blood, 1984. 63(2):468-76

BERECIARTUA Eburne – **Trace Techonilgy for Assays of Novel Biomarkers.** eJIFCC, 2020. 31(3):254

BISHOP Michael L., FODY Edward P. and SCHOEFF Larry E. – **Clinical Chemistry: Techiques, Principles, Correlations.** 6^oEd., Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1

BOTTONI Patrizia, MICHELE Teresa D e SCATENA Roberto - **A Critical Approach to CLinical Biochemistry of Chromogranin A.** Advances in experimental medicine and biology, 2015. 867:317-23

BURTIS, Carl. e BRUNS, David - **Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics,** 7^a Edição. Missouri: Elsevier, 2014. ISBN 978-1-4557-4165-6.

CAVALIERI Stefano *et. al.* - **Clinical implications for pro-GRP in small cell lung cancer. The International journal of biological markers.** 2018. 33(1):55-61

CHANG Yu-Tang *et. al.* - **A Prospective Study of Comparing Multi-Gene Biomarker Chip and Serum Carcinoembryonic Antigen in the Postoperative Surveillance for Patients with Stage I-III Colorectal Cancer.** PLOS ONE, 2016. 11(10): e0163264

CHECHLINSKA Magdalena *et. al.* - **Squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 expression in cultured normal peripheral blood mononuclear cells and in vulvar squamous cell carcinoma.** Tumor Biology 2010. (6):559-67

CHEN Yejun *et. al.* - **Pathogenic characteristics of nosocomial infections in patients with cerebrovascular diseases and characteristics and treatment of pathogenic bacteria in different seasons,** Journal of infection and public health, 2019. 13(5):800-805

CORCUFF Jean-Benoît *et. al.* - **Urinary sampling for 5HIAA and metanephrines determination: revisiting the recommendations.** Endocrine Connections, 2017. 6(6): R87–R98

COSCIA Francesca *et.al.* - **The structure of human thyroglobulin.** Nature, 2020. 578(7796):627-630.

D'AMICO Maria A. *et. al.* - **Biological function and relevance of chromogranin A and derived peptides.** Endocrine Connections, 2014. 3(2): R45–R54

DRAPKIN Ronny *et. al.* - **Human Epididymis Protein 4 (HE4) Is a Secreted Glycoprotein that Is Overexpressed by Serous and Endometrioid Ovarian Carcinomas.** Cancer research, 2005. 65(6):2162-9

DUFFY Michael J., EVOY Denis E MCDERMOTT Enda W. - **CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer.** Clinica chimica acta, 2010. 411(23-24):1869-74

EMMERTSEN k. - **Medullary thyroid carcinoma and calcitonin.** Danish medical Bulletin, 1985. 32(1):1-28

FARRUGIA F. A. *et. al.* - **Pheochromocytoma, diagnosis and treatment: Review of the literature.** Endocrine regulations, 2017. 51(3):168-181

FERGUSON Jackie *et. al.* - **Continued provision of WHO International Standards for total and free PSA: Content and commutability of replacement preparations.** Clinical Biochemistry, 2019. 10.1016

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

GARCIA Lynne R. - **Clinical Microbiology Procedures Handbook.** 3ª Ed., Washington, American Society for Microbiology, 2010. ISBN: 978-1-5558 1-527- 1

GOCKEL-BLESSING Elizabeth A. - **Clinical Parasitology: A Practical Approach.** 2ª Ed., Missouri, Elsevier, 2013 ISBN: 978-1-4160-6044-4

GOETZE Jens P. *et. al.* - **Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease.** Biomark in medicine, 2014. 8(1):133-40

HAYASHI Masamichi *et. al.* - **Different Characteristics of Serum Alfa Fetoprotein and Serum Des-gamma-carboxy Prothrombin in Resected Hepatocellular Carcinoma.** In Vivo, 2021. 35(3): 1749–1760

HOLDENRIERDER Stefan *et. al.* - **Clinically Meaningful Use of Blood Tumor Markers in Oncology.** BioMed research international, 2016. 9795269

I Hoseok e CHO Je-Yoel - **Lung Cancer Biomarkers.** In: Gregory Makowski. Advances in Clinical Chemistry. Massachusetts: Academic Press, 2015. ISBN: 9780128033142

IQBAL Nida e IQBAL Naveed - **Human Epidermal Growth Fator Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications.** Molecular biology International, 2014. 2014: 852748.

