



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

João Ricardo Rodrigues Nunes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva,
pela Dra. Ana Sofia Jorge e pela Dra. Vera Santos, apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

João Ricardo Rodrigues Nunes

Relatório de Estágio
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, pela Dra. Ana Sofia Jorge e pela Dra. Vera Santos, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Curricular realizado no Hemobiolab, Laboratório de Análises Clínicas na Affidea Castelo Branco, no período decorrido entre 3 de maio de 2021 e 1 de outubro de 2021.

Fevereiro de 2022

Agradecimentos

À minha mãe e ao meu pai, por toda a educação e carinho ao longo dos anos. Foram vocês que me proporcionaram toda a minha formação académica e pessoal. O que sou hoje, é em parte, graças aos dois.

Aos meus avós, por sempre me terem tratado como um filho. Tenho orgulho em vocês e vejo-vos como um exemplo de vida.

Ao meu padrinho, desde os momentos mais divertidos aos melhores conselhos... és um verdadeiro amigo, sempre presente, que me ajuda em tudo na vida. És sem dúvida um exemplo daquilo que se pode alcançar a nível pessoal e profissional.

À Ana, namorada, melhor amiga e companheira. Ao teu lado, fui aprendendo as diferentes definições de felicidade. És um exemplo para mim e tenho orgulho em ti, obrigado por estares presente nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos de Castelo Branco e de Coimbra, desejo-vos o maior sucesso e felicidade na vida, todos vocês (à vossa maneira) são brilhantes!

À Dra. Vera Santos (Técnica Superior de Saúde), à Dra. Sofia Jorge (Diretora Técnica e Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana), ao Dr. Marco Amaral (Farmacêutico Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana), ao Dr. Duarte Rocha (Técnico Superior de Saúde) e à Técnica de Análises Clínicas Lina Barata, por me terem ajudado e me terem integrado no vosso laboratório. Aprendi com cada um de vocês e o vosso espírito de equipa, conhecimento e métodos de trabalho foram um exemplo e uma inspiração para mim. Senti-me motivado em cada dia do estágio.

À Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva, para além de coordenadora do Mestrado, tive o privilégio de a ter como Orientadora do Relatório de Estágio. Obrigado pela ajuda, apoio e aconselhamento nestes 2 anos de curso e em especial nos últimos meses.

A todos o meu muito obrigado!

Índice

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Introdução	I
1. Caracterização do Laboratório de Estágio	3
2. Hematologia Clínica.....	4
2.1. Hematopoiese.....	5
2.2. Hemograma.....	8
<i>Glóbulos vermelhos</i>	9
<i>Hemoglobina</i>	9
<i>Hematócrito</i>	10
<i>Volume Corpuscular Médio (VCM)</i>	10
<i>Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)</i>	11
<i>Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina (CCMH)</i>	11
<i>Amplitude de Distribuição Eritrocitária ou Red Distribution Width (RDW)</i>	11
<i>Reticulócitos</i>	11
<i>Glóbulos brancos e fórmula leucocitária</i>	12
<i>Plaquetas</i>	12
2.3. Esfregaço de Sangue Periférico	13
2.4. Velocidade de sedimentação (VS)	14
2.5. Determinação de grupos sanguíneos.....	15
2.6. Teste de Coombs	16
2.7. Estudo da Hemóstase.....	17
<i>Tempo de protrombina</i>	17
<i>Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)</i>	18
<i>Tempo de trombina</i>	18
<i>Fibrinogénio</i>	19
<i>D-Dímeros</i>	19
3. Bioquímica Clínica	19
3.1. Metabolismo dos hidratos de carbono	19
<i>Glucose</i>	19
<i>Diabetes mellitus</i>	20
<i>Diagnóstico de diabetes</i>	20
<i>Hemoglobina Glicada A_{1C} (HbA_{1C})</i>	21
3.2. Biomarcadores da função pancreática.....	22
<i>Amilase</i>	22
<i>Lípase</i>	23
3.3. Biomarcadores de avaliação hepática	23
3.4. Biomarcadores da função renal	25
<i>Ureia</i>	25
<i>Creatinina</i>	26

