



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia Silva Antunes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Mário João Roque e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia Silva Antunes

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor Mário João Roque e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, entre dezembro e fevereiro de 2021, e no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, entre maio e setembro de 2021.

Outubro de 2021

Agradecimentos

Começo por agradecer a todos aqueles que me acompanharam e apoiaram durante o período de estágio e de conclusão do mestrado.

Agradeço à Professora Ana Miguel Matos, Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, por toda a ajuda e disponibilidade que manifestou durante o mestrado, e por me receber no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra.

Ao meu orientador, Professor Mário João Roque, por me dar a possibilidade de estagiar no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, pela sabedoria transmitida, disponibilidade e orientação prestada durante o estágio e elaboração deste relatório.

O meu agradecimento a todos os técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, pela transmissão de conhecimentos e companheirismo que contribuiu para a minha adaptação, e a toda a equipa do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19), pela forma como fui recebida e integrada como sendo um deles, não esquecendo os meus colegas de estágio que tiveram um papel fundamental durante este percurso.

À minha família e em particular aos meus pais, Henrique e Celínea, pelo apoio incondicional e por nunca desistiram de mim, sem eles nada teria sido possível. Ao meu irmão Miguel, por nunca deixar de acreditar em mim. À Patrícia e a todos aos meus amigos, por todo o apoio e incentivo que me deram, e por todos os momentos passados juntos.

Agradeço a todos os que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

Índice

Introdução	1
------------------	---

Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

1. Caracterização do Laboratório	2
1.1. Dados e Considerações Gerais	2
1.2. Fluxo de Utentes	2
1.3. Estrutura Física e Equipamentos	2
2. Fase Pré-analítica	3
3. Fase Analítica	6
3.1. Setor de Bioquímica	6
3.1.1. Glicose e Diagnóstico da Diabetes	8
3.1.2. Estudo do Metabolismo dos Lípidos	11
3.1.3. Estudo do Metabolismo do Ferro	14
3.1.4. Avaliação da Função e Lesão Hepática	16
3.1.5. Avaliação da Função Renal	21
3.1.6. Marcadores de Lise Muscular e Lesão Cardíaca	24
3.1.7. Estudo do Equilíbrio Hidroeletrólítico	26
3.1.8. Outros Analitos de Interesse	30
3.2. Setor de Imunologia	31
3.3. Setor de Hematologia	31
3.4. Setor de Microbiologia	32
3.4.1. Exame Bacteriológico	32
3.4.2. Diagnóstico da Infecção Urinária	37
3.5. Controlo de Qualidade	39
4. Fase Pós-Analítica	40

Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19)

1. Caracterização do Laboratório	41
1.1. Dados e Considerações Gerais	41
1.2. Testes Realizados e Fluxo de Amostras	41
1.3. Equipamentos e Estrutura Física	42
2. A COVID-19 E O SARS-CoV-2	43
2.1. Caracterização Genómica e Estrutural	44

2.2. Mecanismo de Infecção	45
2.3. Transmissão e Manifestações Clínicas	45
2.4. Métodos de Diagnóstico	46
3. Fase Pré-Analítica	47
4. Fase Analítica	48
4.1 RT-PCR	48
4.1.1. Inativação das Amostras	49
4.1.2. Abbott m2000 RealTime System	50
4.1.3. Controlo da Qualidade	53
4.1.4 Abbott Alinity m	54
4.2 Testes Rápidos	55
4.3 Teste Serológico	56
5. Fase Pós-Analítica	58
Conclusão	60
Bibliografia	61
Anexos	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Técnicas e funções dos equipamentos usados nos setores de Hematologia, Bioquímica/Imunologia e Microbiologia	3
Tabela 2 - Ordem da colheita e características dos tubos de colheita de sangue utilizados no LACCSMC (cor da tampa, aditivo, uso, tipo de amostra)	5
Tabela 3 - Variáveis pré-analíticas	6
Tabela 4 - Características e função dos meios de cultura utilizados no LACCSMC	35
Tabela 5 - Equipamentos existentes no LACUC utilizados no setor COVID-19 e a sua respectiva função	42
Tabela 6 - Interpretação dos resultados de RT-PCR e da detecção de IgM e IgG	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Architect ci8200	7
Figura 2 - ADAMS A1c HA-8160	7
Figura 3 - Sistema de Identificação BD BBL Crystal	37
Figura 4 - Crescimento de <i>E. coli</i> (A), <i>Proteaeae</i> (B), <i>Enterococcus</i> (C), KESC - <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i> (D) no meio cromogêneo CPE Elite	39
Figura 5 - Representação esquemática da organização do genoma e dos domínios funcionais do vírus SARS-CoV-2	44
Figura 6 - Representação da estrutura viral do SARS-CoV-2	45

Abreviaturas

ADP	Adenosina Difosfato
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
Ag-RDT	Teste de Antígeno de Detecção Rápida
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CK	Creatina Cinase
CLIA	Imunoensaio de Quimioluminescência
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRP	Proteína C Reativa
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELFA	Ensaio Imunoenzimático por Fluorescência
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPI	Equipamento de Proteção Individual
Fc	Fração Constante do Anticorpo
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
GGT	Gama-glutamil Transferase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IDL	Lipoproteínas de Densidade Intermédia
Ig	Imunoglobulina
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
LACCSMC	Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra
LACUC	Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra
LDH	Lactato Desidrogenase

LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LFA	Ensaio de Fluxo Lateral
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH	Hormona Paratiróide
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
Th	<i>Threshold Line</i>
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

Resumo

Neste relatório estão apresentadas as atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade Farmácia de Coimbra (FFUC). O estágio foi realizado em dois laboratórios distintos, no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC) e no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC). Neste relatório é feita uma abordagem geral dos dois locais de estágio e da sua rotina laboratorial, descrevendo amostras, equipamentos, metodologias e parâmetros determinados, assim como os procedimentos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. A importância dos controlos de qualidade é destacada e é descrita a importância das análises clínicas no diagnóstico e monitorização de doenças.

O estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra permitiu o contacto com as quatro valências das Análises Clínicas (Hematologia, Imunologia, Bioquímica e Microbiologia), no entanto, no relatório são abordadas com maior detalhe as valências de Bioquímica e Microbiologia. O estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra foi exclusivamente dedicado ao diagnóstico e monitorização da infeção por *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

Palavras-Chave: Laboratório, Diagnóstico, Bioquímica, Microbiologia, SARS-CoV-2

Abstract

This report presents the activities developed throughout the curricular internship under the Master of Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of Coimbra (FFUC). The internship was carried out in two different laboratories, in the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC) and in the Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC). In this report is made a general approach of the two internship sites and their laboratory routine, describing samples, equipment, methodologies and parameters determined, as well as the pre-analytical, analytical and post-analytical procedures. The importance of quality controls is highlighted and the importance of clinical analyses in the diagnosis and monitoring of diseases is described.

The internship at the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra allowed the contact with the four valences of Clinical Analyses (Hematology, Immunology, Biochemistry and Microbiology), however, the report addresses in greater detail the valences of Biochemistry and Microbiology. The internship at the Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra was exclusively dedicated to the diagnosis and monitoring of *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

Keywords: Laboratory; Diagnosis, Biochemistry, Microbiology, SARS-CoV-2

Introdução

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades realizadas durante o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, realizado em dois laboratórios em períodos distintos: Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC) e Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC).

Para além da aquisição de muitas novas competências relativas às atividades desenvolvidas num laboratório de análises clínicas, o estágio permite reunir os conhecimentos teóricos adquiridos durante o mestrado à prática laboratorial.

O presente relatório está dividido em duas partes. Uma primeira parte sobre as atividades executadas no LACCSMC, onde tive a oportunidade de trabalhar nas quatro valências do laboratório (Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia). No entanto, no relatório são abordadas com maior detalhe apenas as valências de Bioquímica e Microbiologia. A segunda parte do relatório é dedicada às atividades que realizei no LACUC, onde o estágio foi exclusivamente dedicado a técnicas de diagnóstico e monitorização da infeção por *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

As análises clínicas são o principal recurso utilizado por médicos para avaliar as condições de saúde do paciente. É estimado que 70% das decisões médicas sejam baseadas em resultados de exames laboratoriais.¹ Os resultados das análises clínicas permitem chegar a um diagnóstico preciso e, dessa forma, tomar decisões médicas mais assertivas. Permitem a monitorização de terapêuticas e fazer o prognóstico de determinadas patologias. Além disso, a realização de exames de rotina em indivíduos aparentemente saudáveis funciona como forma de prevenção, permitindo muitas vezes um diagnóstico precoce e evitar a eventual evolução de uma patologia.

A pandemia da COVID-19 veio demonstrar a grande importância das análises clínicas e como estas foram fundamentais para as ações de controlo e combate à doença. No mesmo sentido, ficou demonstrada a grande importância dos profissionais que trabalham nesta área.

Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC)

I. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

1.1. Dados e Considerações Gerais

O Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, localizado na Rua Vandelli, tem como propósito o apoio sanitário às forças de segurança e a várias unidades militares. Desta forma, o LACCSMC presta serviço a indivíduos que representem atualmente ou que já representaram o Exército Militar Português, GNR, PSP, e aos seus familiares diretos.

O horário de funcionamento é das 8h00 às 12h30 e das 14h00 às 17h00 durante os dias úteis. O serviço era assegurado por quatro técnicos superiores, uma assistente administrativa e a direção técnica está a cargo do Dr. Mário João Roque, Coronel, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas e Mestre em Saúde Pública.

1.2. Fluxo de Utentes

Durante o período de estágio o fluxo de amostras foi bastante variável. Na maior parte dos dias eram processadas cerca de 30 amostras, mas em casos pontuais o número de amostras aumentava para cerca de 60 amostras diárias.

São realizadas análises de rotina a utentes que se dirigem ao laboratório e, ocasionalmente, a militares no contexto de Provas de Aptidão Física, Provas de Seleção e Recrutamento, em situações de Aprontamento e Retração de missões no estrangeiro, e a Tropas Especiais em treinamento. É ainda feito o despiste do consumo de drogas de abuso a militares e candidatos ao Exército. Desta forma é necessário que o laboratório esteja preparado e tenha uma capacidade de resposta aumentada para as situações referidas.

1.3. Estrutura Física e Equipamentos

O laboratório é constituído por vários espaços funcionais. É composto por: área de receção, sala de espera, área administrativa, sala de colheitas, sala de lavagens, gabinete do diretor técnico, zona de frigoríficos e armazenamento de stocks, e 3 salas destinadas aos setores de Hematologia, Bioquímica/Imunologia e Microbiologia.

Todos os setores estão ligados a um sistema informático que garante a comunicação constante entre eles. O trabalho nos diversos setores, exceto no setor de Microbiologia, está em grande parte automatizado. Os equipamentos utilizados no LACCSMC estão apresentados na Tabela I.

Tabela I: Técnicas e funções dos equipamentos usados nos setores de Hematologia, Bioquímica/Imunologia e Microbiologia

Setor	Equipamento	Técnica	Determinação
Hematologia	CELL-DYN Ruby	Tecnologia MAPSS (Separação e Dispersão Polarizada com Vários Ângulos Multiangular)	Hemograma Contagem de Reticulócitos
	BD Vacutainer® Sedi-15™	Westergren	Velocidade de Sedimentação
	Yumizen G400	Turbidimetria	Testes de Coagulação
Bioquímica / Imunologia	Architect ci8200	Fotometria, Potenciometria, Turbidimetria, Nefelometria	Parâmetros Bioquímicos e Imunológicos Análises Toxicológicas
	ADAMS A _{1c} HA-8160	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	Hemoglobina Glicada (HbA _{1c})
Microbiologia	URIT-500C	Fotometria	Análise Sumária de Urina (Urina tipo II)

2. FASE PRÉ-ANALÍTICA

A fase pré-analítica engloba todas as etapas desde a chegada do utente com a requisição médica ao laboratório até ao processamento laboratorial das amostras.

O utente ao chegar ao LACCSMC dirige-se à zona de receção com a requisição médica das análises clínicas. Primeiramente é feito o registo dos seus dados e das análises requeridas pelo médico no sistema informático, o Clinidata XXI da MaxData. Este sistema

informático é utilizado durante todo o processo laboratorial, desde o registo das análises à validação dos resultados.

Feito o registo é atribuído um número identificativo a cada utente e são impressas etiquetas com o código de barras, correspondente ao número identificativo, e o nome do utente. Estas etiquetas são usadas para identificar as amostras colhidas e são lidas posteriormente nos equipamentos dos diversos setores, identificando o utente e em alguns casos as análises que são necessárias realizar.

Na sala de colheitas o técnico é responsável por fazer as colheitas de sangue e a receção das amostras biológicas que são colhidas fora do laboratório, tais como: urina, fezes, expetoração, exsudatos purulentos, raspados de unhas e pele.





De forma a tornar as colheitas sanguíneas um processo mais simples, é elaborada uma folha de colheitas para cada utente, que indica as análises solicitadas e os tubos de colheita necessários. No LACCSMC as colheitas de sangue são maioritariamente feitas com o sistema de vácuo, em que o uso de tubos de vácuo reduz o risco de exposição do técnico ao sangue e facilita a colheita para múltiplos tubos através de uma punção venosa.² Para evitar a contaminação entre os aditivos de cada tubo de colheita é necessário que esta seja feita numa ordem específica.² A ordem recomendada e as características dos tubos utilizados no LACCSMC, incluindo a cor da tampa que auxilia a sua identificação, estão apresentadas na Tabela 2.

É importante que seja feita uma correta etiquetagem dos tubos no momento da colheita pelo técnico. Por fim as amostras devidamente identificadas são encaminhadas para os diferentes setores onde serão realizadas as análises.

Em determinadas situações, por exemplo, quando os utentes de uma unidade militar não se podem dirigir ao laboratório, as colheitas são realizadas nessa unidade e as amostras são transportadas para o LACCSMC.

As várias valências têm os equipamentos necessários para realizar os parâmetros que são frequentemente solicitados ao laboratório, no entanto, quando surgem nas requisições médicas análises menos comuns e não havendo os meios necessários para a sua determinação, as amostras são enviadas para um laboratório externo com o qual o LACCSMC tem protocolo. O mesmo acontece nos casos em que é necessário fazer a confirmação de um resultado por uma diferente metodologia. Existe um manual fornecido pelo laboratório externo com as indicações das condições de armazenamento requeridas para fazer o transporte das amostras.

Tabela 2: Ordem da colheita e características dos tubos de colheita de sangue utilizados no LACCSMC (cor da tampa, aditivo, uso, tipo de amostra)

Ordem	Cor da Tampa	Aditivo	Uso	Tipo de Amostra
1°	Azul 	Citrato de Sódio	Provas de Coagulação	Plasma
2°	Amarelo 	Gel Separador e Ativador de Coágulo (sílica)	Química e Imunologia	Soro
3°	Roxo 	EDTA Tripotássico	Hemograma, Hemoglobina Glicada	Sangue Total
4°	Preto 	Citrato de Sódio	Velocidade de Sedimentação	Sangue Total

A maior percentagem de erros laboratoriais ocorre na fase pré-analítica, devido principalmente a um maior envolvimento humano. O mesmo não acontece nas outras fases (fase analítica e fase pós-analítica) porque, devido aos avanços tecnológicos, encontram-se mais automatizadas e informatizadas.¹

Existem inúmeras variáveis pré-analíticas que podem contribuir para erros laboratoriais, estas podem estar associadas ao paciente, à colheita e também ao manusear das amostras.³ Algumas destas variáveis estão apresentadas na Tabela 3.

É muito importante uma correta preparação do utente para a colheita de forma a evitar erros. Para tal deve haver uma estreita comunicação entre o técnico e o utente de modo a serem passadas as informações necessárias para um procedimento correto.

Certos analitos podem ser influenciados por vários fatores como o estado de jejum, ingestão recente de alimentos, atividade física e medicamentos.³

Estudos indicam que os resultados das análises laboratoriais têm um impacto de 70% nas decisões clínicas relacionadas à administração de fármacos e à admissão ou alta

hospitalar. Desta forma, erros laboratoriais podem ter grande influência na segurança dos utentes e nos orçamentos laboratoriais e hospitalares.¹

Tabela 3: Variáveis pré-analíticas (adaptado de: Zemlin, A., 2018)

Variáveis do Paciente	Variáveis da Colheita das Amostras	Variáveis do Manuseamento das Amostras
Dieta		Lipémia
Idade	Postura	Hemólise
Massa corporal	Variação diurna	Centrifugação
Género	Torniquete	Armazenamento (Temperatura, Luz
Medicação	Capilar vs. Venoso	Solar, Evaporação)
Grávidez	Estado de jejum	Etiquetagem/Identificação
Exercício Físico	Escolha do tubo	Tempo de Processamento
Desidratação		Condições de transporte

3. FASE ANALÍTICA

A fase analítica envolve a execução do teste laboratorial, ou seja, a medição do analito. Devido às melhorias nos ensaios laboratoriais, automação e práticas de controlo de qualidade, esta fase tem a menor frequência de erros.³

Nesta secção estão descritos os setores do LACCSMC (bioquímica, imunologia, hematologia e microbiologia).

3.1. SETOR DE BIOQUÍMICA

A bioquímica é o ramo da ciência que se dedica ao estudo e análise de reações químicas e moleculares com importância biológica, permitindo perceber a correlação entre a nutrição, metabolismo e genética com os estados de doença.⁴ Para tal é necessário fazer o doseamento das moléculas biologicamente importantes presentes nos fluidos corporais, sendo o seu resultado essencial para o diagnóstico e acompanhamento de patologias, e para o monitoramento da terapêutica.⁵ Tudo isto é possível devido aos avanços científicos e à identificação de marcadores bioquímicos que permitem avaliar o estado e a função de um órgão, ou avaliar um processo biológico do ser humano. Posteriormente, todos os parâmetros determinados neste setor no LACCSMC serão agrupados e descritos.

A bioquímica é dos setores que está mais automatizado. Os analisadores bioquímicos variam de grandes equipamentos, capazes de realizar múltiplos testes em simultâneo, até equipamentos relativamente simples projetados para medir apenas um ou poucos analitos. Em geral, os analisadores bioquímicos geram resultados confiáveis e em curtos intervalos de tempo.

À exceção da hemoglobina glicada (HbA1c), as análises bioquímicas no LACCSMC são realizadas no Architect ci8200 da Abbott Diagnostics (Figura 1). Este equipamento apresenta dois módulos, um realiza os testes bioquímicos (c8000) e outro realiza os testes imunológicos (i2000SR). O doseamento dos parâmetros bioquímicos é feito no módulo Architect c8000 por metodologias como a espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria e nefelometria.

A determinação da HbA1c é realizada no equipamento ADAMS A1c HA-8160 da ARKRAY (Figura 2) pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A amostra utilizada é o sangue total, colhido no tubo com EDTA tripotássico.

No Architect ci8200, a amostra mais utilizado é o soro, mas também se utiliza amostras de urina para a determinação de alguns parâmetros. A amostra sanguínea é colhida para o tubo com ativador do coágulo e gel separador. Para haver uma correta retração do coágulo é necessário esperar cerca de 15 minutos após feita a colheita, e só depois a amostra pode ser centrifugada, havendo a separação do soro.



Figura 1: Architect ci8200 (fonte: Abbott Diagnostics)



Figura 2: ADAMS A1c HA-8160 (fonte: ARKRAY)

No setor de bioquímica, ao início do dia, é necessário fazer a verificação e ajuste dos níveis de consumíveis e reagentes. De seguida, no equipamento Architect ci8200, faz-se a manutenção diária e executa-se o controlo interno de qualidade dos parâmetros bioquímicos, utilizando dois níveis de controlo diferentes. Os controlos diários são interpretados nos gráficos de Levey-Jennings e validados de acordo com as regras de Westgard. Se necessário são feitas as calibrações dos parâmetros. Depois de controlar

devidamente todos os parâmetros, o soro pode ser analisado. No equipamento ADAMS A1c HA-8160 é apenas necessário realizar o controlo interno uma vez por semana, usando dois níveis de controlo diferentes, e a manutenção é feita diariamente ao fim do dia, depois de processar todas as amostras.

No fim das amostras de soro serem processadas é feita a seroteca, ou seja, é armazenada uma alíquota do soro numa arca a -80°C , pelo tempo mínimo de cinco anos.