ISO 9000: 2015 - **Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário/ Management systems quality - Fundamentals and vocabular**

JACOBY George A. – **AmpC beta-lactamaes**. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009. 22(1):161-82

JESO Bruno D. e ARVAN Peter - **Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology**, *Endocrine reviews*, 2016. 37(1):2-36

KAUFMAN Stefan H. E. - **Immunology's Coming of Age**. *Fountiers in immunology*, 2019. 10: 684

KIM Boyeon *et. al.* - **Diagnostic performance of CA 125, HE4, and risk of Ovarian Malignancy Algorithm for ovarian cancer**. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2018. 33(1):e22624

KISELI Mine *et. al.* - **Pro-Gastrin Releasing Peptide: A New Serum Marker for Endometrioid Adenocarcinoma**. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2018. 3(6):540-545

KOIVUNEN Marja E. e KROGSRUD Richard L. - **Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories**. *Labmedicine*, vol 37 Number 8, 2006 10.1309

LENHARD Miriam *et. al.* - **Human chorionic gonadotropin and its relation to grade, stage and patient survival in ovarian cancer**. *BCM Cancer*, 2012. 12:2

LI Hui *et. al.* - **Development of a standardized Gram stain procedure for bacteria and inflammatory cells using an automated staining instrument**. *MicrobiologyOpen*, 2020. 9(9):e1099.

LI Jinping *et. al.* - **HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management**. *Expert review of molecular diagnostics*, 2009. 9(6):555-66

LU Li *et. al.* - **Neuron-specific enolase promotes stem cell-like characteristics of small-cell lung cancer by downregulating NBLI and activating the BMP2/Smad/IDI pathway**. *Oncogenesis*, 2022. 11(1): 21

MAHON Connie R.; LEHMAN Donald C. - **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6^a Ed., Missouri, Elsevier, 2019 ISBN: 978-0-323-48218-9

MARIAMPILLAI Anusiyanthan I. *et. al.* - **Cancer Antigen 72-4 for the Monitoring of Advanced Tumors of the Gastrointestinal Tract, Lung, Breast and Ovaries**. *Anticancer research*, 2017. 37(7):3649-3656

MOLINA Rafael *et. al.* – **Clinical value of tumor markers: current status and future prospects III**. Roche Diagnostics International Ltd CH-6343 Rotkreuz Switzerland, 2013.

MOLINA Rafael, FILELLA Xavier e AUGÉ Josep M. - **ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer**. *Clinical Biochemistry*, 2014. 10.1016.

MOLL Sofia A. *et. al.* - **Serum biomarker CA 15-3 as predictor of response to antifibrotic treatment and survival in idiopathic pulmonary fibrosis**. *Biomarkers in Medicine*, 2020. 14(11):997-1007

MURRAY Patrick R.; ROSENTHAL Ken S.; PFALLER Michael A. - **Medical Microbiology**. 8^a Ed., Philadelphia, Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-29956-5

NESTER, Eugene W *et al* – **Microbiology: A Human Perspective**. 7^a Ed., McGraw-Hill, 2012. ISBN 978-0-07-337531-1

NING Shufang *et. al.* - **Clinical significance and diagnostic capacity of serum TKI, CEA, CA 19-9 and CA 72-4 levels in gastric and colorectal cancer patients**. *Journal of Cancer*, 2018. 9(3):494-501

NORDIN Fatimah D. A. *et. al.* - **Performance comparison of EasyFix G26 and HYDRASYS 2 SCAN for the detection of serum monoclonal proteins**. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020. 34(6): e23254

OLAYIOYE Monilola A. - **Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members.** Breast Cancer Research, 2001. 3(6): 385–389

OWEN Judith A., PUNT Jenni and STRANFORD Shron A. – **Kuby Immunology.** 7^a Ed., New York, W. H. Freeman & Company. ISBN-13: 978-14641-3784-6