3.1.1. Glicose e Diagnóstico da Diabetes

O fornecimento contínuo de energia e a homeostase da glicose é fundamental para a manutenção da vida. Em circunstâncias normais a glicose é a única fonte de energia que o cérebro utiliza e é também a fonte preferencialmente utilizada pelo músculo durante as fases iniciais do exercício.⁶ Os níveis de glicose no plasma demonstram o balanço entre, por um lado, o aporte alimentar e a síntese endógena de glicose e, por outro, a sua utilização pelos tecidos.⁵

A insulina e o glucagão são as principais hormonas que regulam a concentração plasmática de glicose, interferindo no metabolismo no fígado, tecido adiposo e músculo. Quando há um aumento da síntese de insulina ocorre um aumento da captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina, principalmente pelo músculo esquelético. A insulina ativa as vias e processos envolvidos na captação e armazenamento de combustíveis metabólicos, e inibe as vias envolvidas na degradação dos mesmos. O glucagão tem a função inversa.^{5,6}

A diabetes mellitus é uma doença que se caracteriza por um complexo conjunto de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia. A hiperglicemia pode ser causada por defeitos na ação e secreção de insulina e pode levar a complicações vasculares. Atualmente, existem quatro tipos clínicos da diabetes mellitus: Diabetes tipo I (A e B); Diabetes tipo 2; Diabetes gestacional; Outros tipos específicos de diabetes.⁷

A diabetes tipo I resulta da destruição das células beta dos ilhéus de Langerhans, produtoras de insulina no pâncreas, levando à insulinopenia absoluta. Devido à ausência de insulina a glicose não pode entrar nas células dependentes de insulina, passando a ser indispensável a insulinoterapia para garantir a sobrevivência. O tipo IA (autoimune) resulta da destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina por um mecanismo autoimune. A presença de 2 ou mais autoanticorpos típicos constituem o diagnóstico da doença. Em certos casos não há presença de marcadores imunes, passando nestes casos a denominar-se por diabetes tipo I B (idiopática), que são situações onde não há uma causa

definida. A diabetes tipo I corresponde a 5-10% de todos os casos de diabetes e é, em regra, diagnosticada na infância e adolescência.^{8,9}

A diabetes tipo 2 é a forma mais frequente de diabetes, corresponde a 90-95% dos casos de diabetes e manifesta-se principalmente em adultos. Trata-se de um distúrbio que resulta da existência de insulinopenia relativa, com um maior ou menor grau de resistência à ação da insulina. Ou seja, ocorre uma resistência dos tecidos à ação da insulina e a incapacidade das células beta pancreáticas em compensar essa resistência à insulina. Isto leva à diminuição da captação de glicose pelas células, o que resulta num aumento da produção de glicose hepática contribuindo ainda mais para o aumento da glicemia. As principais causas deste tipo de diabetes estão relacionadas à obesidade e estilo de vida sedentário.^{7,8}

A diabetes gestacional corresponde à alteração dos níveis de glicose durante a gestação e ocorre normalmente no segundo ou terceiro trimestre da gravidez. Um dos fatores de risco para o seu desenvolvimento é o ganho excessivo de peso.⁸

Os outros tipos específicos de diabetes devem-se a situações em que a diabetes é resultado de um processo patogénico identificado menos comum, por exemplo, pode dever-se a: defeitos genéticos da célula beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias diversas e diabetes induzida por químicos ou fármacos.^{7,8}

▪ **Glicemia**

A determinação da glicemia é o primeiro exame solicitado em pacientes com suspeita de diabetes mellitus e é importante no seu diagnóstico.

A determinação da glicemia, no Architect ci8200, baseia-se num ensaio enzimático que utiliza a hexocinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase. A glicose por ação da hexocinase é fosforilada formando-se glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato é oxidada pela glicose-6-fosfato-desidrogenase produzindo 6-fosfogluconato, havendo a redução de NAD⁺ a NADH que pode ser medido espectrofotometricamente a 340 nm e é diretamente proporcional à concentração de glicose.

O principal interferente na determinação da glicemia é a não separação do plasma/soro das células sanguíneas, pois causa uma diminuição progressiva dos níveis de glicose.

▪ **Hemoglobina Glicada (HbA1c)**

A quantificação da HbA1c pode ser usada para o diagnóstico da diabetes e para monitorar os níveis de glicemia de pacientes diagnosticados.⁶ A HbA1c é determinada no

equipamento ADAMS A1c HA-8160 por HPLC, numa amostra de sangue total colhido para tubo com EDTA e sem necessidade de jejum do paciente.

A HbA1c é formada pela reação entre a hemoglobina A e a glicose (glicação). A membrana dos eritrócitos é permeável à glicose, consequentemente a hemoglobina presente no seu interior fica exposta à glicose na mesma concentração em que a glicose está no plasma. Quanto maior a exposição da hemoglobina a concentrações elevadas de glicose, maior será a formação de hemoglobina glicada. Como a reação de glicação é irreversível, a HbA1c permanece durante o tempo de vida do eritrócito (aproximadamente 120 dias) e a sua quantidade vai refletir a concentração média de glicose plasmática dos 120 dias prévios à sua dosagem. Posto isto, mesmo que em jejum a glicemia apresente valores normais, a HbA1c fornece um resultado mais fiável dos níveis de glicemia do paciente dos últimos tempos.

O nível de hemoglobina glicada no sangue pode ser influenciada por patologias que diminuam o tempo de vida média dos eritrócitos, como anemias ou hemoglobinopatias, levando a resultados falsamente diminuídos.⁵

▪ **Prova de Tolerância à Glicose Oral (PTGO)**

A prova de tolerância à glicose oral avalia a resposta do organismo após a ingestão de glicose sob condições controladas e definidas. Deve ser realizada quando a glicemia em jejum apresenta valores altos, mas não o suficiente para definir um diagnóstico.

Este teste consiste em determinar a glicemia em jejum e 120 minutos após a ingestão de uma solução com 75g de glicose. O paciente deve ser avaliado de manhã, após aproximadamente 10 horas de jejum e deve permanecer sentado durante o exame, de forma a evitar alterações da glicose plasmática relacionadas com o stress ou exercício.⁴ Antes de iniciar o teste é determinada a glicemia capilar e caso o paciente tenha valores iguais ou superiores a 150 mg/dL não pode realizar a PTGO.⁸

Para despiste da diabetes gestacional a PTGO é feita às 24 e 48 semanas de gravidez, com colheita de sangue ao minuto 0, 60 e 120.⁸

▪ **Diagnóstico da Diabetes**

O diagnóstico da diabetes é baseado nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso, que estão apresentados na Norma da Direcção-Geral da Saúde para o Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus⁸: Glicemia em jejum \geq 126 mg/dL; Sintomas clássicos +

glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL; Glicemia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na TPGO (com 75g de glicose); HbA1c $\geq 6,5\%$. Em casos assintomáticos, o diagnóstico não deve ser baseado num único valor anormal de glicemia em jejum ou de HbA1c, devendo o resultado ser confirmado uma ou duas semanas depois. É recomendado usar apenas um parâmetro para o diagnóstico da diabetes. Porém, se houver a avaliação simultânea da glicemia em jejum e da HbA1c, e se ambas forem valores de diagnóstico, o diagnóstico fica confirmado. Se um dos valores for discordante, o parâmetro anormal deve ser repetido numa segunda análise.⁸

Em situações de gravidez, o diagnóstico da diabetes gestacional faz-se com base em outros valores de referência, assim como a identificação de hiperglicemias intermédias e tolerâncias diminuídas à glicose (condições com risco aumentado para a diabetes e para as doenças cardiovasculares).

3.1.2. Estudo do Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos são uma classe de compostos solúveis em solventes orgânicos, mas quase insolúveis em água. Estão presentes em todos os tecidos e desempenham várias e cruciais funções no organismo humano. Agem como componentes funcionais e estruturais das membranas celulares, substrato metabólico e têm um papel importante na síntese de hormonas. Por outro lado, os lípidos e lipoproteínas (partículas que transportam os lípidos na corrente sanguínea) estão intimamente envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose (distúrbio que ocorre quando gordura, colesterol e outras substâncias se acumulam nas paredes das artérias e formam estruturas rígidas chamadas placas) e podem estar ainda relacionados com doenças como a diabetes e obesidade.¹⁰

Os diversos lípidos são transportados na corrente sanguínea em complexos lipoprotéicos (lipoproteínas). As lipoproteínas são constituídas por triglicerídeos, colesterol, fosfolípidos e proteínas (apoproteínas). Os ésteres de colesterol e triglicerídeos, hidrofóbicos, ficam no núcleo da lipoproteína; os fosfolípidos e colesterol livre, anfipáticos, juntamente com as apoproteínas de natureza hidrofílica, formam a camada externa, tornando este complexo solúvel no plasma.¹¹

As lipoproteínas transportam os lípidos hidrofóbicos entre órgãos e tecidos e são classificadas com base na sua densidade e tamanho. As principais classes de lipoproteínas são: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). À medida que o conteúdo de triglicerídeos baixa e de colesterol aumenta, a densidade das partículas aumenta e o tamanho diminui. Cada classe contém um conjunto

de apoproteínas, que possuem um papel estrutural e metabólico, determinando o destino metabólico das lipoproteínas através da interação com os recetores celulares. Anomalias no metabolismo das lipoproteínas são fatores determinantes no desenvolvimento da aterosclerose e levam a patologias conhecidas como dislipidemias.¹¹

No laboratório o estudo do metabolismo dos lípidos envolve a determinação dos seguintes parâmetros: Colesterol Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL e Triglicéridos.

▪ **Colesterol Total**

O colesterol é um álcool do grupo dos esteróis, é um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos e o precursor de importantes compostos, como hormonas esteroides, vitamina D e ácidos biliares.^{10,12}

A ingestão pela dieta e a taxa de síntese de colesterol endógeno determinam a sua concentração no plasma. Em circunstâncias normais, há uma relação inversa entre a ingestão de colesterol pela dieta e a taxa de biossíntese, o que garante uma reserva relativamente constante de colesterol.¹³ O colesterol total no soro engloba todo o colesterol presente nas diversas lipoproteínas.

Nos países industrializados, aproximadamente 30% das pessoas têm concentrações plasmáticas de colesterol elevadas, podendo estar relacionado a fatores ambientais (como a alimentação) ou a fatores genéticos (como o caso da hipercolesterolemia familiar).¹³ A determinação do colesterol serve para estimar o risco de desenvolver doença, nomeadamente, doença cardiovascular.

O doseamento do colesterol total inclui o colesterol livre e o colesterol esterificado e é feito por um método enzimático. Primeiramente, com o uso da enzima colesterol esterase é feita a reversão da esterificação do colesterol. De seguida, o colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase, formando-se peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio reage com dois compostos presentes no reagente formando um composto corado (quinoneimina) que é detetado por espectrofotometria a 500 nm, sendo o resultado proporcional à quantidade de colesterol da amostra.

▪ **Colesterol HDL e Colesterol LDL**

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são as lipoproteínas mais pequenas e com maior densidade. Apresentam propriedades protetoras e anti-aterogénicas, pois a sua principal função é fazer o transporte reverso de colesterol, ou seja, a remoção de colesterol

dos tecidos periféricos para o fígado.^{5,11} Apresentar elevadas concentrações plasmáticas de colesterol HDL está associado à longevidade, e baixas concentrações de HDL está associado ao risco aumentado de doença cardiovascular.¹¹

A quantificação do colesterol HDL é realizada por um método baseado na aceleração da reação do colesterol oxidase e na quebra do HDL seletivamente através de um detergente específico.

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são o maior transportador de colesterol para os tecidos. É considerada uma molécula associada a um maior risco de desenvolvimento de aterosclerose.^{11,12} No LACCSMC, contrariamente aos parâmetros anteriores, a LDL não é doseada por ensaio químico, é calculada usando a fórmula de Friedewald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicerídeos} / 5] \quad (1)$$

O colesterol total, triglicerídeos e colesterol HDL são doseados e o colesterol LDL é calculado utilizando esses parâmetros, expressando todos os parâmetros em mg/dL. A fração [Triglicerídeos/5] é uma estimativa da concentração de colesterol VLDL. Esta fórmula só pode ser usada com valores de triglicerídeos menores que 400 mg/dL pois em valores superiores esta estimativa deixa de ser válida. Em situações de hipertrigliceridemia deve ser requerida a dosagem direta de LDL.¹²

▪ **Triglicerídeos**

Os triglicerídeos são moléculas insolúveis em água e compostos por três ácidos gordos ligados a um glicerol. São transportados no plasma maioritariamente nas VLDL e quilomicrons e armazenados no tecido adiposo. Após o consumo de alimentos, os níveis sanguíneos de triglicerídeos aumentam com o aumento da fração dos quilomicrons, desta forma é necessário um jejum prolongado antes da colheita de sangue para avaliação dos níveis de triglicerídeos.¹²

Níveis elevados de triglicerídeos estão associados a um maior risco para doença cardiovascular e aterosclerose, assim como para o desenvolvimento de pancreatite. Alguns dos principais fatores associados ao aumento de triglicerídeos são: obesidade, dieta rica em hidratos de carbono, consumo de álcool e sedentarismo.¹²

A determinação dos níveis de triglicerídeos no soro tem por base uma cadeia de reações enzimáticas que se iniciam com a hidrólise dos triglicerídeos em glicerol e ácidos gordos por ação da lipase. O glicerol, por ação da glicerocinase, é transformado em glicerol-3-fosfato,

que posteriormente sofre ação da glicerofosfato oxidase, formando dihidroxiacetona-fosfato e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio obtido vai reagir com dois compostos presentes do reagente e uma peroxidase, originando uma molécula corada (quinoneimina), que é detetada por leitura de absorvância. O resultado obtido é proporcional à quantidade de triglicéridos no soro.

3.1.3. Estudo do Metabolismo do Ferro

O ferro é um elemento essencial no organismo. É o íão central do grupo heme (componente não proteico da hemoglobina, mioglobina e citocromos), é responsável pela capacidade de transporte de oxigénio do eritrócito e está presente em muitas moléculas importantes nos processos metabólicos.^{5,12}

Existe cerca de 4g de ferro no organismo e está quase todo ligado a proteínas, visto que o ferro livre é altamente tóxico para as células. Setenta e cinco por cento do ferro encontra-se na hemoglobina e na mioglobina, e cerca de 1% está ligado a aglomerados de ferro-enxofre, que funcionam como cofatores na cadeia respiratória. O restante ferro encontra-se ligado a proteínas de transporte e proteínas de armazenamento no fígado, baço e medula óssea.^{12,14}

Diariamente é perdido menos de 0,1% da quantidade de ferro corporal e não existe um mecanismo de excreção controlado. Estas perdas acontecem principalmente durante a menstruação e através das células descamadas da pele. Desta forma, a homeostasia do ferro é regulada exclusivamente através da ingestão e absorção intestinal. Cerca de 10% do ferro ingerido é absorvido. A hepcidina, uma proteína produzida pelo fígado e é o regulador central da absorção de ferro.¹⁵

O ferro é absorvido na forma de ferro ferroso (Fe^{2+}) e transportado no sangue na forma férrica (Fe^{3+}) pela transferrina. Na medula óssea é integrado na estrutura da hemoglobina, e pode ser armazenado pela ferritina, no fígado e em outros tecidos.¹⁶

O estudo do metabolismo do ferro é muito útil no diagnóstico de vários estados patológicos.

- **Ferro**

Diminuições da quantidade de ferro no soro podem ser devidas à síndrome nefrótica, dieta inadequada, neoplasia, perdas sanguíneas, doença inflamatória crónica, menstruação, e levar a estados patológicos como a anemia ferropriva.¹² Na anemia ferropriva, a deficiência

de ferro afeta a síntese do grupo heme da hemoglobina, dando origem a uma eritropoiese defeituosa.¹⁶ Por outro lado, o excesso de ferro no soro pode ser causado pela hemólise, ingestão excessiva, lesão hepática aguda, talassemias e hemocromatose.¹² A hemocromatose é um distúrbio autossômico recessivo, caracterizado por um aumento acentuado da absorção de ferro, causando deposição de ferro em vários órgãos, o que pode levar à formação de radicais livres, fibrose e insuficiência dos órgãos.¹⁶

Os níveis de ferro variam com a idade e o sexo, e apresentam variação circadiana. Pela manhã os níveis de ferro, chegam a ser 30% mais altos do que à tarde. O ideal é que a colheita de sangue seja sempre realizada pela manhã.¹²

A determinação da quantidade de ferro no soro é realizada por um método fotométrico. Em meio ácido, o ferro é libertado do complexo ferro-transferrina e é reduzido a ferro ferroso (Fe^{2+}). De seguida o Fe^{2+} vai complexar com um composto, formando um complexo cromogéneo, cuja absorvância é proporcional à quantidade de ferro da amostra.

▪ **Ferritina**

A ferritina é a principal proteína de armazenamento de ferro intracelular, funciona como um reservatório de ferro no fígado e na medula óssea. Tem ainda a função de reter o ferro livre, impedindo reações com o oxigénio e a formação de espécies reativas de oxigénio, evitando danos oxidativos.¹⁶

A concentração de ferritina no plasma é proporcional à quantidade de ferro armazenado. Deste modo, a sua determinação pode ser utilizada para detetar deficiência ou excesso de ferro, para fazer o acompanhamento de um tratamento com ferro, ou até, para diferenciar a anemia ferropriva de outras anemias.

A ferritina é uma proteína de fase aguda, a sua síntese pelas células hepáticas é diretamente influenciada por citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral. Desta forma, a quantidade de ferritina pode aumentar inespecificamente em processos inflamatórios e infecciosos, assim como na doença hepática, o que pode esconder o diagnóstico de deficiência de ferro.¹⁵

A determinação da concentração da ferritina no soro é realizada por quimioluminescência, com recurso a micropartículas revestidas com anti-ferritina.

▪ **Transferrina, Capacidade Total de Ligação do Ferro e Saturação de Transferrina**

A transferrina, proteína produzida no fígado, é a principal proteína de transporte de ferro no plasma, tendo a capacidade de ligar dois átomos de ferro. A sua concentração depende da quantidade de ferro disponível no organismo, estando aumentada no caso de escassez de ferro e diminuída se houver excesso desse elemento.¹²

É um marcador de fase aguda negativo. Em reações inflamatórias, o complexo ferro-transferrina é degradado pelo sistema reticuloendotelial, o que resulta em baixas concentrações plasmáticas de transferrina.¹⁶

A concentração de transferrina pode ser determinada diretamente, mas também indiretamente através da capacidade total de ligação do ferro (TIBC). A TIBC corresponde à quantidade máxima de ferro que poderia estar ligada a toda a transferrina em circulação, se esta estivesse saturada. O seu resultado estará aumentado em situações em que há aumento da quantidade de transferrina, como na deficiência crónica de ferro e hepatite aguda. A sua diminuição está associada à hipoproteïnemia, excesso de ferro e doenças inflamatórias crónicas, ou seja, quando há menor quantidade de transferrina.¹²

É ainda possível calcular a saturação da transferrina, através da seguinte fórmula:¹⁵

$$\text{Saturação transferrina (\%)} = 100 \times \text{Ferro Sérico} / \text{TIBC} \quad (2)$$

Quando a saturação da transferrina é inferior aos valores de referência, é indicativo de deficiência de ferro. Uma maior saturação indica excesso de ferro.

A transferrina e a TIBC são parâmetros que não são determinados no LACCSMC. Quando pedidos, alíquotas de soro são enviadas para o laboratório de referência onde é feita a sua determinação.

3.1.4. Avaliação da Função e Lesão Hepática

O fígado desempenha um papel fulcral no metabolismo humano. Este órgão está altamente envolvido na síntese e catabolismo de lípidos, hidratos de carbono e proteínas, sendo que a maior parte das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado. O fígado está envolvido no metabolismo da bilirrubina resultante do catabolismo do grupo heme e na desaminação do glutamato. Secreta a bile e tem um papel fulcral na desintoxicação do organismo, nomeadamente de fármacos.¹⁷

Tendo em conta a grande quantidade de funções desempenhadas pelo fígado, é certo que algumas são afetadas quando há a existência de uma hepatopatia.

- **Bilirrubina Total e Direta**

A bilirrubina é o produto catabólico do grupo heme (protoporfirina com um átomo central de ferro) no sistema retículoendotelial. A maior parte da bilirrubina deriva do heme da hemoglobina de eritrócitos senescentes, a restante provém da degradação de citocromos, peroxidases, mioglobina e catalases.^{17,18}

Um adulto produz cerca de 450 μmol de bilirrubina diariamente, esta é insolúvel em água e é transportada na corrente sanguínea ligada à albumina ou a outras proteínas séricas. É transportada até ao fígado e captada pelas células hepáticas, onde é conjugada com ácido glucurónico de modo a tornar-se mais solúvel e ser excretada na bile. No intestino, a bilirrubina conjugada é catabolizada por bactérias da flora intestinal, formando estercobilinogénio. Posteriormente, este composto é oxidado a estercobilina, composto responsável pela cor das fezes. Uma parte do estercobilinogénio pode ser reabsorvido no intestino e ser reexcretada pelo fígado (bile) ou pelos rins (urina) na forma de urobilina.¹⁷

A bilirrubina sérica apresenta-se em duas formas principais: a fração conjugada ou direta, solúvel em água; e a fração não conjugada ou indireta, insolúvel em água. O doseamento de cada uma das porções permite fazer o diagnóstico diferencial da icterícia.¹⁸

Icterícia é a coloração amarela da pele e dos olhos. Esta condição é causada pela presença de bilirrubina no plasma em concentrações elevadas e resulta de um desequilíbrio entre a produção e a excreção deste composto. A icterícia torna-se evidente quando a concentração de bilirrubina plasmática excede os 3 mg/dL, sendo que a concentração habitual varia de 1 a 1,5 mg/dL.¹⁷

As causas da icterícia são classificadas como: pré-hepáticas, intra-hepáticas e pós-hepáticas.

A icterícia pré-hepática resulta do aumento da concentração da bilirrubina não conjugada. Pode dever-se a uma produção excessiva de bilirrubina causada pelo aumento da hemólise (aumento da degradação de hemoglobina) ou a uma anormalidade genética na captação hepática de bilirrubina não conjugada.

A icterícia intra-hepática reflete uma disfunção dos hepatócitos que afeta o mecanismo de conjugação da bilirrubina, como acontece na Síndrome de Gilbert. Neste tipo de icterícia a bilirrubina não conjugada é a fração que está aumentada no plasma. Em recém-nascidos, principalmente em bebés prematuros, podem existir casos de icterícia devido à

imaturidade das enzimas envolvidas na conjugação da bilirrubina. A bilirrubina não conjugada é neurotóxica e o seu aumento em recém-nascidos pode levar a uma situação grave, conhecida como *kernicterus*, onde ocorre dano cerebral irreversível.¹⁷

A icterícia pós-hepática é causada pela obstrução do trato biliar. Neste caso a bilirrubina plasmática que está em concentrações elevadas é a bilirrubina conjugada. Na obstrução completa, a urobilina está ausente da urina, uma vez que não chega a acontecer a conversão intestinal da bilirrubina a urobilinogénio. As fezes apresentam coloração pálida. A bilirrubina conjugada não é excretada e a sua concentração sérica aumenta, no entanto, esta é solúvel em água e pode ser eliminada pela urina. Quando altos níveis de bilirrubina conjugada são excretados na urina, esta pode ter uma coloração mais forte. A combinação da observação de fezes pálidas e urina escura é característica da obstrução extra-hepática do trato biliar.¹⁷

A bilirrubina é doseada por uma reação de diazotização com formação de azobilirrubina, um composto corado. O aumento da absorvância a 548 nm correspondente à formação do composto corado e é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. A bilirrubina direta é doseada em meio aquoso, enquanto que a bilirrubina total é doseada utilizando um potente agente solubilizador de ação catalisadora.

▪ **Fosfatase Alcalina (ALP)**

A fosfatase alcalina é uma hidrolase que remove grupos fosfato de um grande número de moléculas diferentes. O fígado não é a única fonte de fosfatase alcalina. Quantidades substanciais desta enzima estão também presentes nos ossos, intestino delgado, placenta e rins. A fosfatase alcalina presente na corrente sanguínea tem origem principalmente dos ossos e fígado. Por consequência, a sua dosagem é feita na avaliação e acompanhamento de doenças hepáticas e ósseas.¹⁸

No fígado, a ALP é encontrada nos canalículos biliares, estando a sua produção bastante aumentada em caso de obstrução biliar (colestase). A ALP de origem hepática é frequentemente encontrada associada a um aumento da γ -Glutamil Transferase (GGT), que também é um indicador de obstrução biliar. O aumento simultâneo das duas enzimas tem uma boa especificidade para as doenças das vias biliares. O aumento isolado de ALP é comum em doenças ósseas e é um marcador de formação óssea, estando a ALP mais elevada na infância e adolescência.

De forma a identificar a origem da fosfatase alcalina esta deve ser avaliada em conjunto com a GGT e também é possível fazer a separação e quantificação das isoenzimas hepáticas ou ósseas da ALP por eletroforese.

Para a determinação da atividade da fosfatase alcalina é usado o substrato p-nitrofenil fosfato (composto incolor). Após este sofrer hidrólise por ação da ALP forma p-nitrofenil (composto corado), que é possível de ser medido espectrofotometricamente. O aumento da absorvância é diretamente proporcional à atividade da ALP presente na amostra.

▪ **γ -Glutamil Transferase (GGT)**

A γ -glutamil transferase é uma enzima microsossomal, presente principalmente nos hepatócitos e nas células do epitélio biliar, sendo desta forma um bom indicador de doenças do trato biliar e do fígado. É também encontrada nos microtúbulos renais e no pâncreas.

O aumento da atividade da GGT é observado quando há colestase. No entanto, a atividade da GGT também é afetada pela ingestão excessiva de álcool e de alguns fármacos.¹⁸ Desta forma, a sua determinação deve ser utilizada no diagnóstico de doenças colestáticas, na avaliação e monitorização do abuso de ingestão alcoólica e na deteção e monitorização de lesão hepática provocada por fármacos hepatotóxicos. É ainda útil na distinção entre doença óssea e hepática, como foi explicado anteriormente.

A determinação da atividade da GGT tem por base uma reação catalisada pela mesma. A GGT catalisa a transferência do grupo glutamyl da γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida para a glicilglicina, formando 3-carboxy-4-nitroanilina, um composto corado possível de ser medido espectrofotometricamente a 412 nm. A quantidade formada deste composto é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

▪ **Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)**

A aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase são transaminases que catalisam, pela transferência de um grupo amino, a conversão de aminoácidos a α -cetoácidos, e a reação inversa.⁵

A AST, para além do fígado, é também encontrada no músculo esquelético, cérebro, rins, pulmões, pâncreas, leucócitos e baço. A ALT é encontrada principalmente no fígado, tendo assim maior especificidade para a lesão hepática, e estando na maior parte das vezes mais aumentada que a AST quando existe lesão hepática.¹⁸

Os valores das transaminases indicam o nível de integridade das células hepáticas. Valores muito elevados são indicativos de hepatites ou outras formas de dano hepatocelular (tumores necróticos, hipóxia, choque, insuficiência congestiva).¹⁸

A determinação da atividade da ALT e AST é realizada por métodos enzimáticos. A ALT catalisa a reação de transferência do grupo amina da L-Alanina para o 2-Oxoglutarato, formando piruvato. Na presença de lactato desidrogenase e NADH, o piruvato é reduzido a L-lactato. Nesta reação o NADH é oxidado a NAD^+ e é medido o decréscimo da absorvância a 340 nm, correspondente à oxidação do NADH. A AST catalisa a reação de transferência do grupo amina da L-Aspartato para o 2-Oxoglutarato, formando oxaloacetato. Na presença de malato desidrogenase e NADH, o oxaloacetato é reduzido a L-malato. O NADH é oxidado a NAD^+ e é medido o decréscimo da absorvância a 340 nm, correspondente à oxidação do NADH, que é proporcional à atividade da enzima presente no soro.

▪ **Lactato Desidrogenase (LDH)**

A lactato desidrogenase é uma enzima que catalisa a redução de piruvato a lactato, dependente de NADH, ou a oxidação de lactato a piruvato, dependente de NAD^+ . Está presente no citoplasma de praticamente todas as células do organismo, incluindo células do coração, fígado, rins, músculo esquelético, cérebro, eritrócitos e pulmões.

A concentração de LDH no plasma pode estar elevada em qualquer situação relacionada ao dano celular, em neoplasias, doenças cardiorrespiratórias com hipoxemia, anemias hemolíticas, mononucleose infecciosa, miopatias, hepatite, alcoolismo, enfarte renal, pancreatite aguda e muitas outras situações.¹⁸ Apesar de não ser um marcador específico, é utilizado em simultâneo com outros marcadores no diagnóstico e acompanhamento de pacientes, especialmente em patologias hepáticas e cardíacas.

A determinação da atividade da LDH tem por base a reação que esta enzima catalisa. O lactato e o NAD^+ é convertido a piruvato e NADH pela LDH. O NADH formado é medido por espectrofotometria e é diretamente proporcional à atividade da LDH.

▪ **Albumina e Proteínas Totais**

As proteínas são macromoléculas constituídas por aminoácidos e apresentam várias funções biológicas, como função estrutural, enzimática e hormonal. As proteínas plasmáticas

são ainda responsáveis pelo transporte de várias substâncias, permitem manter a pressão osmótica e são sintetizadas principalmente no fígado.

Em estados de doença, a quantidade de proteínas pode estar drasticamente alterada. Um aumento das proteínas totais está, na maior parte dos casos, associado a uma desidratação grave. Pode ser ainda devido à presença de paraproteína, no mieloma múltiplo. A diminuição das proteínas totais está normalmente relacionada com hemorragias, queimaduras, doença hepática (síntese diminuída), malnutrição, má absorção, glomerulonefrite e síndrome nefrótica. Normalmente um valor baixo de proteínas totais indica que a concentração de albumina está diminuída.⁵

A albumina é a principal proteína plasmática (55%-65% das proteínas plasmáticas). É um marcador do metabolismo proteico, e é importante para detetar problemas de ordem nutricional, de síntese hepática ou de perda renal. A albumina é produzida pelo fígado, e torna-se um parâmetro importante no diagnóstico de doenças hepáticas e no acompanhamento de pacientes com cirrose. Quando há o comprometimento da função de síntese do fígado, a doença hepática normalmente está já num estado avançado.¹⁸

A quantificação da albumina baseia-se numa reação com o verde de bromocresol, que resulta na formação de um complexo corado que é medido espectrofotometricamente a 628 nm e é diretamente proporcional à concentração de albumina na amostra.

A quantificação das proteínas totais é feita pelo método de biureto. Iões de cobre em meio alcalino reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando um complexo corado possível de ser medido espectrofotometricamente e diretamente proporcional à concentração das proteínas na amostra.

3.1.5. Avaliação da Função Renal

Diariamente, cerca de 180 litros de plasma contendo proteínas plasmáticas, eletrólitos, e metabólitos são filtrados no rim, formando 1 a 2 litros de urina por dia.¹⁹

Os rins mantêm a homeostasia da água e dos eletrólitos, desempenhando um papel fundamental na regulação da composição e volume do fluido extracelular e na manutenção do equilíbrio ácido-básico. Removem, através da urina, produtos do metabolismo e retêm substâncias como a glicose e as proteínas. Têm a função de metabolizar e remover fármacos e toxinas. São órgãos endócrinos, produzindo várias hormonas, mas também estão sujeitos à ação de hormonas. A vasopressina aumenta a permeabilidade à água, a aldosterona afeta a reabsorção de sódio e a paratormona (PTH) promove a reabsorção tubular de cálcio, excreção de fosfato e síntese de calcitriol (forma ativa da vitamina D). Para além da síntese

de calcitriol, os rins ainda são responsáveis pela síntese da renina e de eritropoietina (hormona que controla a produção de eritrócitos).¹⁹

Os rins podem ser expostos à hipertensão, hiperglicemia e várias nefrotoxinas que podem comprometer a função renal. O ácido úrico, creatinina e ureia são metabolitos excretados após filtração glomerular e, conseqüentemente, a sua quantificação dá indicação do estado da função renal do utente. Em geral, os exames laboratoriais que avaliam a função renal tentam estimar a taxa de filtração glomerular (TFG).²⁰

No LACCSMC os parâmetros determinados associados à função renal são: creatinina, ureia, ácido úrico e microalbuminúria.

▪ **Creatinina**

A creatinina é o produto final do metabolismo da fosfocreatinina e creatina no músculo esquelético. A quantidade de creatinina produzida depende da massa muscular, idade, sexo e exercício físico. No entanto, a quantidade que é produzida e eliminada a nível renal é sensivelmente constante num indivíduo saudável.²¹

A creatinina é filtrada livremente no glomérulo, embora uma pequena quantidade seja secretada ativamente pelo túbulo renal (cerca de 7%-10% da creatinina eliminada na urina).²¹

Quando os valores de creatinina no sangue estão elevados, significa que a taxa de filtração glomerular está diminuída. Em situações de doença a nível renal com diminuição do aporte sanguíneo renal, dano ou perda de glomérulos ou obstrução do trato urinário, a TFG diminui, o que leva a que a capacidade de eliminar metabolitos, como a creatinina, diminua, havendo o seu aumento no plasma.

A determinação da creatinina é importante no diagnóstico e monitorização de distúrbios renais crónicos e agudos. No entanto, tem uma sensibilidade baixa em estados iniciais e quando o seu aumento é detetado no soro a TFG já diminuiu significativamente.

A quantificação simultânea da creatinina no soro e na urina permite calcular a depuração de creatinina e avaliar a taxa de filtração glomerular. Para tal, é feita a determinação da concentração da creatinina numa amostra de urina de 24h e é utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Clearance da Creatinina (ml/min)} = \frac{[\text{creatinina urina}]}{[\text{creatinina soro}]} \times \text{Volume Urina 24h} \quad (3)$$

Apesar desta determinação ser mais sensível que a creatinina sérica para a avaliação da TFG, a colheita de urina de 24h é um procedimento impreciso e inconveniente para os pacientes e tem sido substituído pelas chamadas equações preditivas que estimam a TFG. Estas equações fazem a correção das variáveis que fazem da relação entre a creatinina plasmática e a TFG não linear, como a idade, sexo, raça e área corporal.⁵

A determinação da creatinina numa amostra de soro ou urina é baseada na reação de Jaffe. Em meio alcalino, a creatinina reage com ácido pícrico, produzindo um complexo corado. O aumento da absorvância a 500 nm em consequência à formação do complexo é diretamente proporcional à concentração de creatinina presente na amostra.

▪ **Ureia**

A ureia, sintetizada no fígado, é o produto final da degradação dos compostos azotados do metabolismo proteico.

Na prática clínica, a creatinina e ureia são testes de primeira linha no diagnóstico de insuficiência renal. No entanto, como a ureia é o produto final do catabolismo proteico, a sua concentração plasmática está dependente de fatores extrarrenais (como da dieta rica em proteína e da taxa de degradação proteica), não dependendo exclusivamente da TFG. Consequentemente, a creatinina é considerada um marcador mais fiável que a ureia.¹⁹

No LACCSMC, a determinação da concentração da ureia é realizada por reações enzimáticas. A ureia é hidrolisada pela urease a iões de amónia e dióxido de carbono. A amónia reage com 2-cetoglutarato e NADH, numa reação catalisada pela glutamato desidrogenase, ocorrendo oxidação do NADH a NAD⁺. O consumo de NADH, medido pela diminuição da absorvância a 340 nm, é proporcional à concentração de ureia presente na amostra.

▪ **Ácido Úrico**

O ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas. A maior parte do ácido úrico é sintetizado no fígado e na mucosa intestinal, sendo 65% excretado pelos rins. A monitorização dos níveis séricos de ácido úrico é utilizada no acompanhamento de pacientes com gota.¹⁹

A formação de ácido úrico pode estar aumentada em situações associadas a doenças do metabolismo, excesso de consumo de purinas e a patologias onde há o aumento da taxa de renovação celular e, consequentemente, o aumento da degradação dos ácidos nucleicos,

como acontece, por exemplo, em linfomas e leucemias. Uma eliminação deficiente, devido à insuficiência renal, leva também ao aumento dos níveis de ácido úrico no soro. Por outro lado, o aumento da concentração de ácido úrico sérico e, conseqüente acumulação nos túbulos renais, propicia o aparecimento de nefropatias.²¹

A determinação do ácido úrico numa amostra é feita baseada nas seguintes reações: o ácido úrico é oxidado pela uricase em alantoína e peróxido de hidrogénio; o peróxido de hidrogénio, na presença da peroxidase, reage com dois compostos existentes no reagente, produzindo um composto corado (quinoneimina) que é detetado espectrofotometricamente e diretamente proporcional à concentração de ácido úrico presente na amostra.

▪ **Microalbuminúria**

A microalbuminúria (albumina de baixa concentração) consiste na deteção de concentrações baixas de albumina na excreção urinária (entre 30 e 300mg/24h). Este parâmetro é utilizado como marcador inicial da doença renal e do aumento da permeabilidade capilar. É usado para o despiste e diagnóstico precoce da nefropatia diabética, permitindo antecipar o tratamento.⁵

A determinação da microalbuminúria é determinada por imunoturbidimetria e pode ser feita numa amostra de urina de 24h ou numa amostra de urina isolada. Um anticorpo anti-albumina humana reage especificamente com a albumina presente na urina, levando à formação de agregados insolúveis, que podem ser quantificados por turbidimetria. O nível de turvação é proporcional à concentração de albumina existente na amostra.

3.1.6. Marcadores de Lise Muscular e Lesão Cardíaca

Os marcadores de lise muscular permitem identificar situações de desgaste muscular, como a rbdomiólise, ou situações de lesão cardíaca, como o enfarte agudo do miocárdio. Quando as células musculares sofrem lise, libertam o seu conteúdo. Desta forma, várias proteínas e enzimas que são libertadas, podem ser usadas como biomarcadores de lesão muscular e cardíaca.

A rbdomiólise é definida por uma destruição acentuada das células musculares esqueléticas, com a libertação de substâncias intracelulares para a circulação. As causas mais frequentes de rbdomiólise são o consumo de álcool, o exercício físico intenso, a compressão muscular traumática e a utilização de determinados fármacos e drogas.²²

O enfarte do músculo cardíaco é das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em adultos de sociedades industriais. É definido como o processo em que ocorre necrose do miocárdio numa condição de isquemia, e pode ser causado pela aterosclerose. No passado, várias enzimas foram usadas como marcadores cardíacos, como a creatina cinase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase. Hoje em dia as troponinas cardíacas são consideradas marcadores mais específicos. Altas concentrações de creatina cinase no soro podem apontar para um diagnóstico alternativo como rabdomiólise.²³

▪ **Creatina Cinase (CK)**

A creatina cinase é uma enzima dimérica que catalisa a transferência de grupos fosfato, sendo encontrada em tecidos com alto gasto energético, como músculo cardíaco, músculo esquelético e cérebro. A CK possui duas subunidades (B e M), que permitem a formação de três isoenzimas: CK-MM (encontra-se predominantemente no músculo esquelético), CK-BB (encontra-se predominantemente no cérebro) e CK-MB (encontra-se predominantemente no músculo cardíaco).²⁴ Desta forma, a presença de CK-MM ou CK total no plasma é utilizada como um indicador de dano muscular esquelético. Já a CK-MB, que tem maior percentagem no músculo cardíaco, é utilizada como marcador de lesão miocárdica.

Níveis aumentados de CK-MB no plasma podem ser verificados 4 a 8 horas após o início dos sintomas no enfarte agudo do miocárdio, atingindo o pico sérico, em média, em 24 horas. Após 2 a 3 dias, observa-se a queda dos níveis plasmáticos com normalização dos valores.²⁵

A determinação da atividade enzimática da CK presente no soro é baseada nas seguintes reações: a creatina cinase presente no soro da amostra catalisa a transferência de um grupo fosfato da creatina fosfato para o ADP, formando ATP; na presença de hexocinase, o ATP é usado para fosforilar glucose, formando glucose-6-fosfato; a glucose-6-fosfato é oxidada pela glucose-6-fosfato desidrogenase havendo redução de NADP⁺ a NADPH, que é detetado a 340 nm e é proporcional à atividade de CK.

A determinação da atividade enzimática da CK-MB é baseada no mesmo conjunto de reações, no entanto, há a adição de anticorpos monoclonais que inibem a atividade da subunidade M, ou seja, inibem a atividade da CK-MM e metade da atividade da CK-MB. Como a CK-BB raramente está presente no soro, a actividade da CK-MB é obtida pela multiplicação do resultado obtido (correspondente à atividade da CK-B) por dois.