PANNEK J. E PARTIN A. W. - **The role of PSA and percent free PSA for staging and prognosis prediction in clinically localized prostate cancer.** Seminars in urologic oncology. 1998. 16(3):100-5

PATERSON Gavin K., HARRISON Ewan M., and HOLMES Mark A. - **The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** Trends in Microbiology, 2014 22(1):42-7

PEZARO C., WOO H. H. E DAVIS I. D. - **Prostate cancer: measuring PSA.** Internal medicine journal, 2014. 44(5):433-40

PRPIĆ Marin *et. al.* - **Thyroglobulin as A Tumor Marker in Differentiated Thyroid Cancer – Clinical Considerations.** Acta Clinica Croatica, 2018. 57(3): 518–527.

PRPIĆ Marin *et. al.* - **Thyroglobulin as A Tumor Marker in Differentiated Thyroid Cancer – Clinical Considerations.** Acta Clinica Croatica, 2018. 57(3): 518–527.

RAZIKY Maissa El *et. al.* - **Hepatic fibrosis and serum alpha-fetoprotein (AFP) as predictors of response to HCV treatment and factors associated with serum AFP normalisation after treatment.** Arab Journal of Gastroenterology, 2013. 14(3):94-8

SCARÀ Salvatore, BOTTONI Patrizia e SCATENA Roberto - **CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects.** Advances in experimental medicine and biology, 2015. 867:247-60

SRINIVASAN Akash, WONG Felyx K. e KARPONIS Dimitrios - **Calcitonin: A useful old friend.** Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 2020. 20(4): 600–609

SUMINAMI Y., NAWATA S. E KATO H. - **Biological Role of SCC Antigen.** Tumor Biology, 1998. 9(6):488-93

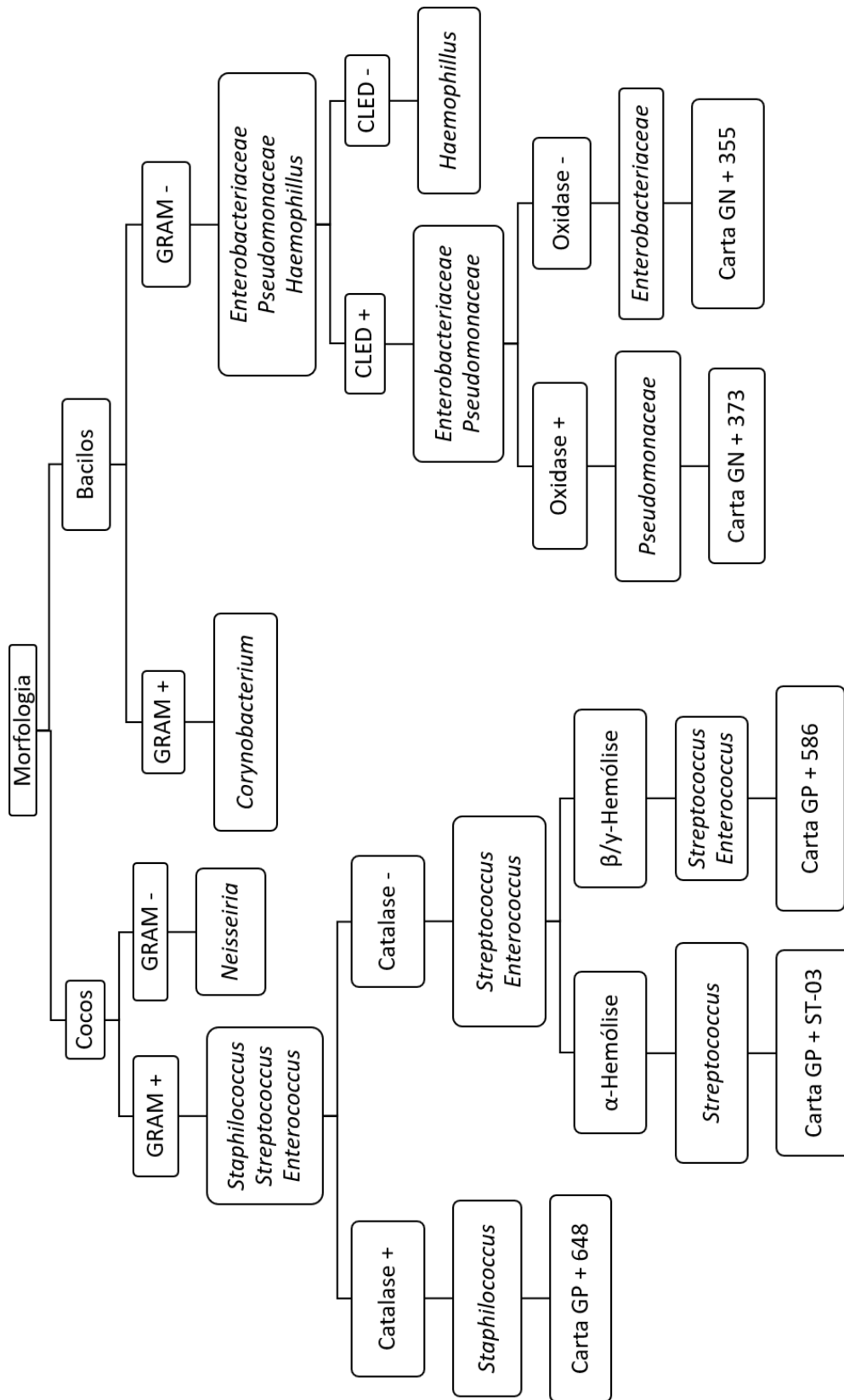
TOSI Patrizia *et. al.* - **Serum free light-chain assay for the detection and monitoring of multiple myeloma and related conditions**, *Therapeutic Advances in Hematology*, 2013. 4(1): 37–41