▪ Troponina

A troponina é um complexo constituído por três subunidades (C, I e T), está associado às células musculares e é responsável pela sua contração. As troponinas T e I são cardioespecíficas, podendo ser utilizadas no diagnóstico de enfarte do miocárdio, enquanto que a troponina C está presente também no músculo esquelético. A quantidade de troponina no soro é muito reduzida em indivíduos saudáveis, desta forma é possível detetar lesões cardíacas pela libertação de pequenas quantidades de troponina.

A concentração de troponinas na corrente sanguínea aumenta em poucas horas após o aparecimento dos sintomas e permanece elevada por 1 ou 2 semanas, o que permite tanto o diagnóstico precoce quanto tardio.

A sensibilidade diagnóstica da troponina, 12 horas após o aparecimento dos sintomas, é muito elevada, desta forma quando a troponina não é detetada numa amostra colhida após 12 ou mais horas do aparecimento de dor no peito o diagnóstico de enfarte do miocárdio pode ser descartado com confiança.⁵

Apesar de serem os marcadores mais específicos para o enfarte do miocárdio, as troponinas podem estar elevadas na lesão miocárdica de causa não isquémica, embolia pulmonar e em condições não cardíacas como a sépsis.²⁵

No LACCSMC é feita o doseamento da Troponina-I e esta determinação é feita por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência.

3.1.7. Estudo do Equilíbrio Hidroeletrólítico

O equilíbrio entre fluidos e eletrólitos é fundamental na avaliação médica de qualquer doente. Os eletrólitos são moléculas carregadas negativamente (aniões) ou positivamente (catiões), encontradas em todos os fluidos do organismo (intracelulares e extracelulares). Os iões mais importantes nos fluidos biológicos são o sódio, potássio, cálcio, cloreto, fosfato, bicarbonato e magnésio. São responsáveis por manter os níveis de líquido normais nos vários compartimentos do corpo, sendo que a quantidade de líquido contida num compartimento depende da concentração dos eletrólitos. São importantes em vários processos metabólicos, no controlo do pH, como cofator de várias enzimas e em reações de oxidação-redução.

A manutenção dos gradientes iónicos e do potencial eléctrico através das membranas é essencial para a sobrevivência, nomeadamente para a contração muscular, condutibilidade neuronal e processos secretórios.²⁶

A água e os eletrólitos são constantemente trocados com o ambiente, a quantidade destes no corpo depende do equilíbrio entre a ingestão e a excreção. No LACCSMC é feita a dosagem do sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio e fosfato.

▪ **Sódio, Potássio, Cloreto**

O ionograma consiste na determinação das concentrações de sódio, potássio e cloreto no soro.

O **sódio** é o principal catião extracelular, tem um papel fundamental na pressão sanguínea e na regulação da pressão osmótica. É livremente filtrado pelo glomérulo e 70%-80% é reabsorvido no túbulo proximal com o cloreto e a água. Uma parte do restante sódio é ainda reabsorvido na Ansa de Henle e nos túbulos distais.

A diminuição dos níveis de sódio pode ser causada pelo excesso do uso de diuréticos, vômitos e diarreias prolongadas, diminuição da ingestão de sódio na dieta, acidose metabólica, retenção excessiva de líquidos e nefropatias com perda de sódio. A determinação do sódio urinário pode ajudar na distinção entre perdas renais e perdas extrarrenais.²⁷ Há ainda a possibilidade de existir pseudo-hiponatremia em pacientes com hiperproteinemia ou hiperlipidemia. O excesso de proteínas ou lipoproteínas faz com que estes compostos ocupem uma fração de volume do plasma maior do que o habitual. O sódio e outros eletrólitos estão distribuídos apenas na fração de água do plasma, fração esta que neste caso estará reduzida. Apesar da concentração de sódio na fração de água estar dentro de valores normais, muitos métodos medem a concentração de sódio no volume de plasma total, não levando em conta que nestes casos a fração de água ocupa um menor volume no plasma total.⁵

O aumento dos níveis de sódio no soro pode ser devido ao Síndrome de Cushing, desidratação severa e a altos níveis de ingestão de sal sem um fornecimento adequado de água.

O **cloreto** é o principal anião extracelular no organismo. A absorção do cloro ingerido acontece no tubo digestivo. Este é eliminado por filtração glomerular e reabsorvido passivamente com o sódio no túbulo proximal. Tal como o sódio, é importante na manutenção da distribuição adequada dos fluidos corporais, na regulação da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-básico. Concentrações baixas de cloreto são observadas em casos de vômitos prolongados com perda de ácido clorídrico, em casos de acidose metabólica, em casos críticos da doença de Addison e em patologias renais. Altas concentrações de cloreto no soro podem ser encontradas em paciente com acidose

metabólica associada a diarreias prolongadas e a perda de bicarbonato de sódio, e também podem ser encontradas em pacientes com doença renal tubular com diminuição da excreção de hidrogênio, levando à diminuição da reabsorção de bicarbonato de sódio.²⁸

O **potássio** é o principal catião intracelular. Este é regulado a nível renal, sendo totalmente filtrado pelo glomérulo e quase todo reabsorvido pelo túbulo proximal. Cerca de 98% do potássio total do corpo está no meio intracelular. Se houver dano tecidual considerável, o conteúdo celular e o potássio passam para o meio extracelular, causando um aumento potencialmente perigoso de potássio sérico. O potássio é responsável pela manutenção da osmolaridade intracelular e pelo potencial elétrico de membrana. Alterações nas concentrações de potássio plasmático podem levar a que células excitáveis respondam de forma diferente a estímulos, e as consequências podem ser fatais se afetar músculos e nervos do coração.²⁸ A concentração de potássio aparece aumentada no plasma em casos de excreção reduzida (causada por uma diminuição da TFG ou aumento de reabsorção), redistribuição para fora das células (em caso de acidose metabólica, deficiência de insulina, queimaduras graves ou células danificadas) ou excesso de ingestão. Uma pseudo-hipercaliemia pode ocorrer na presença de hemólise na amostra.²⁸ Por outro lado, a hipocaliemia pode ser devida ao consumo reduzido de potássio, redistribuição de potássio para dentro das células (como no caso de alcalose metabólica) e perdas acentuadas (causadas por vômitos ou diarreias, tubulopatias e uso de diuréticos).⁵

A quantificação dos iões Na⁺, o K⁺ e o Cl⁻ baseia-se na potenciometria, é realizada por elétrodos seletivos a cada um dos iões.

▪ **Cálcio, Magnésio e Fosfato**

A avaliação da concentração do **cálcio** é importante no diagnóstico e monitorização de doenças ósseas, doença renal crónica e distúrbios da paratiroide. A maior parte do cálcio existente no organismo encontra-se nos ossos e uma mínima parte encontra-se no plasma. Cinquenta por cento do cálcio plasmático está na forma ionizada, 10% está ligado a aniões e 40% ligado a proteínas plasmáticas, maioritariamente à albumina.^{25,26} O cálcio livre (ionizado) é a fração de cálcio no plasma biologicamente ativo, e a regulação da sua concentração dentro dos limites normais é fundamental para a função neuronal, permeabilidade de membrana, secreção endócrina e contração muscular.²⁶

A homeostase do cálcio é controlada pela paratormona (PTH) e calcitriol. A PTH, secretada pelas glândulas paratireoides em resposta à baixa concentração plasmática de cálcio livre, promove a reabsorção óssea e a reabsorção de cálcio nos túbulos renais,

prevenindo a perda de cálcio na urina.²⁶ O calcitriol é responsável pela absorção de cálcio a nível intestinal. A hipercalcemia pode ser o resultado de situações de hiperparatireoidismo, neoplasias, hipervitaminose D, desidratação, imobilização prolongada, acromegalia, etc.²⁹ A hipocalcemia pode ser causada por hipoparatiroidismo, hipoalbuminemia, insuficiência renal, deficiência de vitamina D, síndromes de má absorção, pancreatite aguda e estados dilucionais.³⁰

A quantificação do cálcio é realizada através de um método colorimétrico. O cálcio reage com arsenazo III em meio ácido formando um complexo corado que é proporcional à concentração de cálcio na amostra. A medição da absorvância do produto da reação é feita a 660 nm.

O **magnésio** é o segundo catião intracelular mais abundante depois do potássio. Cerca de 50% do magnésio total presente no organismo humano está no estado insolúvel no osso, 45% está contido nas células, como catiões intracelulares, e apenas 5% está presente como catiões extracelulares.²⁸ O magnésio é o cofator de muitas enzimas. São reconhecidos cerca de 300 complexos enzimáticos que são ativados pelo magnésio. Muitas etapas da bioquímica intracelular são dependentes deste, incluindo na glicólise e metabolismo oxidativo. Tem um papel estrutural nos ácidos nucleicos e ribossomas e induz a secreção e ação da PTH, e por consequência, a hipomagnesemia severa pode levar a hipoparatiroidismo e hipocalcemia. Tal como o potássio, é um catião importante na manutenção do potencial elétrico de membrana. A hipermagnesemia é incomum, mas pode acontecer em casos de insuficiência renal. A hipomagnesemia está geralmente associada a nutrição insuficiente, má absorção, vômitos e diarreia, diurese osmótica e uso prolongado de diuréticos.²⁶

A determinação do magnésio baseia-se na sua função de cofator na reação enzimática catalisada pelo isocitrato desidrogenase, com produção de NADPH. É medido o aumento da absorvância a 340 nm correspondente ao NADPH, que é diretamente proporcional à concentração de magnésio.

A maior parte do **fosfato** no corpo encontra-se nos ossos, sendo um dos principais elementos minerais do osso, mas também está presente no meio intracelular e extracelular. O fosfato participa nos processos metabólicos, forma compostos de alta energia (como ATP) e atua como cofator em vias intracelulares. O termo fosfato inorgânico é utilizado para distinguir o fosfato livre do fosfato ligado organicamente, como no ATP. A manutenção do equilíbrio do fosfato é mantida maioritariamente pela excreção renal, e as alterações na sua concentração acompanham as alterações de cálcio. A hiperfosfatemia pode ocorrer na insuficiência renal, hipoparatiroidismo (decréscimo na excreção de fosfato pelos rins, como

resultado da baixa quantidade de PTH circulante) e hipervitaminose D. A hipofosfatemia pode ser causada por hiperparatireoidismo (aumento da excreção de fosfato nos rins, como resultado do aumento da PTH), síndrome de Fanconi (defeito na reabsorção tubular de fosfato) e deficiência de vitamina D.²⁸

A quantificação do fosfato inorgânico no plasma baseia-se na sua reação com o molibdato de amónio, formando um complexo cuja absorvância a 340 nm é medida e é diretamente proporcional à concentração de fosfato no soro.

3.1.8. Outros Analitos de Interesse Determinados no LACCSMC

▪ Proteína C Reativa (CRP)

A Proteína C Reativa é uma proteína de fase aguda, sintetizada predominantemente no fígado. É um marcador sensível, mas não específico, de lesões agudas, inflamações e infeções, e importante no monitoramento da resposta de pacientes a cirurgias ou terapias farmacológicas. Aparece na circulação poucas horas após ocorrer uma agressão ao organismo (4-6 horas), atingindo o pico entre 36 e 50 horas. A concentração sérica de CRP pode aumentar até mil vezes nos processos inflamatórios em comparação com as concentrações fisiológicas.³¹

A CRP está aumentada em infeções bacterianas e em várias doenças inflamatórias agudas e crónicas, como artrite reumatoide, doença de Crohn, pancreatite, asma e doença cardiovascular.³¹ Resultados anormais da CRP evidenciam o estado de inflamação crónica de baixo grau, que está associado ao aumento do risco de doença cardiovascular. Desta forma, a elevada sensibilidade deste analito é usada na avaliação do risco cardiovascular.³²

A quantificação de CRP no soro é realizada por imunoturbidimetria, usando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-CRP, que vão aglutinar com a proteína C reativa presente na amostra. A aglutinação é detetada pelo aumento da absorvância a 572 nm e é diretamente proporcional à concentração de CRP na amostra.

▪ Amilase

A amilase é uma enzima pertencente à classe das hidrolases e catalisa a hidrólise de ligações 1,4- α -glicosídeos em polissacarídeos. Esta enzima é produzida principalmente no pâncreas e glândulas salivares e é utilizada, sobretudo, no diagnóstico e monitoramento de pancreatites e outras doenças pancreáticas.

A amilase sérica aumenta 6 a 12 horas após o início de um quadro de pancreatite aguda, e volta ao normal em 3 a 5 dias. Pacientes com início dos sintomas há mais de 5 dias podem apresentar níveis normais de amilase, devendo ser utilizada para o diagnóstico a quantificação da lipase. Esta associação é útil, pois a amilase e a lipase apresentam tempos de meia vida diferentes.³³

O aumento dos níveis de amilase sérica pode acontecer na insuficiência renal, obstrução de canal biliar com envolvimento pancreático, tumores ou inflamação de glândulas salivares e fase inflamatória da pancreatite crônica.³³

A determinação da atividade da amilase baseia-se na reação de hidrólise do substrato 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriose, catalisada pela amilase, formando 2-cloro-4-nitrofenol. Este produto pode ser detetado espectrofotometricamente a 404 nm e é diretamente proporcional à actividade da amilase presente na amostra.

3.2. SETOR DE IMUNOLOGIA

No LACCSMC, o setor de Imunologia fica no mesmo espaço físico que o setor de Bioquímica. É um setor completamente automatizado e composto apenas por um equipamento, o Architect ci8200, que apresenta um módulo dedicado aos parâmetros bioquímicos e outro dedicado aos parâmetros imunológicos e ensaios imunoquímicos.

Neste setor eram feitos testes sorológicos de pesquisa de antígenos e/ou anticorpos de várias infecções virais (Hepatite B, Hepatite A, Hepatite C, Covid-19, HIV) e também da Sífilis. Para além destas determinações, era feito, a partir de ensaios imunoquímicos, a pesquisa de marcadores tumorais da próstata (antígeno específico da próstata), marcadores para a avaliação da função da tiroide (tri-iodotironina, tiroxina, hormona estimulante da tiroide, anticorpos anti-peroxidase e anticorpos anti-tireoglobulina) e eram determinados alguns marcadores da anemia (folato e vitamina B12).

3.3. SETOR DE HEMATOLOGIA

A hematologia é a área da ciência que estuda as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), a sua produção e os órgãos onde estas são produzidas (órgãos hematopoiéticos). Não se limita apenas ao estudo do estado de normalidade desses elementos sanguíneos, mas também ao estudo dos estados patológicos a eles associados e à caracterização dessas patologias.

O setor de hematologia no LACCSMC apresenta um elevado grau de automatização. No equipamento CELL-DYN Ruby são processadas amostras de sangue total para a realização do hemograma (análise quantitativa e qualitativa dos constituintes do sangue periférico: eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos). No BD Vacutainer® Sedi-I5TM é determinada a velocidade de sedimentação eritrocitária a partir de amostras de sangue total. A função hemostática é avaliada no equipamento *Yumizen G400*, determinando o tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e o fibrinogénio, com recurso a plasma sanguíneo. Neste setor é ainda realizada a determinação dos grupos sanguíneos (sistema ABO e Rhesus) por métodos manuais.

Neste setor, para além da rotina laboratorial, tive a oportunidade de preparar e corar esfregaços sanguíneos, e fazer a observação microscópica dos elementos sanguíneos.

3.4. SETOR DE MICROBIOLOGIA

A microbiologia é a ciência que estuda os organismos microscópicos e as suas atividades biológicas. Dedicase ao estudo das diversas formas, estruturas e aspetos bioquímicos e fisiológicos dos microrganismos, e da sua relação com o hospedeiro, podendo esta ser benéfica ou prejudicial. A microbiologia clínica dedica-se ao diagnóstico de doenças infecciosas e à identificação dos agentes infecciosos, quer sejam eles bactérias, vírus, fungos ou parasitas.

Num laboratório de microbiologia podem ser analisadas uma grande variedade de amostras, no entanto, no LACCSMC, as amostras mais comuns são: urina, fezes e exsudados nasofaríngeos.

O fluxo de amostras no setor da Microbiologia do LACCSMC é muito reduzido e a maioria dos exames microbiológicos executados são exames bacteriológicos. Desta forma, vou explicar de forma sucinta o procedimento do exame bacteriológico e quais os métodos utilizados no LACCSMC. For fim, será abordado com algum pormenor o procedimento do diagnóstico da infeção do trato urinário, que é o procedimento mais requerido no setor.

3.4.1. Exame Bacteriológico

▪ Exame Macroscópico e Microscópico Direto

O exame macroscópico é o primeiro passo do exame bacteriológico. Consiste na observação das características macroscópicas da amostra biológica (cor, turvação, presença

de sangue ou muco, etc), características estas que podem ser importantes no diagnóstico final.³⁴

O exame microscópico direto baseia-se na observação da amostra ao microscópio ótico, e pode ser executado a fresco ou por meio de técnicas de coloração diferencial.

No exame a fresco, uma suspensão do produto biológico é colocado entre a lâmina e lamela, e é depois observada com as objetivas de 10x e 40x. Se a amostra for urina é necessário que esta seja centrifugada antes de ser observada. Através deste exame é possível avaliar a qualidade da colheita, a quantidade de bactérias presentes e a sua morfologia.

As técnicas de coloração diferencial mais usadas na microbiologia são a Coloração de Gram e Coloração de Ziehl-Neelsen.

A Coloração de Gram é utilizada para diferenciar dois grandes grupos de bactérias: Gram-positivo e Gram-negativo. Esta técnica é executada em amostras de produtos biológicos ou em colónias isoladas em meio cultural. A coloração de Gram inicia-se com a aplicação de um corante básico, o cristal violeta, e em seguida aplica-se uma solução de iodo. Neste ponto da coloração todas as bactérias estão coradas de azul. Depois, as bactérias são tratadas com álcool-acetona. As células Gram-positivas vão reter o complexo cristal violeta-iodo e as células Gram-negativas são descoradas pelo álcool-acetona. Por fim, aplica-se outro corante (ex: safranina), de forma a que as células descoradas adquiram uma cor contrastante.³⁵ As bactérias Gram-positivas possuem uma parede espessa de peptidoglicano, o que não vai permitir a descoloração e o corante inicial fica retido, dessa forma, as células apresentam uma cor azul/roxa. As Gram-negativas, por outro lado, possuem uma parede celular constituída por uma camada fina de peptidoglicano, o que permite a descoloração pelo álcool-acetona e a posterior coloração com o corante de contraste, ficando com uma cor rosa/vermelha.³⁶

A coloração de Ziehl-Neelsen é utilizada para bactérias cuja parede celular é constituída por ácidos micólicos (ex: micobactérias), o que impede que corantes básicos (como o cristal de violeta), atravessem a sua parede celular.³⁶ São consideradas bactérias álcool-ácido resistentes, pois retêm a fucsina mesmo quando descoradas com uma solução de ácido clorídrico e álcool. Primeiramente é aplicado o corante primário (fucsina) com recurso a aquecimento, para ajudar o corante a entrar mais facilmente no interior das células. Após esta etapa, procede-se à descoloração com álcool-ácido e por fim aplica-se um corante de contraste, que vai corar todas as células e estruturas não álcool-ácido resistentes da amostra. As bactérias álcool-ácido resistentes adquirem cor vermelha, enquanto que as outras apresentam a cor do corante de contraste.³⁵

Os exames microscópicos permitem observar a morfologia dos microrganismos presentes nas amostras, e partindo dessa informação, é possível fazer a seleção dos meios de cultura apropriados para continuar a pesquisa.

▪ Exame Cultural

O objetivo do exame cultural é o crescimento e isolamento das bactérias, para obter uma quantidade de bactérias clinicamente relevante e efetuar a sua identificação através de provas e sistemas de identificação. O crescimento bacteriano *in vitro* é feito utilizando meios de cultura que fornecem nutrientes necessários para a proliferação das bactérias. Existem meios de enriquecimento, meios seletivos e diferenciais. Podendo estes ser líquidos, semi-sólidos e sólidos.

Os meios de enriquecimento são compostos por nutrientes específicos e importantes para o crescimento de microrganismos fastidiosos, favorecendo o seu rápido crescimento.

Os meios seletivos têm agentes inibitórios específicos, inibindo o crescimento de certos grupos de bactérias e, de certa forma, favorecendo um grupo de bactérias (o que se considera suspeito e patológico).

Os meios diferenciais, através da adição de certos ingredientes ou substratos, além de fomentarem o crescimento das colónias, diferenciam-nas através de mudanças de cor, revelando características bioquímicas ou outras características da espécie em pesquisa. Desta forma os meios diferenciais permitem uma identificação preliminar.³⁵

Os meios de cultura mais utilizados no LACCSMC estão apresentados na Tabela 4.

A amostra biológica é inoculada no meio de cultura apropriado, e vai incubar numa estufa, durante cerca de 18-24h à temperatura e atmosfera adequada para o crescimento do microrganismo a pesquisar.

Como o tempo médio de incubação das culturas bacterianas é de 18-24h, as culturas são apenas observadas no dia seguinte. Se após 18-24h não se observar crescimento o meio de cultura é novamente colocado na estufa por mais 18-24h, pois a cultura ainda poderá positivar durante esse tempo. Se o meio apresentar crescimento, as culturas são primeiramente observadas tendo em atenção as suas características macroscópicas (cor, forma, muco, produção de H₂S, formação de pigmento, etc) e caso o meio utilizado não diferencie espécies bacterianas são realizadas provas de identificação, que vão contribuir para a identificação do microrganismo.

Tabela 4: Características e função dos meios de cultura utilizados no LACCSMC

Meio de Cultura	Características e Função
Caldo de Tripticase de Soja	Meio não seletivo e altamente nutritivo. Permite o crescimento de diversas bactérias. É utilizado com o objetivo de aumentar o inóculo bacteriano.
Gelose de sangue	Meio enriquecido e diferencial. Permite o crescimento e isolamento da maioria dos microrganismos, sejam eles fastidiosos ou não. A presença de sangue permite a expressão da hemólise, um critério para a identificação bacteriana.
Gelose de Chocolate	Meio enriquecido que favorece o crescimento de <i>Neisseria spp.</i> e <i>Haemophilus spp.</i>
Gelose Campylobacter	Meio seletivo para <i>Campylobacter spp.</i> em amostras de fezes. A sua seletividade é garantida pela adição de antifúngicos e antibióticos, que inibem o crescimento da flora microbiana normal em amostras fecais.
Gelose Hektoen	Meio seletivo e diferencial usado no isolamento e crescimento de bactérias entéricas Gram-negativo, nomeadamente <i>Shigella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i> em amostras de fezes.
Gelose MacConkey	Meio seletivo e diferencial para bactérias Gram-negativo que permite verificar a fermentação ou não da lactose pelas bactérias.
Gelose Mannitol Salt 2	Meio seletivo e diferencial para <i>Staphylococcus spp</i> que permite uma orientação para a identificação de <i>S. aureus</i> devido à fermentação do manitol.
Gelose CPS Elite	Meio diferencial. Permite o isolamento e a identificação de agentes patogênicos urinários.
Caldo de Selenito	Meio líquido de enriquecimento seletivo para <i>Salmonella spp.</i>

▪ Provas de Identificação

Existem várias provas de identificação por métodos manuais utilizadas para fazer a identificação presuntiva dos microrganismos, como o teste de indol, oxidase, catalase, coagulase, no entanto, vou apenas explicar aquelas que tive a oportunidade de realizar no LACCSMC (teste da coagulase e teste da catalase).

O **teste da coagulase** permite fazer a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*. Permite fazer a distinção rápida entre esta espécie e outras espécies de estafilococos menos virulentas.³⁶ No LACCSMC utiliza-se um kit comercial, o *Pastorex™ Staph-plus*. O reagente deste kit é composto por partículas de látex sensibilizadas com IgG, fibrinogénio e anticorpos monoclonais específicos dos polissacarídeos capsulares do *Staphylococcus aureus*, permitindo a deteção simultânea do “clumping factor” (proteína de ligação ao fibrinogénio), da proteína A (que possui afinidade pela região Fc da IgG), e dos polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus*. Colónias isoladas são misturadas com o reagente numa placa de aglutinação e é observado a olho nu a formação de aglutinados, indicando a presença de *Staphylococcus aureus*.

O **teste da catalase** permite fazer a distinção de cocos *Gram*-positivo. *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. são catalase negativa, e *Staphylococcus* spp. são catalase positiva. A catalase converte o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. O teste consiste em transferir uma colónia pura da cultura para uma lâmina de vidro, adicionar peróxido de hidrogénio e verificar se há libertação de oxigénio pela formação de bolhas de ar. A formação de bolhas indica que a reação aconteceu e que a bactéria isolada possui catalase, sendo desta forma catalase positiva. Quando se utiliza esta prova não se pode usar colónias retiradas de meios que contenham sangue, pois há a possibilidade de gerar falsos positivos devido à existência de catalase nos eritrócitos.³⁶

▪ **Sistemas de Identificação**

A identificação definitiva de um microrganismo pode ser feita através de vários métodos, sendo os mais precisos as técnicas de genética molecular. Nos laboratórios de microbiologia recorre-se maioritariamente a métodos automatizados, como o sistema VITEK, ou a sistemas manuais, como o usado no LACCSMC.

O sistema de identificação utilizado no LACCSMC é o *BD BBL Crystal* (Figura 3). No laboratório usam-se dois kits deste sistema de identificação: um para bactérias *Gram*-positivas e outro para bactérias *Gram*-negativas.

O kit é composto por painéis e tubos com fluido para a preparação da suspensão bacteriana a ser inoculada nos painéis. Cada poço do painel tem um determinado substrato bioquímico ou enzimático ligado a substâncias cromogéneas ou fluorogénicas. Após a inoculação com a suspensão bacteriana, o painel é incubado durante 24-48 horas a 37°C. No fim da incubação os poços são analisados relativamente à existência de alterações de cor ou à presença de fluorescência, em consequência das atividades metabólicas dos

microrganismos. A identificação faz-se utilizando um software a partir da análise comparativa entre o padrão de reações da bactéria testada e os padrões presentes na base de dados.



Figura 3: Sistema de Identificação *BD BBL Crystal*

▪ **Teste de Sensibilidade aos Antibióticos**

Após identificar a bactéria envolvida na infecção e de forma a orientar o tratamento do doente, é essencial conhecer a sua suscetibilidade aos antibióticos. Os testes de sensibilidade aos antibióticos são testes de crescimento dos microrganismos em presença de antibióticos e podem ser feito por vários métodos, como o Método de Difusão e E-Test.

No LACCSMC o antibiograma é feito em galerias ATB da bioMerieux. Existem galerias específicas para cada grupo de bactérias (enterobacterias, estreptococos, estafilococos, ect). Desta forma, é necessário considerar a bactéria identificada para a escolha da galeria. As galerias são formadas por 32 cúpulas de reação. O primeiro poço, sem antibiótico, serve como controlo do crescimento. Os seguintes poços contêm antibióticos em diversas concentrações. A bactéria a ser testada é suspensa e transferida para um meio de cultura e depois inoculada na galeria. Após a incubação de 24h, o aumento de opacidade dos poços devido ao crescimento bacteriano indica que o microrganismo não é sensível ao antibiótico. O resultado obtido neste método permite categorizar a bactéria como sensível, intermediária ou resistente aos diferentes antibióticos testados.

3.4.2. Diagnóstico da Infecção Urinária

As infeções do trato urinário podem afetar apenas as vias inferiores (cistite) ou tanto as vias inferiores quanto as superiores (pielonefrite). Devido à anatomia do seu trato urinário, as mulheres são naturalmente mais susceptíveis a estas infeção. A *Escherichia coli* uropatogénica é a causa mais comum de infeção urinaria, é responsável por cerca de 90% das primeiras infeções do trato urinário em mulheres jovens. Com frequência, verifica-se a

presença de *E. coli*, porém espécies de bacilos gram-negativos (como *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp*), enterococos e estafilococos também são comuns.³⁵

Na ausência de doença a urina é um fluido estéril, porém, durante a micção alguns microrganismos presentes na uretra podem ser arrastados, contaminando a urina e dificultando o diagnóstico de infecção.

Habitualmente, a colheita desta amostra é feita pelo próprio paciente, desta forma é muito importante que este esteja informado e que cumpra os princípios de colheita estabelecidos. É essencial que a colheita seja feita para um recipiente esterilizado e que seja a primeira urina da manhã, rejeitando o jato inicial de urina e colhendo o jato intermédio.

▪ **Análise Sumária de Urina**

A análise sumária de urina é usada para identificar infecções do trato urinário, mas também doenças renais, doenças hepáticas e diabetes mellitus. Consiste na avaliação de vários parâmetros bioquímicos e físicos da urina e na observação do sedimento urinário.

No LACCSMC, são usadas tiras reagentes URIT 10G para a medição semi-quantitativa de leucócitos, cetona, nitrito, urobilinogênio, bilirrubina, proteína, glicose, sangue, densidade e pH na urina. As tiras reagente são imersas num tubo com a amostra de urina não centrifugada e colocadas no equipamento URIT-500C para efetuar a leitura. A leitura é baseada na alteração da cor da tira, que resulta das reações químicas entre os reagentes da tira e compostos na urina. Os parâmetros mais relevantes no contexto das infecções do trato urinário são os leucócitos, sangue e nitritos. A presença de leucócitos em grande número e eritrócitos geralmente está associada à infecção do trato urinário. Os nitritos na urina resultam da redução dos nitratos a nitritos pela ação de algumas bactérias, como a *Klebsiella pneumoniae*.³⁷

De seguida, a urina é centrifugada de forma a obter o sedimento urinário para fazer a análise microscópica a fresco, com a ampliação de 40x, permitindo a observação de elementos celulares (leucócitos, eritrócitos e células epiteliais), cristais (ácido úrico, oxalato de cálcio), cilindros (hialinos ou granulares) e microrganismos (bactérias, leveduras, parasitas). Em caso de infecção urinária, para além da visualização de uma grande quantidade de bactérias, é comum a presença de inúmeros leucócitos, assim como de alguns eritrócitos. Um aumento acentuado de células epiteliais pode indicar inflamação do trato urinário e a presença de cilindros é normalmente indicativa de patologia renal. Os cristais são regularmente encontrados nos sedimentos urinários, mas nem sempre têm significado patológico, estando presentes em pessoas saudáveis.

▪ Urocultura, Identificação Bacteriana e Antibiograma

A urocultura consiste na pesquisa de bactérias uropatogénicas em número representativo de infeção urinária. No LACCSMC o meio de cultura utilizado é o CPS Elite da *Biomerieux*. Num primeiro momento as urinas são homogeneizadas e depois semeadas no respetivo meio. Uma vez semeadas, as placas vão à estufa a 37°C, em condições de aerobiose durante 18-24h para permitir o crescimento bacteriano. No dia seguinte as placas são observadas e verifica-se se houve crescimento. Como o meio CPS Elite é um meio cromogénico permite a identificação presuntiva das principais bactérias associadas às infeções do trato urinário, devido às diferentes cores das colónias no meio. (Figura 4)

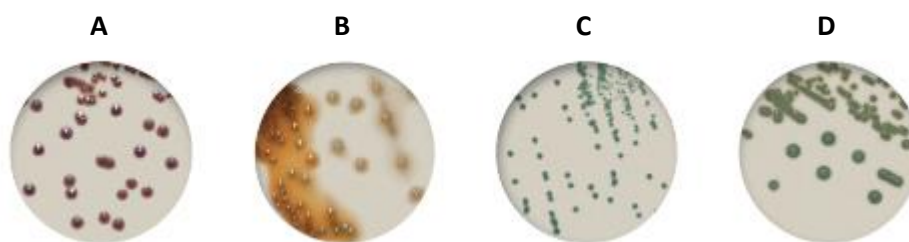


Figura 4: Crescimento de *E. coli* (A), *Proteeae* (B), *Enterococcus* (C), KESC - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (D) no meio cromogénico CPE Elite. (Fonte: Biomerieux)

Por fim, consoante as características macroscópicas das colónias é realizada a identificação definitiva e o antibiograma, pelos métodos explicados anteriormente.

3.5. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade é fundamental para o bom funcionamento dos laboratórios e para a obtenção de resultados fidedignos. No LACCSMC há a preocupação com a qualidade dos serviços prestados e dos resultados obtidos, por conseguinte, é feito o Controlo de Qualidade Interno (CQI) e o laboratório participa num programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), com o objetivo de garantir a exatidão e precisão dos resultados fornecidos.

O CQI pode ser diário ou semanal, dependendo do equipamento e parâmetro em causa. É executado através de controlos com concentrações conhecidas dos diversos analitos, que são analisados nas mesmas condições que as amostras. Os resultados dos controlos internos são avaliados em gráficos de Levey-Jennings, e a sua interpretação é baseada nas regras de Westgard. Caso alguma das regras de Westgard seja violada, os

controles não podem ser validados e o problema deve ser resolvido pela calibração, alteração do reagente ou pela verificação técnica do equipamento em causa. Para a validação dos resultados de amostras processadas é estritamente necessário a obtenção de resultados aceitáveis para os controlos internos.

A participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade permite monitorizar e implementar a melhoria da qualidade analítica, pela deteção de erros sistemáticos através da comparação dos resultados com outros laboratórios, garantindo a qualidade dos serviços prestados. O LACCSMC participa no programa de AEQ do *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS). Realiza o processamento dos controlos num intervalo de tempo definido pelo programa e com controlos fornecidos por eles. Os controlos são tratados como uma amostra e possuem concentrações ou valores dos parâmetros desconhecidos para o laboratório. Os resultados obtidos são enviados para essa entidade, são avaliados e posteriormente o laboratório é informado sobre os seus resultados.

4. FASE PÓS-ANALÍTICA

O procedimento pós-analítico consiste na validação biopatológica dos resultados pelo especialista em análises clínicas e na sua entrega ou envio aos utentes, médicos ou às entidades competentes.

No final da análise laboratorial das amostras, os resultados são disponibilizados no sistema informático do laboratório, para que possam ser interpretados e validados. A interpretação dos resultados é realizada de acordo com os valores de referência e considerando o histórico do utente. Os resultados são, inicialmente, avaliados pelos técnicos responsáveis por cada valência, e por último é feita a validação pelo Diretor Técnico do laboratório.

Após a validação, a parte administrativa está responsável por facultar os resultados das análises aos utentes, podendo ser entregues em mão no laboratório ou enviados eletronicamente. Quando os resultados obtidos na fase analítica apresentam valores de alerta e críticos, devem ser comunicados de imediato ao clínico ou ao paciente.

Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19)

I. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

1.1. Dados e Considerações Gerais

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) foi fundado em outubro de 1983. Situou-se na Faculdade de Farmácia (Polo III da Universidade de Coimbra) até abril de 2020. Nessa data, devido ao aparecimento do novo coronavírus e à situação pandémica que atingiu o nosso país, o LACUC passou a funcionar no edifício da Faculdade de Medicina (Polo I da Universidade de Coimbra) e dirigido ao rastreio, diagnóstico e monitorização da infeção por SARS-CoV-2, prestando serviço a toda a população em geral.

O horário de funcionamento do LACUC durante o período de estágio era das 8:00h às 0:00h, de segunda a sábado, e das 13:00h às 22:00h aos domingos. As colheitas eram realizadas durante as manhãs de segunda a sábado.

Atualmente a direção técnica está a cargo da Doutora Ana Miguel Matos e da Doutora Patrícia Madaleno. O laboratório funciona por turnos que são assegurados por 3 equipas de técnicos. As colheitas são feitas por enfermeiros ou pessoas formadas para tal, e a parte burocrática e de secretariado é garantida por assistentes administrativas.

Sendo este laboratório um laboratório de biossegurança 3, é possível trabalhar com agentes patogénicos, que podem causar doenças muito graves ou potencialmente letais por meio da inalação, ou outro tipo de exposição, como a COVID-19.

1.2. Testes Realizados e Fluxo de Amostras

Os testes realizados no laboratório, com vista ao diagnóstico e monitorização da infeção por SARS-CoV-2 são: teste rápido de antigénio, teste serológico e teste de PCR em tempo real. No diagnóstico da COVID-19 por PCR em tempo real para a pesquisa de RNA do vírus SARS-CoV-2 a colheita da amostra é feita por zaragatoa nasofaríngea, assim como para o teste rápido para pesquisa do antigénio do mesmo vírus. Há também a possibilidade de utilização de amostras de saliva para a pesquisa de antigénio. Já para os testes serológicos de pesquisa de anticorpos contra o SARS-CoV-2 a amostra biológica utilizada é o soro.

O número de amostras que chegam diariamente ao laboratório é muito variado, havendo ocasiões de maior e menor procura e afluência, variando entre 100 a 500 amostras por dia.

As amostras para PCR em tempo real chegam de várias entidades e instituições, sendo algumas delas as seguintes: Instituto Português de Oncologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Rovisco Pais, Ibervita, Administração Regional de Saúde do Centro, Medicina Legal, entre outras. Também são feitas colheitas e conseqüentemente o teste pretendido a pessoas particulares com ou sem prescrição médica, assim como a quem pretende viajar para as regiões autónomas ou outros países. O laboratório possui protocolo com os Governos Regionais da Madeira e dos Açores, permitindo a quem viaje para estes locais realizar o teste de PCR sem custos. São ainda feitos testes rápidos e de PCR a associações desportivas, a atletas da Federação Portuguesa de Judo, e testes rápidos de antigénio como forma de rastreio à comunidade da Universidade de Coimbra, a estudantes e funcionários que são selecionados aleatoriamente.

1.3. Equipamentos e Estrutura física

Os equipamentos utilizados no LACUC estão descritos na tabela abaixo (Tabela 5), assim como a sua função.

Tabela 5: Equipamentos existentes no LACUC utilizados no setor COVID-19 e a sua respetiva função

Equipamento	Função
<i>Abbott m2000sp</i> x2	Efetua a extração do RNA viral e prepara a mistura para a realização do RT-PCR
<i>Abbott m2000rt</i> x2	Realiza a amplificação e deteção do RNA viral
<i>Abbott Alinity m</i>	Efetua a extração do RNA viral e sua deteção qualitativa por RT-PCR
<i>bioMérieux VIDAS</i>	Imunoanalisador que utiliza o Teste Imunoenzimático por Fluorescência (ELFA) para detetar anticorpos IgM e IgG

O laboratório é dividido em várias áreas: recepção, área administrativa, vestiários, armazém de materiais, secretaria, sala de colheitas, antecâmara e câmara de inativação, zona de extração, zona de amplificação, zona de validação de resultados e ainda uma área com frigoríficos para armazenamento de amostras e de reagentes.