WILLRICH Maria A. e KATZMANN Jerry A. - **Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias**. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2016. 54(6):907-19

ZHA Zhiqiang *et. al.* - **Neuron specific enolase promotes tumor metastasis by activating the Wnt/ β -catenin pathway in small cell lung cancer**. *Translational Oncology*, 2021. 14(4): 101039

ANEXOS

Anexo I



Anexo II

Equipamento	Método de detecção do imunocomplexo	Parâmetros Analisados
ADVIA Centaur XPT da Siemens Healthineers [®]	Quimioluminescência	Androstenediona
		CKMB
		Estradiol
		Ferritina
		FSH
		hCG
		LH
		Mioglobina
		NT-proBNP
		Progesterona
		Prolactina
		PSA
		PSA livre
		PTH
		Testosterona
		Troponina I
Immulite 2000 XPI da Siemens Healthineers [®]	Quimioluminescência	TSH
		Vitamina D
		AFP
		Beta-2 Microglobulina
		CEA
		Eritropoietina
		Gastrina
		hCG
Cobas 6000 e601 da Roche Diagnostics [®]	Eletroquimioluminescência	IGF-I
		TSI
		ACTH
		Anti-TG
		Anti-TSH-R
		CA 19.9
		CA 72.4
		CA 125
		Calcitonina
		Cyfra 21-1
		Cortisol
		DHEA-S
		Folato
		HE4
		IL-6
		Insulina
Osteocalcina		
Peptideo-C		
ProGRP		
S-100		
T3		

		T4
		T3 livre
		T4 livre
		Tiroglobulina
		Vitamina B12
<i>Brahms Kryptor Gold</i> da TermoFisher Scientific [®]	TRACE	CA 15-3
		Cromogranina A
		NSE
		Procalcitonina
		Prolactina
		SCC
<i>Atellica NEPH 630</i> da Siemens Healthineers [®]	Nefelometria	AAG
		AAT
		C3
		C4
		Haptoglobina
		IgG, IgA, IgM
		Transferrita
		PCR
		Recetores solúveis da transferrina
<i>Optilite</i> da Binding Site [®]	Turbidimetria	IgA, IgA Lambda, IgA Kappa
		IgG, IgG4, IgG Lambda, IgG Kappa
		IgD
		IgM
		Cadeias Lambda livre
		Cadeias Kappa Livre
<i>IDS-iSYS</i> da Immunodiagnostic Systems [®]	Luminescência	Aldosterona
		Renina
		Serologia infecciosa
		Testosterona Livre
		Serologia infecciosa (EBV, CMV, HSV, toxoplasma...)