2. A COVID-19 E O SARS-COV-2

A COVID-19 é a doença provocada pela infeção pelo novo coronavírus, uma infeção viral altamente transmissível e patogénica causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2). A Organização Mundial da Saúde (OMS) atribuiu à doença o nome de COVID-19, que resulta das palavras “Corona”, “Vírus” e “Doença” com referência ao ano em que surgiu (2019). Este vírus foi identificado pela primeira vez em humanos na cidade chinesa de Wuhan, província de Hubei, no final de 2019 e em pouco mais de dois meses, espalhou-se por todo o mundo. A 11 de março de 2020, a OMS declarou o surto de COVID-19 como pandemia.³⁸

No passado foram identificados outros coronavírus. Os primeiros coronavírus foram isolados em 1937, mas a denominação coronavírus foi dada apenas em 1965, tendo em conta sua morfologia microscópica. Estes vírus contêm projeções de glicoproteínas na sua superfície, que ao microscópio eletrónico se assemelham a uma coroa. Podem causar infeções em animais e humanos, principalmente infeções no trato respiratório.^{38,39}

São conhecidos quatro coronavírus humanos responsáveis por doença ligeira em indivíduos imunocomprometidos (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1). Até dezembro de 2019, eram conhecidas apenas duas espécies de coronavírus que causavam doença grave no ser humano: o coronavírus SARS-CoV (causa da Síndrome Respiratória Aguda Grave, identificado em 2003) e o coronavírus MERS-CoV (responsável pela Síndrome Respiratória do Médio Oriente, identificado em 2012).⁴⁰

A sequenciação do genoma e a análise filogenética do SARS-CoV-2 sugeriu que os morcegos são possivelmente os hospedeiros naturais de origem deste vírus, e este pode ter sido transmitido diretamente de morcegos para humanos ou através de um hospedeiro intermediário. O SARS-CoV-2 partilha cerca de 96% da sequência de nucleótidos com um coronavírus de morcego existente (RaTG13), 79,5% da sequência de nucleótidos com o SARS-CoV e 55% com o MERS-CoV. Pertence à mesma família de vírus responsáveis pelo SARS e MERS.⁴⁰

Os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, à família *Coronaviridae* e à subfamília *Coronavirinae*, sendo que esta subfamília contém quatro géneros: *Alphacoronavirus*,

Betacoronavirus, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Em janeiro de 2020, o agente causador da COVID-19 foi identificado como um *Betacoronavirus*.^{41,42}

2.1. Caracterização Genômica e Estrutural

Os coronavírus têm uma forma esférica, com diâmetro entre 60-140 nm, são vírus envelopados com genoma não segmentado e contêm RNA de cadeia simples de polaridade positiva (+ssRNA) com cerca de 26 a 32 kb (Figura 5). Com este comprimento, o seu genoma é o maior entre os vírus de RNA. Este contém informação de quatro proteínas estruturais (S, E, M e N), responsáveis pela adsorção à célula hospedeira, fusão da membrana, montagem viral, libertação de partículas virais, entre outras, e dezasseis proteínas não estruturais (nsp1-16), que são essenciais na replicação e transcrição viral. O seu genoma possui ainda alguns genes acessórios.^{40,42}

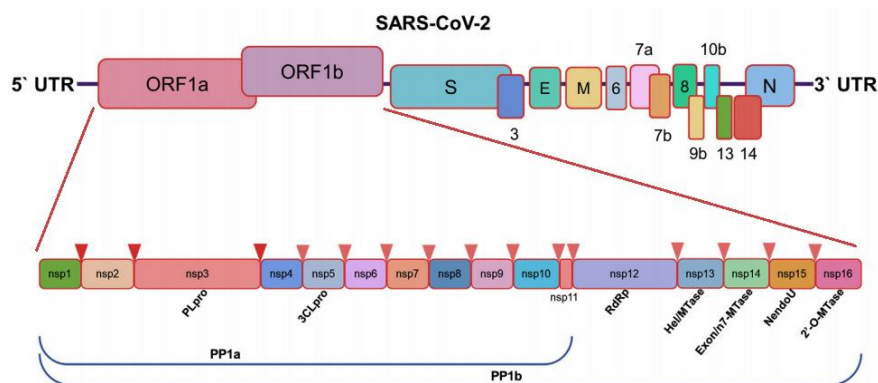


Figura 5: Representação esquemática da organização do genoma e dos domínios funcionais do vírus SARS-CoV-2 (adaptado de: Kirtipal, N., 2020)

As proteínas estruturais estão representadas na Figura 6. A proteína da nucleocápside (N) está associada ao genoma, formando o nucleocapsídeo. Este está envolto pelo envelope que está associado a três proteínas estruturais: proteína de membrana (M), proteína spike (S) e proteína de envelope (E).⁴²

A proteína S é o elemento chave que facilita a entrada do vírus na célula hospedeira. É uma proteína transmembranar constituída por 3 domínios: ectodomínio, domínio transmembranar e cauda intracelular. O ectodomínio, projetado para o exterior do vírus, divide-se em duas subunidades (S1 e S2). A subunidade S1 contém um domínio de ligação ao

recetor da célula hospedeira (RBD) e a subunidade S2 é responsável pela fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira.⁴⁰

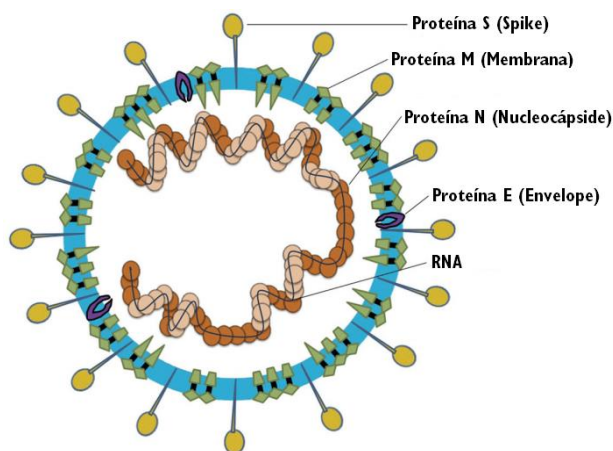


Figura 6: Representação da estrutura viral do SARS-CoV-2 (adaptado de; Li, G., 2020)

2.2. Mecanismo de Infecção

Diferentes tipos de coronavírus utilizam domínios específicos da subunidade S1 da proteína S para reconhecer diferentes recetores de entrada. No caso do SARS-CoV-2, para entrar nas células hospedeiras, o vírus reconhece o recetor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) nas células hospedeiras humanas por meio do domínio de ligação ao recetor.^{40,42} A ECA2 é encontrada em maior quantidade nas células do trato respiratório, e consequentemente os principais sintomas são respiratórios, mas também é expressa no miocárdio, em células renais e intestinais.⁴⁵ A ligação promove grandes mudanças conformacionais na proteína S e a subunidade S2, que contém o peptídeo de fusão, fica responsável pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Esta fusão resulta na libertação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira, há então replicação do vírus e a produção de novas partículas virais, que são posteriormente libertadas como novos vírus.⁴⁶

O reconhecimento do recetor e a fusão são os fatores mais críticos e determinantes para o tropismo viral e para a possível transmissão entre espécies.⁴⁰

2.3. Transmissão e Manifestações Clínicas

O SARS-CoV-2 é transmitido por gotículas durante o contacto próximo entre indivíduos. Este vírus pode, também, persistir em superfícies por um período relativamente

prolongado, pelo que a exposição indireta via fómites pode também permitir a transmissão, embora a probabilidade seja baixa (superfícies ou fómites contendo o vírus vão contaminar as mãos, que posteriormente poderão entrar em contacto com as membranas mucosas da boca, nariz e olhos, causando infeção). Alguns estudos demonstraram ainda que o SARS-CoV-2 tem o potencial de se espalhar por meio de aerossóis, permitindo a transmissão por uma distância mais longa, desta forma é possível a transmissão aérea em instalações de saúde devido a aerossóis gerados por procedimentos médicos. Outros estudos indicam a possibilidade de transmissão fecal-oral e por aerossóis fecais, uma vez que o SARS-CoV-2 tem o potencial de infetar células intestinais, contudo, esta possibilidade requer mais confirmações e estudos, assim como a transmissão perinatal.^{41,42} Desta forma e com base nos dados epidemiológicos disponíveis, as gotículas respiratórias representam a principal via de transmissão do SARS-CoV-2, sendo o contacto direto de pessoa a pessoa a principal fonte de disseminação do vírus. O risco de transmissão está relacionado com a carga viral do transmissor, duração da exposição, distância entre os dois indivíduos, uso de máscara e vários fatores ambientais, como por exemplo, o grau de ventilação.⁴⁵

Após a exposição, o período médio estimado de incubação para a infeção por SARS-CoV-2 antes do desenvolvimento dos sintomas é de cerca de 5 dias, podendo ir até 14 dias.⁴⁶ Entre 80% a 85% das infeções resultam em situações ligeiras ou assintomáticas. Quinze por cento a 20% das pessoas infetadas desenvolvem a forma grave da doença, principalmente idosos, pessoas com doença crónica e problemas de saúde subjacentes.³⁸

Os sintomas mais frequentes associados à COVID-19 são: febre, tosse seca, dificuldade respiratória/dispneia, perda total ou parcial do olfato e enfraquecimento ou diminuição do paladar. O hemograma dos pacientes mostra leucopenia e linfopenia. Em casos mais graves, pode levar a pneumonia grave com insuficiência respiratória aguda, lesão miocárdica, lesão hepática, falência renal e de outros órgãos, e eventual morte.^{42,47}

Até à data, o SARS-CoV-2 infetou em todo o mundo cerca de 250 milhões de pessoas, levando à morte cerca de 5 milhões.

2.4. Métodos de Diagnóstico

A confirmação de infeção por SARS-CoV-2 pode ser feita por deteção de RNA viral, deteção de proteínas virais ou deteção de uma resposta humoral ao vírus.

O diagnóstico de referência é a identificação do RNA viral pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR). As amostras nasofaríngeas são tecnicamente mais difíceis de colher e consideradas mais invasivas, mas, em relação a

outras amostras, são as que têm melhores resultados na detecção do vírus.⁴⁵ Os RT-PCRs para SARS-CoV-2 têm como alvo pelo menos duas regiões específicas do genoma do vírus (geralmente o gene N, E ou S, o ORF-1 ou o gene RdRp). Este método permite um diagnóstico precoce da COVID-19, é altamente sensível e específico, tornando-o muito fiável. As principais desvantagens do RT-PCR residem na necessidade de um laboratório bem equipado, de pessoal técnico e no tempo de processamento da amostra.^{45,48}

Os testes de antigénio de detecção rápida (Ag-RDT) para SARS-CoV-2 recorrem a metodologias de execução mais simples e com maior facilidade na interpretação dos resultados. São utilizados ensaios de fluxo lateral (LFA), ensaios que têm um histórico de uso generalizado e bem-sucedido para o diagnóstico de outras doenças infecciosas de saúde pública importantes, como HIV e malária. Como amostra podemos ter: esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo ou saliva. Este tipo de teste revela alta especificidade, mas menor sensibilidade, no entanto, o resultado pode ser obtido em menos de 30 minutos. O uso de saliva nos Ag-RDTs seria ideal do ponto de vista da saúde pública, mas esta técnica leva a uma redução de sensibilidade, dado que a saliva apresenta menor carga viral em relação a outras amostras.⁴⁵

O teste para a presença de uma resposta humoral à infeção por SARS-CoV-2 envolve a detecção de IgG ou IgM específicas para proteínas virais. Estes são, comparativamente com os testes moleculares, mais fáceis de realizar e são geralmente mais rápidos, com resultados em apenas 15-30 minutos. Vários métodos de ensaio foram desenvolvidos para detetar anticorpos contra SARS-CoV-2, sendo os mais utilizados os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoenaios de quimioluminescência (CLIA), ensaios imunoenzimáticos por fluorescência (ELFA) e ensaios de fluxo lateral (LFA). A principal limitação dos testes de detecção de anticorpos está ligada aos dados esparsos de sensibilidade e especificidade. Alguns estudos sugerem que a maioria dos pacientes desenvolve anticorpos apenas na segunda semana depois do início dos sintomas⁴⁹, podendo a IgM ser detetada 10 a 12 dias após a primeira manifestação dos sintomas e a IgG 12 a 14 dias após o aparecimento dos sintomas.⁵⁰ No entanto, a janela imunológica difere em diversos estudos e esta pode variar substancialmente entre indivíduos infetados. Os principais antigénios imunogénicos utilizados são os antigénios da nucleocápside (N) e da proteína spike (S).⁴⁹

3. FASE PRÉ-ANALÍTICA

A amostra para detecção do genoma viral consiste no exsudado da nasofaringe colhido por zaragatoa. A zaragatoa é colocada num tubo com meio de transporte para vírus,

constituído por tiocianato de guanidina em tampão Tris. O tiocianato de guanidina, para além da sua importante função de lise, impede a atividade de enzimas RNases, desnaturando-as e impedindo-as de danificarem o genoma viral.

Para o teste rápido de deteção de antígeno viral é feita colheita de exsudado da nasofaringe com zaragatoa para um tubo com tampão de extração, tubo este que têm um bico de gotejamento na parte inferior.

Para a deteção de anticorpos a amostra necessária é o soro, sendo colhida uma amostra de sangue por punção venosa periférica para um tubo sem anticoagulante, de seguida a amostra é centrifugada, obtendo o soro para a análise.

As zaragatoas são transportadas para o laboratório num sistema de embalagem tripla.⁵¹ O contentor primário (tubo) é o que contém a amostra, este está devidamente identificado e é embalado em material absorvente para o caso de haver quebra ou derrame da amostra. O contentor secundário (pote) é o que leva os tubos de amostras. Este contém vários tubos protegidos individualmente com material absorvente e amortecedor, e separados. O contentor exterior (mala térmica) é a embalagem de transporte externa onde se colocam os contentores secundários.

Como já referido, as amostras podem ser colhidas no laboratório com marcação prévia ou podem chegar ao laboratório de outros postos de colheitas, ou instituições. No caso das amostras que são colhidas no laboratório, após a marcação e antes da colheita, a informação é registada no sistema informático (Apollo), onde são colocados todos os dados pessoais e identificativos de cada utente.

No caso das amostras que chegam ao laboratório provenientes de outras instituições, estas são registadas no sistema informático após a sua receção no laboratório.

Este registo atribui a cada amostra um código alfanumérico, com o correspondente código de barras, permitindo que a amostra seja identificada através da respetiva etiqueta ao longo do seu processamento.

4. FASE ANALÍTICA

4.1. RT-PCR

Para a deteção qualitativa do RNA do SARS-CoV-2 em exsudados nasofaríngeos é utilizado o RT-PCR. As amostras, após chegada ao laboratório, têm de ser inativadas, segue-se a extração do genoma viral e depois a amplificação e deteção dos produtos amplificados

por RT-PCR em tempo real. No final, é feita uma validação analítica do resultado pelo técnico. Todos estes passos serão explicados pormenorizadamente.

O laboratório possui o equipamento Abbott m2000 RealTime System, que é composto por dois aparelhos: o Abbott m2000sp responsável pela extração e preparação das amostras para o RT-PCR e o Abbott m2000rt que realiza a amplificação e deteção do RNA viral. Recentemente, o laboratório adquiriu também outro equipamento para a mesma função, o *Abbott Alinity m*, ao qual farei uma breve abordagem.

4.1.1. Inativação das Amostras

Depois da chegada das amostras ao laboratório, faz-se a inativação do vírus de modo a assegurar a segurança no posterior manusear das amostras. A inativação é executada numa câmara de fluxo laminar tipo II, instalada numa sala com pressão negativa, de modo que o agente infeccioso não consiga sair para o ambiente exterior. Na antecâmara da sala de inativação são preparados os tubos com o líquido de inativação (750 µl) e estes são enviados para a câmara de inativação, assim como as amostras e todo o equipamento necessário. O líquido de inativação é um tampão de lise constituído por um detergente e tiocianato de guanidina, e tem como função desnaturar as proteínas virais. Apresenta uma composição semelhante ao do meio de transporte, mas com maior concentração de tiocianato de guanidina.

Os técnicos responsáveis pela inativação podem entrar na câmara após estarem equipados com o equipamento de proteção individual (EPI), referido no Anexo I. Entrando na sala de inativação é necessário que os técnicos procedam à desinfeção de todas as superfícies, material e da câmara de fluxo laminar. O procedimento dentro da câmara de fluxo laminar é simples, consiste em passar 750 µl da amostra para um tubo com o líquido de inativação. Porém, há que ter cuidado na correta homogeneização no vortex das amostras e também com as contaminações. Para tal, durante o processo de inativação e com o auxílio de gazes embebidas em álcool a 70% há a descontaminação das luvas, superfícies dos tubos e, sempre que necessário, das superfícies de trabalho. Tudo o que sai da câmara de fluxo laminar tem que ver devidamente desinfetado assim como tudo o que sai da sala de inativação para o exterior.

O tempo necessário para inativar as partículas virais presentes na amostra é de 10 minutos, após este tempo as amostras podem ser transportadas para o exterior da sala de inativação para se proceder à extração de RNA. Antes dos técnicos saírem da sala de inativação faz-se a desinfeção com álcool a 70% da câmara de fluxo laminar, superfícies e

chão da sala. Liga-se a luz UV na câmara de fluxo laminar. À saída os técnicos descartam a parte exterior do EPI e só depois podem sair da sala.

4.1.2. Abbott m2000 RealTime System

▪ Extração e Preparação das Amostras para o RT-PCR

Para a extração do RNA viral o equipamento utilizado, Abbott m2000sp, está preparado para analisar até 24, 48, 72 e 96 amostras. Em cada corrida utilizamos uma água isenta de RNAses, um controlo positivo com sequências de RNA específicos do SARS-CoV-2 e um controlo negativo, e estes são processados como qualquer outra das amostras da corrida.

Antes de começar a extração é necessário fazer a manutenção e preparação do extrator: descartar os resíduos sólidos e líquidos de corridas anteriores, proceder à limpeza e descontaminação das áreas e objetos de trabalho e colocar os reagentes e consumíveis necessários.

Consoante o número de amostras, diferentes quantidades de reagentes são preparados antes da corrida. É utilizado um kit de reagentes comercial que é composto por: tampão de lise, 2 soluções de lavagem, tampão de eluição e solução de micropartículas magnéticas. Ao tampão de lise e às soluções de lavagem é necessário adicionar quantidades específicas de etanol absoluto. Ao tampão de lise é ainda acrescentando o controlo interno (CI), uma sequência de RNA diferente do vírus que pretendemos detetar. Neste caso, a sequência alvo do CI é obtida a partir do gene reductase hidroxipiruvato da abóbora. Ao adicionar o controlo interno à solução de tampão de lise, este vai ser adicionado a todas as amostras que vão ser processadas, incluindo água e controlos, e no passo de amplificação esse gene será também amplificado, demonstrando que houve uma correta amplificação.

O passo da extração tem como objetivo extrair e concentrar as moléculas de ácidos nucleicos e remover os inibidores da amplificação, de forma a tornar os ácidos nucleicos alvo acessíveis à amplificação. Pela ação do isotiocianato de guanidina e detergente, presente no tampão de lise, há a destruição do envelope, desnaturação das proteínas virais e lise do capsídeo. O RNA viral é capturado pelas micropartículas magnéticas e é sujeito a um campo magnético para que, através de sucessivas lavagens, os componentes não ligados da amostra, incluindo os inibidores da amplificação, sejam removidos e o RNA viral permaneça. Por ação do tampão de eluição o RNA viral é eluído das micropartículas e transferido para uma placa de 96 poços fundos.

Quando o processo de extração termina é necessário colocar no extrator o material e reagentes necessários para que, de forma automática, o extrator proceda à preparação das amostras para a amplificação, ou seja, transferir o eluído da amostra e os reagentes, componentes essenciais para a realização do RT-PCR, para uma placa de reação ótica de 96 poços. O kit de reagentes de amplificação é constituído por: reagente de amplificação SARS-CoV-2 (contendo primers, sondas e corante de referência), reagente de ativação e enzima rTth polimerase termoestável. No final da mistura estar concluída é apenas necessário selar manualmente a microplaca.

▪ **Amplificação e Detecção do RNA**

Após a preparação da placa de PCR, esta é transferida para o Abbott m2000rt. Neste aparelho é feita a amplificação e deteção das sequências alvo por meio da emissão de fluorescência durante a reação de amplificação (RT-PCR). Há a deteção de duas sequências alvo altamente conservadas e específicas do SARS-CoV-2, o gene RdRp e o gene N (que codifica a RNA Polimerase RNA dependente e a proteína da nucleocápside, respetivamente), e também da sequência do controlo interno.

Para a amplificação e deteção do RNA é utilizado: seis primers complementares às sequências a amplificar (quatro complementares aos genes alvos do vírus e dois complementares à sequência do CI); rTth DNA polimerase (enzima termoestável que funciona como transcriptase reversa e DNA polimerase); manganês (co-fator e ativador da polimerase); três sondas correspondentes às sequências a amplificar; uma molécula fluorescente ROX (corante de referência que nos indica o correto funcionamento dos equipamentos).

Um primeiro primer liga-se às sequências de RNA viral alvo e do controlo interno, e estas são convertidas a cDNA (DNA complementar) por ação da enzima rTth polimerase termoestável, com função de transcriptase reversa. Há um passo de desnaturação, em que a temperatura da reação é elevada acima do ponto de fusão das cadeias duplas RNA-cDNA havendo a separação da cadeia dupla formada anteriormente. De seguida um segundo primer liga-se às cadeias de cDNA e por ação da atividade de DNA polimerase da enzima rTth polimerase, forma um produto de DNA de cadeia dupla. A partir daqui as etapas de desnaturação das cadeias complementares, emparelhamento dos primers e extensão das cadeias complementares são repetidas no decorrer de vários ciclos de PCR, havendo a amplificação exponencial do produto. A amplificação dos três alvos (SARS-CoV-2 RdRp, SARS-CoV-2 N e CI) ocorre simultaneamente na mesma reação.

A detecção das sequências dos genes codificantes das proteínas virais e do controlo interno é possível recorrendo ao uso de sondas fluorescentes específicas. Estas sondas são uma sequência de oligonucleótidos sintéticos complementares aos genes alvo. Estão marcadas com um fluoróforo, que está ligado covalentemente à extremidade 5' da sua sequência, e na extremidade 3' existe um *quencher*. Quando há a ausência de sequências alvo, a sonda encontra-se intacta, com uma conformação que permite que a fluorescência emitida pelo fluoróforo, quando excitado por um comprimento de onda específico, seja absorvida pelo *quencher*. Quando as sequências alvo são amplificadas há a sua hibridização às sondas e estas adquirem uma conformação que confere uma maior distância entre o fluoróforo e o *quencher*, permitindo a emissão e a detecção de fluorescência. As duas sondas específicas para os genes RdRP e N estão marcadas com o mesmo fluoróforo e a sonda do controlo interno apresenta um outro fluoróforo, o que permite a detecção paralela das sequências amplificadas virais e do controlo interno.

▪ Resultados

No final do RT-PCR em tempo real é necessário fazer a validação analítica dos resultados. Para tal faz-se a interpretação das curvas de fluorescência das amostras, dos controlos e da referência (exemplos no Anexo II). São detetadas três fluorescências diferentes, uma vez que são utilizados três fluoróforos distintos: um fluoróforo nas sondas complementares aos genes do vírus; um fluoróforo na sonda complementar à sequência do controlo interno; um fluoróforo na molécula fluorescente ROX usada como referência.

A curva de referência, que corresponde à fluorescência emitida pela molécula de referência incluída no kit de amplificação, possibilita verificar o correto funcionamento dos equipamentos. Permite verificar alterações na concentração ou no volume de reação.

A curva de controlo interno demonstra se houve uma correta extração e amplificação dessa amostra. Garante se houve a eliminação dos inibidores da amplificação e a correta adição dos reagentes de amplificação, uma vez que, tal como para as sequências virais, o sinal de fluorescência é gerado como resultado da amplificação. Desta forma a emissão de fluorescência pela sonda específica do CI garante a validação do processo. Se há falha de controlo interno num poço, não se pode validar a curva de amplificação dos genes virais e o teste terá que ser repetido para essa amostra.

As curvas do controlo positivo, do controlo negativo e da água também são essenciais para a validação dos resultados. Para validar os resultados é necessário que a curva do controlo positivo apresente um crescimento exponencial de fluorescência e a curva

do controlo negativo e da água não apresente aumento da fluorescência. Com o controlo positivo é possível verificar que a amplificação das sequências virais está a acontecer corretamente e com o controlo negativo e a água é possível descartar ou confirmar contaminações, ou amplificações não específicas.

No gráfico do resultado do RT-PCR em que a fluorescência é apresentada em função do número de ciclos, o valor de *cycle threshold* (Ct) corresponde ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o *threshold line* (Th), o ponto em que a reação atinge uma intensidade de fluorescência acima dos níveis basais. Um maior ou menor valor de Ct indica que a amostra tem menor ou maior carga viral inicial, respetivamente. Ou seja, um menor Ct é indicação que a carga viral inicial era mais elevada e foram precisos menos ciclos para atingir o Th. No entanto, não é seguro avaliar a carga viral do doente a partir do valor de Ct, uma vez que a eficiência da colheita da amostra pode influenciar este resultado.

Um resultado negativo apresenta uma curva de amplificação dos genes virais alvo abaixo da Th e um resultado positivo apresenta um crescimento exponencial que ultrapassa a Th. Quando o valor de Ct é bastante elevado (>35), ou seja, quando estamos perante uma amplificação tardia, o teste é dado como inconclusivo e podemos estar perante uma infeção recente ou, por outro lado, numa fase de recuperação da doença. Quando a curva de amplificação tem um perfil atípico o teste deve ser repetido a partir da mesma amostra, assim como quando há falha dos controlos.

4.1.3. Controlo da Qualidade

Um falso negativo ou falso positivo pode pôr em risco a saúde do doente e de todas as pessoas ao seu redor, desta forma é imperativo que os resultados desta técnica sejam fidedignos e que não haja erros. Para tal o uso de controlos é extremamente importante. É também fundamental a realização da Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

No CQI o controlo interno utilizado é fornecido pela empresa Abbott e, como já foi referido, é uma sequência de um gene de abóbora sem relação com as sequências alvo do SARS-CoV-2. No início da preparação das amostras o CI é acrescentado a todas as amostras e é simultaneamente amplificado com as sequências alvo do SARS-CoV-2 por RT-PCR, permitindo aferir se o teste foi corretamente executado em cada amostra.

A participação em programas de Avaliação Externa de Qualidade permite fazer uma avaliação da qualidade dos resultados laboratoriais através da utilização de amostras controlo, que simulam amostras de doentes e cujos valores analíticos são conhecidos apenas

pela entidade que promove o programa. No LACUC a AEQ para a deteção molecular do vírus SARS-CoV-2 (RT-PCR) é assegurada pela entidade INSA em associação com a LabQuality. Os controlos (zaragatoa em tubo de transporte) são enviados para o laboratório, e estes são processados como uma amostra comum, seguindo todas as etapas desde a inativação até à interpretação do resultado do RT-PCR. Posteriormente o resultado é enviado à entidade, onde é avaliado e comparado com resultados de outros laboratórios. Por fim o laboratório é notificado sobre o seu resultado.

4.1.4. Abbott Alinity m

Recentemente o LACUC recebeu um novo equipamento, o Alinity m System, para realizar o ensaio de RT-PCR para a deteção qualitativa do RNA viral do SARS-CoV-2 de exsudados nasofaríngeos. Este equipamento realiza a preparação da amostra (extração dos ácidos nucleicos), a mistura dos reagentes para o RT-PCR, a amplificação, a deteção e a apresentação de resultados, de uma forma sequencial, sem pausas e sem intervenção do técnico.

A preparação da amostra, amplificação e deteção assenta nos mesmos princípios e fundamentos do ensaio no Abbott m2000sp e no Abbott m2000rt.

Na preparação da amostra é utilizada uma solução lisante e uma solução diluente, é também utilizada a tecnologia de micropartículas magnéticas para facilitar a captura de ácido nucleico. O controlo interno é introduzido no início do processo de preparação das amostras para demonstrar que o processo foi executado corretamente para cada amostra e controlos. Um controlo positivo e um controlo negativo é processado pelo menos, obrigatoriamente, uma vez a cada 48 horas para confirmar o bom desempenho do equipamento e dos reagentes, ou sempre que outra situação o justifique.

O RNA purificado é combinado com o reagente de ativação e os reagentes de amplificação e deteção, sendo posteriormente transferidos para uma cuvete de reação. Em seguida o equipamento acrescenta à cuvete de reação a solução de barreira de vapor. Posteriormente a cuvete é transferida para uma unidade de amplificação e deteção da fluorescência em tempo real.

O ensaio Alinity m SARS-CoV-2, tal como o ensaio executado no Abbott m2000, tem como alvo os genes RdRp e N. A amplificação destes dois alvos e do CI ocorre simultaneamente na mesma reação. A deteção é feita da mesma forma que no equipamento Abbott m2000rt, através de sondas marcadas com fluoróforos que hibridizam com as sequências complementares nos genes alvo (SARS-CoV-2 RdRp, SARS-CoV-2 N e CI).

Este equipamento necessita de manutenção semanal e mensal. É necessário verificar frequentemente os níveis e quantidade de reagentes, materiais, assim como dos resíduos líquidos e sólidos, e proceder ao seu abastecimento ou remoção. É ainda fundamental verificar a validade de utilização dos reagentes e controlos em uso no equipamento.

É possível introduzir até 144 amostras neste equipamento de uma só vez. Após aproximadamente duas horas são obtidos os resultados para 12 das amostras, e a partir daí são obtidos resultados de mais 12 amostras de 15 em 15 minutos. É possível retirar os tubos de amostras do interior do equipamento depois destas tiverem sido pipetadas para processamento e a qualquer momento de funcionamento do equipamento é possível colocar mais amostras, permitindo um processamento de amostras contínuo. Desta forma, a Alinity m System tem a capacidade de processar 300 amostras para o ensaio do SARS-CoV-2 em aproximadamente 8 horas.

O Alinity m System é um ensaio muito automatizado, onde todo o ensaio é processado em contínuo, sem interrupções e com uma menor necessidade de intervenção humana. Permite que uma maior quantidade de amostras seja processada e que os resultados sejam obtidos com maior brevidade, sendo desta forma uma mais-valia para o laboratório.

4.2. Testes Rápidos

No LACUC, o teste rápido para a deteção qualitativa do antigénio SARS-CoV-2 é feito com o kit Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device a partir de amostras de exsudado nasofaríngeo colhido por zaragatoa. Este teste baseia-se na técnica de LFA.

Dispor de um teste de diagnóstico rápido e económico é essencial para prevenir a disseminação do vírus. Este teste de rastreio possibilita obter resultados rápidos de forma a tomar medidas de isolamento imediato, evitando o contágio de mais indivíduos.

Após a colheita, a zaragatoa é inserida e armazenada num tubo com tampão de extração, responsável por extrair as proteínas virais. O teste deve ser realizado até duas horas após a colheita e o tubo deve permanecer à temperatura ambiente (15° a 30°).

Para a realização do teste é necessário retirar a tampa do bico de gotejamento na parte inferior do tubo de extração e dispensar 5 gotas da amostra extraída na cavidade destinada à amostra (S) no dispositivo. É iniciado o cronómetro e o resultado é lido após 15 minutos. No fim é descartado o kit de reação e a amostra, e é descontaminado o material potencialmente contaminado.

Na tira de membrana, a linha de teste (T) está revestida com anticorpo anti-SARS-CoV-2 e a linha de controlo (C) está revestida com anticorpo monoclonal de camundongo antigalinha. Na membrana existem ainda partículas de ouro conjugadas com anticorpo específico contra o antígeno SARS-CoV-2 e partículas de ouro conjugadas com anticorpo de galinha. Caso o antígeno viral esteja presente na amostra este liga-se ao anticorpo anti-SARS-CoV-2 que está conjugado à partícula de ouro e vai migrar na membrana até à linha T, onde o antígeno se liga ao anticorpo anti-SARS-CoV-2 aí presente, formando uma linha visível nessa zona. O conjugado de ouro com o anticorpo de galinha também vai migrar e na linha C ocorre a ligação deste com o anticorpo que aí está imobilizado, e há o aparecimento de uma linha. Esta linha de controlo visível serve para validar o resultado do teste, ou seja, confirma que o teste foi realizado corretamente e que os reagentes estão a funcionar normalmente. O kit possui ainda um controlo negativo e um controlo positivo para avaliar a fiabilidade do teste e a capacidade do técnico para realizar o teste e de interpretar os resultados.

Após os 15 minutos, a presença da linha de controlo e ausência da linha de teste dentro da janela de resultado indica um resultado negativo. Por outro lado, a presença das duas linhas dentro da janela de resultados indica um resultado positivo. A linha de teste mesmo que muito ténue indica que o resultado é positivo. O teste é considerado inválido quando a linha de controlo não surge.

Os resultados negativos não excluem a possibilidade de infeção pelo vírus SARS-CoV-2 devido à sensibilidade e limite de deteção deste teste, no entanto, um resultado positivo confirma o diagnóstico de infeção em indivíduos sintomáticos e em contactos assintomáticos de casos de COVID-19 em situações contextualizadas.

4.3. Teste Serológico

Os testes de anticorpos não podem ser usados como métodos de diagnóstico para o COVID-19, pois em maior parte dos casos apenas a partir da segunda semana após aparecimento de sintomas é que a resposta imunológica começa a se desenvolver. Os resultados serológicos negativos não podem excluir infeção, contudo, estes são úteis para estudos epidemiológicos da doença na sociedade, permitindo identificar os indivíduos previamente expostos ao SARS-CoV-2, podem desempenhar um papel complementar no processo diagnóstico e permitem avaliar a produção de anticorpos pós-vacinação.⁵² É ainda possível, através dos testes de deteção de anticorpos, fazer a distinção entre imunidade adquirida devido à infeção por SARS-CoV-2 e imunidade adquirida através da vacinação. Os

anticorpos resultantes da vacinação são anticorpos IgM e IgG contra a proteína S. Quando há infecção por SARS-CoV-2 há a produção de anticorpos contra a proteína S, mas também a produção de anticorpos contra outras proteínas virais, como é o caso da proteína da nucleocápside. Fazendo a detecção simultânea dos anticorpos contra a proteína S e dos anticorpos contra a proteína N é possível distinguir a origem da imunidade, ou verificar se, apesar de vacinado, o indivíduo teve infecção por SARS-CoV-2. Se for detetada a presença de anticorpos contra a proteína N, o indivíduo está imunizado através da infecção. Por outro lado, se apenas for detetada a presença de anticorpos contra a proteína S o indivíduo está imunizado através da vacina.

O equipamento utilizado no LACUC para os testes serológico é o VIDAS[®], um imunoanalisador de bancada automatizado. Os reagentes VIDAS[®] SARS-CoV-2 IgM e VIDAS[®] SARS-CoV-2 IgG permitem a realização de ensaios automatizados através da técnica ELFA para detecção qualitativa de anticorpos IgM e IgG para o SARS-CoV-2 no soro. O princípio do ensaio combina um método imunoenzimático tipo *sandwich* com detecção final por fluorescência. Neste ensaio, os anticorpos que estão a ser pesquisados ligam-se aos antígenos imobilizados numa fase sólida. Um anticorpo secundário marcado com uma enzima liga-se também ao anticorpo a ser pesquisado que, por sua vez, já está ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida. Há a adição do substrato, que é degradado pela enzima num composto que emite fluorescência e esta fluorescência é depois detetada pelo equipamento.

O *Solid Phase Receptacle* (SPR) serve como fase sólida, é revestido com o antígeno (proteína S) e é também o utensílio de pipetagem. Os reagentes necessários para o ensaio estão prontos para uso em tiras de reagentes seladas. Primeiramente, é necessário pipetar manualmente 100 µL da amostra para o poço correspondente presente na tira de reagentes. Seguidamente, as IgM ou IgG específicas para SARS-CoV-2 são capturadas pelos antígenos que revestem o interior da parede do SPR e os componentes não ligados são eliminados durante as etapas de lavagem. Durante a segunda etapa, liga-se ao complexo já formado um anticorpo anti-humano dirigido contra IgM ou IgG, que está marcado com a enzima fostatase alcalina. Na etapa final de detecção, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é colocado em contacto com a enzima conjugada e esta vai catalisar a hidrólise desse substrato num produto fluorescente (4-metil-umbeliferona), cuja fluorescência é medida a 450 nm no último poço de cada tira. A intensidade da fluorescência vai ser diretamente proporcional à quantidade de anticorpo na amostra.

Este ensaio demora aproximadamente 27 minutos. Após a sua conclusão o resultado é impresso e é necessário remover o SPR e tira de reagentes do instrumento.

A calibração de cada um dos ensaios é realizada utilizando o padrão fornecido pelo kit cada vez que um novo lote de reagentes for utilizado ou a cada 28 dias, para compensar possíveis variações no sinal do ensaio ao longo da vida útil do kit. O controlo positivo e negativo devem ser processados para validar cada calibração e garantir que o desempenho do reagente não está alterado.

O estudo de anticorpos fornece informação adicional, mas não pode ser utilizado como método de diagnóstico da infeção ativa, para tal tem de ser detetada a presença de RNA viral através da técnica RT-PCR ou a presença de antígeno por teste rápido. De uma forma resumida, na tabela seguinte (Tabela 6), está apresentada uma interpretação da correlação entre os resultados dos testes moleculares e serológicos. Outros tipos de perfis podem ser encontrados e ainda há muito para saber sobre esta infeção, no entanto os casos apresentados são os mais habituais na prática laboratorial.

Tabela 6: Interpretação dos resultados de RT-PCR e da deteção de IgM e IgG

RT-PCR	IgM	IgG	Interpretação
-	-	-	Ausência de infeção
+	-	-	Infeção ativa
+	+	-	
+	+	+	
+	-	+	Reinfeção ou Fase final da infeção
-	-	+	Infeção resolvida ou Vacinação
-	+	+	Fase de convalescença

5. FASE PÓS-ANALÍTICA

Na técnica de RT-PCR a validação é feita no *Apollo*, a partir da visualização dos gráficos da emissão de fluorescência das amostras. Se não houver qualquer falha nos controlos e sonda de referência, os resultados são validados e enviados. O resultado pode ser dado como: positivo ou detetado; negativo ou não detetado; inconclusivo. Os resultados

positivos devem ser interpretados e correlacionados com o histórico laboratorial e clínico do doente, de forma a determinar o estado da infeção por SARS-CoV-2. Um resultado negativo significa apenas que o vírus não foi detetado, não significando obrigatoriamente que este não esteja presente. Pode haver falsos negativos no estado inicial ou na fase de recuperação da infeção, onde a carga viral é reduzida, sendo importante ter também em consideração o histórico do doente e a informação epidemiológica. Um teste com resultado inconclusivo pode resultar de uma amplificação anormal ou tardia sem histórico, ou de uma falha no processamento da amostra, em que não seja possível validar o resultado. Quando o resultado é dado como inconclusivo é aconselhado a que o doente faça nova colheita.

Também os resultados do teste rápido para a deteção do antigénio viral e dos testes serológicos para a deteção de anticorpos IgM e IgG podem ser interpretados e correlacionados com informações clínicas.

Os resultados são entregues pelo laboratório ao utente ou às entidades competentes, e notificados obrigatoriamente no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE).

Conclusão

A realização deste estágio permitiu consolidar e aplicar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante o mestrado, assim como ter um primeiro contacto com a realidade do trabalho em análises clínicas e da rotina e gestão de um laboratório. Tive a oportunidade de aprender e realizar novas metodologias e de trabalhar com diversos equipamentos, adquirindo diversas competências técnicas e científicas.

Desenvolvi as minhas capacidades de organização, de autonomia e de trabalho em equipa, capacidades que julgo serem muito importantes para ser uma boa profissional no futuro.

Uma grande parte do estágio foi realizada no LACCSMC, onde tive a oportunidade de trabalhar em todos os setores do laboratório e tive sempre um excelente acompanhamento por toda a equipa de profissionais, que me ensinaram e auxiliaram sempre que necessário, mas que também me deram a autonomia necessária para a aquisição de experiência e de confiança no meu trabalho.

A experiência de estágio no LACUC (setor COVID-19), para além de todas as aprendizagens e competências que também me deu, foi valiosa para perceber quanto o papel das análises clínicas é importante na vida de todos os cidadãos e perceber a grande responsabilidade de todos os funcionários de um laboratório de análises clínicas.

Após concluir o estágio, posso afirmar que este foi uma mais-valia para mim, contribuindo para a minha formação profissional e pessoal.

Bibliografia

1. BOWEN, Raffick A.R.; ADCOCK, Dorothy M. - Blood collection tubes as medical devices: The potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clinical Biochemistry*, 49 (2016), p1321–1330.
2. Organização Mundial da Saúde - *Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: Boas práticas em flebotomia*. 2010 [Acedido a 3 de Setembro de 2021] Disponível em: https://www.who.int/infection-prevention/publications/Phlebotomy-portuges_web.pdf
3. ZEMLIN, Annalise E. - Errors in the Extra-Analytical Phases of Clinical Chemistry Laboratory Testing. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33, 2 (2018), p154–162.
4. BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
5. GAW, Allan et al. - *Bioquímica Clínica*. 5º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7799-9
6. DOMINICZAK, Marek H. - Homeostasia da Glicose e Metabolismo Energético. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
7. BERTONHI, L. G.; DIAS, J. C. R. - Diabetes mellitus tipo 2 : aspectos clínicos , tratamento e conduta dietoterápica. *Revista Ciências Nutricionais Online*, 2, 2 (2018), p1–10.
8. Direção Geral da Saúde - *Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus*. 2011 [Acedido a 5 de Setembro de 2021] Disponível em: <https://nocs.pt/diagnostico-classificacao-diabetes-mellitus/>
9. NEVES, C. et al. - Diabetes Mellitus Tipo 1. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 12, 4 (2017), p159-167.
10. REMALEY, Alan T.; RIFAI, Nader; WARNICK, G. R. - Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiac Risk Factors. In: BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7º Ed. St. Louis: Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6, p388-411.
11. DOMINICZAK, Marek H - Metabolismo de Lipoproteínas e Aterogênese. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
12. XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
13. DOMINICZAK, Marek H.; BEASTALL, Graham; Wallace, A. M. - Biossíntese de Colesterol e Esteroides. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
14. KOOLMAN, J.; ROEHM, K. - *Color Atlas of Biochemistry*. 2º Ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005. ISBN 3-13-100372-3. p286-287.
15. HIGGINS, Trefor - Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. In: BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7º Ed. St. Louis: Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6, p508-513.

16. DOMINICZAK, Marek H.; BROOM, John I. - Vitaminas e Minerais. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
17. JONES, Alan F. - Papel do Fígado no Metabolismo. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
18. KLAMT, Alexandre L. - Icterícia. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
19. DOMINICZAK, Marek H. - O Papel dos Rins no Metabolismo. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
20. SODRÉ, Fábio. L. et al. - Avaliação da função e da lesão renal: Um desafio laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43, 5 (2007), p329–337.
21. KAROHL, Cristina et al. - Avaliação da Função Renal. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
22. ROSA, Nuno G. et al. - Rabdomiólise. *Acta Medica Portuguesa*, 18, 4 (2005), p271–282.
23. BOCK, Jay L. - Cardiac Injury, Atherosclerosis, and Thrombotic Disease. In: MCPHERSON, Richard A. et al. - *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 23º Ed. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-29568-0. p244-252
24. APPLE, Fred S. et al. - Cardiovascular Disease. In: BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 7º Ed. St. Louis: Saunders, 2015. ISBN 978-1-4557-4165-6, p638-648
25. TELÓ, Guilherme H. - Cardiopatia Isquêmica. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
26. DOMINICZAK, Marek H. - Homeostase da Água e de Eletrólitos. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
27. THOMÉ, Fernando S. - Disnatremias. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
28. THOMÉ, Fernando S. - Distúrbios hídrolíticos. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
29. WEINERT, Letícia S. - Hipercalemia. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
30. SCHEFFEL, Rafael S. - Hipocalcemia. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
31. BONIATTI, Marcio M. - Choque Séptico. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2

32. DOMINICZAK, Marek H. - Sangue: Células e Proteínas Plasmáticas. In: BAYNES, John W.; DOMINICZAK, Marek H. - *Bioquímica Médica*. 4º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN 978-85-352-7903-0
33. KRUMEL, Candice F. - Pancreatite Aguda. In: XAVIER, Ricardo M.; DORA, José M.; BARROS, Elvino - *Laboratório na prática clínica: consulta rápida*. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-308-2
34. MAHON, Connie R. et al - *Textbook of diagnostic microbiology*, 5ª Ed. Missouri: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0
35. BROOKS, Geo. F. et al. - *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology*, 26º Ed. New York: The McGraw-Hill Global Education Holdings, 2013. ISBN 9780071790314
36. HOLANDA, Cecília M. C. X. et al. - *Manual de bacteriologia e de enteroparasitos*. Natal, RN: EDUFRRN, 2017. ISBN 978-85-425-0743-0
37. LEVINSON, Warren - *Microbiologia médica e imunologia*, 10º Ed. Porto Alegre: AMGH, 2011. ISBN 978-85-63308-72-6
38. SOUSA, Marcus R. N. et al. - Patogênese e perspectivas de tratamento da Covid-19: uma revisão. *Research, Society and Development*, 9, 7 (2020).
39. LU, Roujian et al. - Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395 (2020). p565–574.
40. MITTAL, Anshumali et al. - COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathogens*, 16, 8 (2020).
41. SHEREEN, Muhammad A. et al. - COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. In *Journal of Advanced Research*, 24 (2020). p91–98.
42. WANG, Mei-Yue et al. - SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 587269 (2020).
43. KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang G. - From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. In *Infection, Genetics and Evolution*, 85 (2020).
44. LI, Geng et al. - Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92, 4 (2020). p424–432.
45. MARKS, Michael et al. - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, 2nd Edition (2021).
46. AL-QAHTANI, Ahmed A. et al. - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Emergence, history, basic and clinical aspects. In *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (2020), p2531–2538.
47. NAQVI, Ahmad A. T. et al. - Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Molecular Basis of Disease*, 1866 (2020).
48. ISLAM, Khursheed U.; IQBAL, Jawed - An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 560616 (2020).
49. VOGL, Thomas; LEVIATAN, Sigal; SEGAL, Eran - SARS-CoV-2 antibody testing for estimating COVID-19 prevalence in the population. *Cell Reports Medicine*, 2, 100191 (2021).

50. KRAJEWSKI, Rafal - Update on serologic testing in COVID–19. *Clinica Chimica Acta*, 510 (2020), p746–750.
51. Direção-Geral da Saúde - *COVID-19: Diagnóstico Laboratorial*. 2020 [Acedido a 6 de fevereiro de 2021] Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>
52. ALKHAIRY, Omar K.; MEMISH, Ziad A.; HAJEER, Ali H. - Serologic aspects of COVID-19: Recommendations for use in the clinical setting. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 41(2021).

Anexos

Anexo I - Componentes do EPI:

- Fato de proteção com capuz
- Máscara FFP2
- Óculos de proteção ou Viseira
- Bata impermeável
- Touca
- 2 pares de luvas
- 2 pares de proteções de calçado

Anexo II - Fotografias de curvas de fluorescência obtidas no LACUC

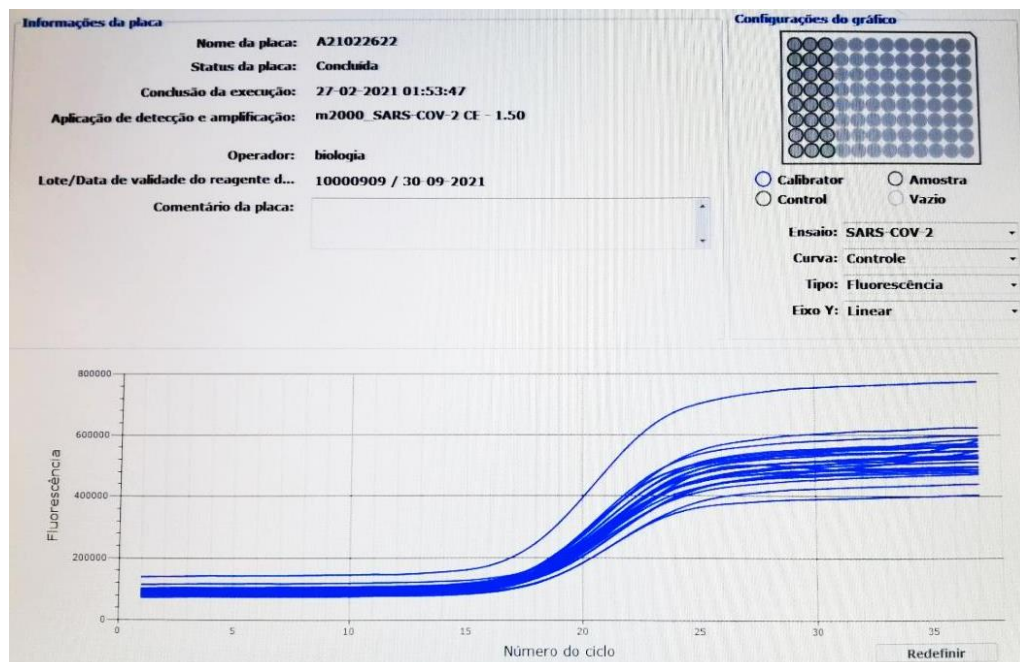


Figura 7: Curvas do controlo interno de todos os poços

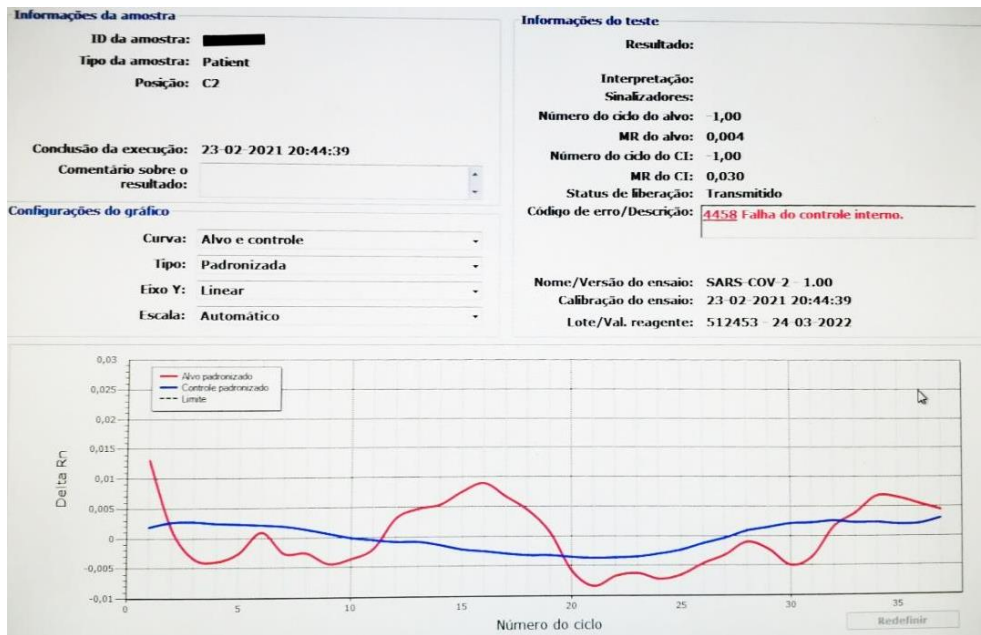


Figura 8: Falha do controle interno (curva azul)

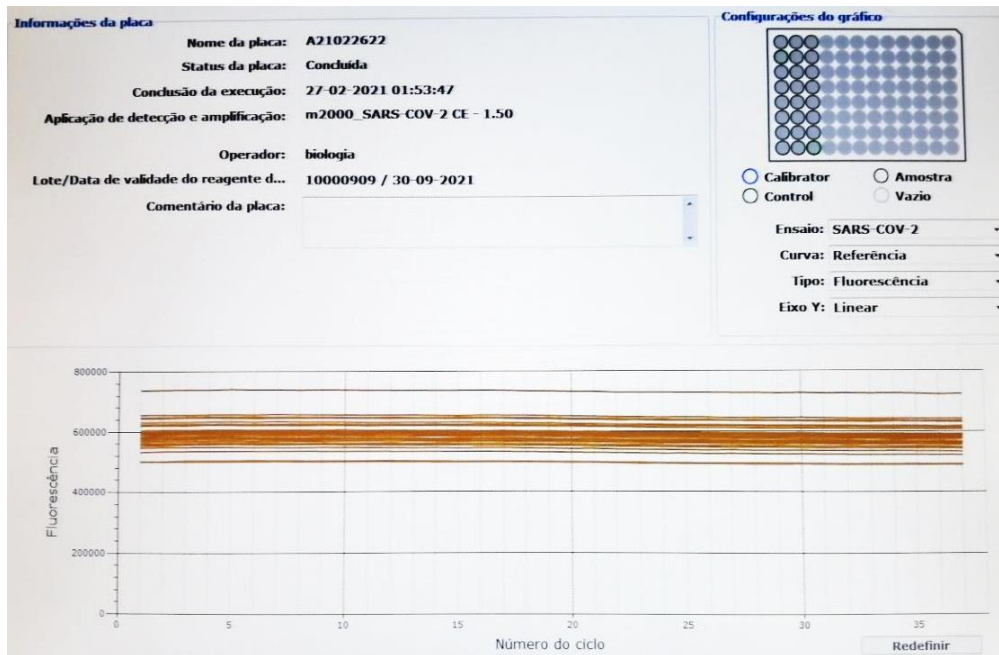


Figura 9: Curvas da sonda de referência

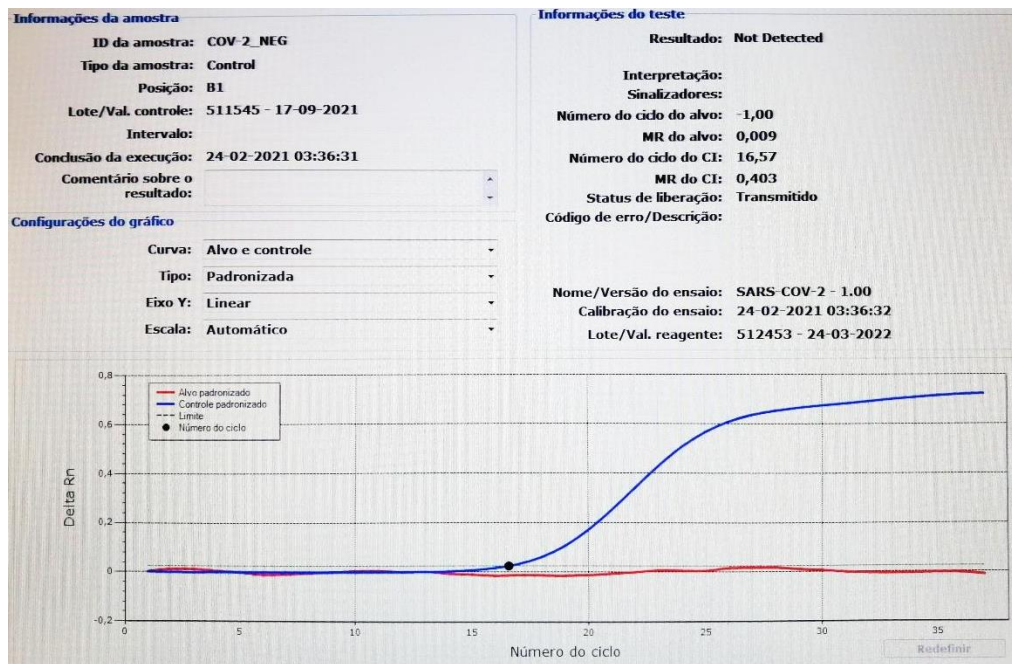


Figura 10: Curva do controlo negativo (curva vermelha)

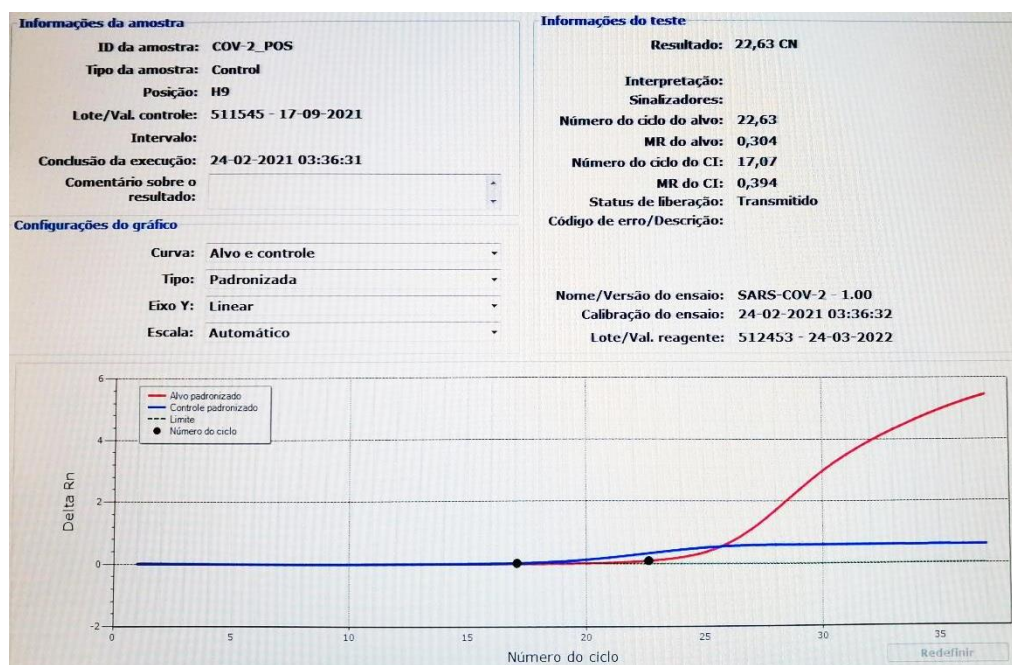


Figura 11: Curva do controlo positivo (curva vermelha)

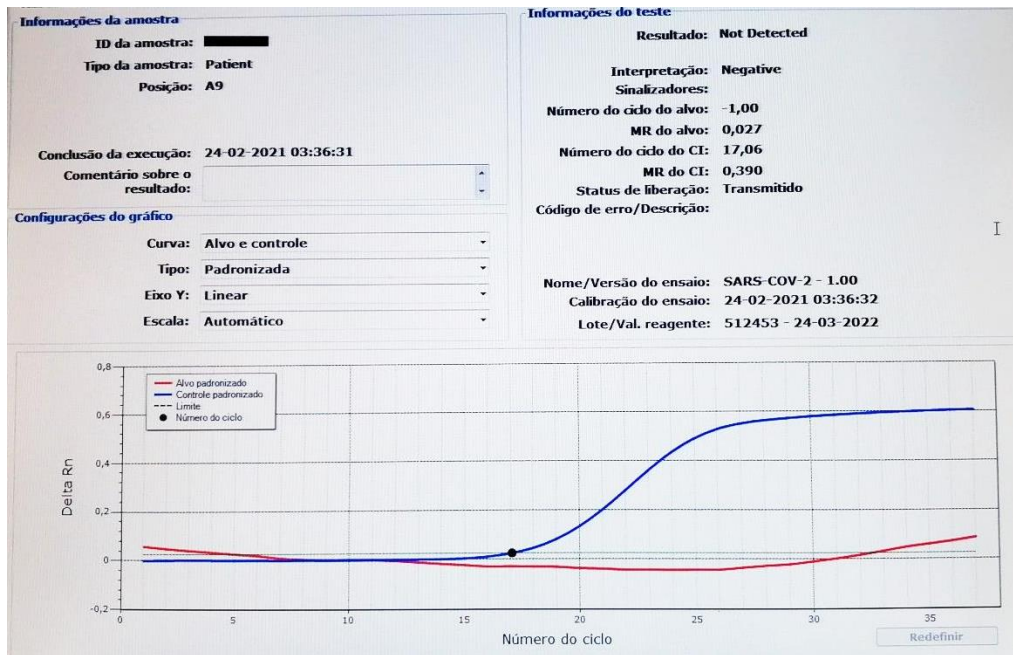


Figura 12: Curva de fluorescência com forma atípica (curva vermelha)

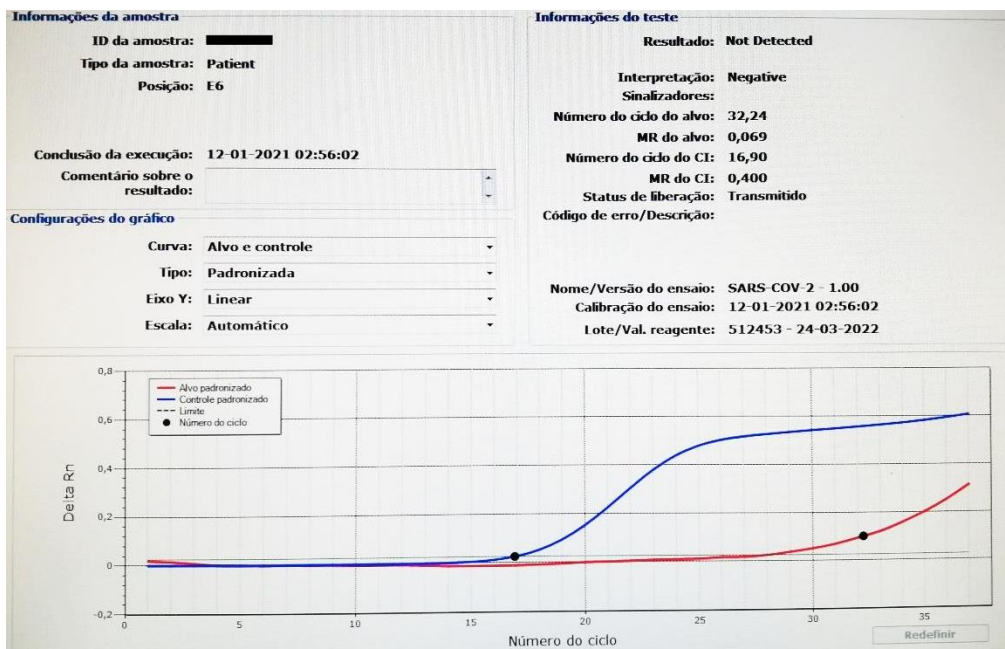


Figura 13: Curva de fluorescência com amplificação tardia, ct: 32,24 (curva vermelha)