<i>Depuração de creatinina e filtração glomerular</i>	26
3.5. Ionograma.....	27
<i>Sódio</i>	27
<i>Potássio</i>	27
<i>Cloro</i>	28
3.6. Biomarcadores de lesão cardíaca e muscular.....	28
<i>Creatina cinase</i>	28
<i>Troponinas</i>	29
<i>Mioglobina</i>	29
3.7. Proteinograma	29
3.8. Marcadores tumorais.....	31
4. Microbiologia Clínica.....	32
4.1. Urina	32
4.1.1. Urocultura.....	32
<i>Cultura quantitativa da urina</i>	32
<i>Análise sumária de urina (Urina tipo II)</i>	34
4.1.2. Infecções do trato urinário (ITU)	36
4.2. Esperma.....	37
4.2.1. Espermocultura	37
4.2.2. Espermograma.....	38
4.3. Fezes	39
4.3.1. Exame bacteriológico de fezes	39
<i>Coprocultura</i>	39
4.3.2. Exame parasitológico de fezes.....	41
4.4. Exsudado vaginal	42
4.5. Exsudado auricular	43
4.6. Pesquisa de streptococci Grupo B de Lancefield (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	44
5. SARS-CoV-2 e a COVID-19.....	45
5.1. Amostra	47
5.2. Teste rápido para pesquisa de antígeno	48
5.3. Pesquisa de genoma viral por RT-PCR em tempo real.....	50
<i>Interpretação de um caso positivo de infecção por SARS-CoV-2</i>	53
6. Casos Clínicos.....	55
6.1. Caso Clínico 1	55
6.2. Caso Clínico 2	56
Conclusão.....	58
Referências Bibliográficas.....	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Hierarquia das células hematopoiéticas (Mahalingaiah, Palenski e Vleet, Van, 2018).....	6
Figura 2 – Os fatores de crescimento na hematopoiese (Kaushansky, 2006).	8
Figura 3 – A: Representação esquemática da técnica de esfregaço de sangue periférico (Keohane, Otto e Walenga, 2019); B: Extensões de sangue periférico executadas pela técnica descrita acima.	14
Figura 4 – Determinação de grupos sanguíneos utilizando os cartões DG Gel Confirm.....	15
Figura 5 – Teste de Coombs direto e indireto (Zarandona e Yazer, 2006).....	17
Figura 6 – A cascata da coagulação (Perez-Pujol, Aras e Escolar, 2012).....	18
Figura 7 – Perfil eletroforético normal de um proteinograma do soro (Lee et al., 2017)....	30
Figura 8 – A: Colônias sugestivas de <i>Proteus mirabilis</i> em meio CPS Elite; B: Colônias sugestivas de <i>Escherichia coli</i> em meio CPS Elite; C: Colônias sugestivas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em meio CPS Elite.	34
Figura 9 – Coprocultura; A: Recipiente coletor de fezes; B: Caldo de enriquecimento seletivo BBL™ GN broth; C: kit FecalSwab®; D: gelose Campyloset.	41
Figura 10 – Ovo fértil de <i>Ascaris lumbricoides</i> observado na objetiva de 10x numa amostra de fezes com lugol.	42
Figura 11 – Isolamento de colônias de <i>Candida sp.</i> em meio de cultura CAN2.....	43
Figura 12 – Isolamento de colônias de <i>Streptococcus agalactiae</i> (colônias cor-de-laranja) em meio de cultura Granada.	45
Figura 13 – Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2 (Santos et al., 2020).....	46
Figura 14 – Representação esquemática de um ensaio de fluxo lateral (Qriouet et al., 2021).	49
Figura 15 – Teste rápido para pesquisa de antígeno viral positivo.....	49
Figura 16 – Amostra positiva para SARS-CoV-2 identificado por RT-PCR em tempo real.	54
Figura 17 – Esfregaço de sangue periférico evidenciando a presença de macroplaquetas e agregados plaquetários.	56
Figura 18 – Esfregaço de sangue periférico evidenciando eritrócitos com ponteados basófilos, algumas células em alvo, algumas células em charuto e poiquilocitose.....	57

Índice de Tabelas

Tabela I – Equipamento e parâmetros analíticos do laboratório.....	4
Tabela II – Classificação de anemias segundo o volume corpuscular médio e algumas das suas causas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	10
Tabela III – Fórmula leucocitária em valores relativos e absolutos (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	12
Tabela IV – Grupos sanguíneos segundo o sistema AB0 (Hosoi, 2008).....	16
Tabela V – Isoenzimas da creatina cinase (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	28
Tabela VI – Valores absolutos e em percentagem das diferentes frações de um proteinograma (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).....	30
Tabela VII – Principais marcadores tumorais usados na prática clínica e patologias associadas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	31
Tabela VIII – Técnicas para recolha de urina e algumas indicações (Direção-Geral da Saúde, 2012).....	32
Tabela IX – Regras a ter em consideração na valorização de uma urocultura (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	33
Tabela X – Exame macroscópico, determinações físico-químicas e a sua relação com a clínica (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	35
Tabela XI – Critérios de classificação para considerar uma urocultura positiva (Direção-Geral da Saúde, 2012; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	37
Tabela XII – Parâmetros do espermograma e sua interpretação (Direção-Geral da Saúde, 2011; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).	38

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico	ITU – Infecção do Trato Urinário
AFP – Alfa Fetoproteína	LDH – <i>Lactate Dehydrogenase</i>
ALT – Alanina Aminotransferase	M-CSF – <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	OMS – Organização Mundial de Saúde
AST – Aspartato Aminotransferase	PCR – <i>Polymerase Chain reaction</i>
BUN – Nitrogénio Ureico no Sangue	PDW – <i>Platelet Distribution Width</i>
CA – <i>Carbohydrate Antigen</i>	PSA – <i>Prostate Specific Antigen</i>
CCMH – Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina	PTOG – Prova de Tolerância Oral à Glicose
cDNA – DNA complementar	RDW – <i>Red Distribution Width</i>
CEA – <i>Carcinoembryonic Antigen</i>	Rh – Fator Rhesus
CK – Creatina Cinase	RNA – Ácido Ribonucleico
CLSI – <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	RT-PCR – <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
CT – <i>Cycle Thershold</i>	SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2
EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio	SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético	TFG – Taxa de Filtração Glomerular
G-CSF – <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>	TG – Tiroglobulina
GM-CSF – <i>Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor</i>	UFC – Unidade Formadora de Colónias Granulocíticas
Hb – Hemoglobina	UFC-G – Unidade Formadora de Colónias Granulocíticas
HbA _{1C} – Hemoglobina Glicada A _{1C}	UFC-M – Unidade Formadora de Colónias Monocíticas
HbF – Hemoglobina Fetal	VCM – Volume Corpuscular Médio
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média	VS – Velocidade de Sedimentação
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	γGT – Gamaglutamil Transpeptidase
Ig – Imunoglobulina	
IL – Interleucina	
INR – Tempo de Protrombina	

Resumo

Entre o início de maio de 2021 e o primeiro dia de outubro de 2021 tive a oportunidade de realizar o meu estágio curricular no Hemobiolab, Laboratório de Análises Clínicas da Affidea em Castelo Branco.

Neste relatório são descritas atividades que desenvolvi durante o meu período de estágio. Primeiramente é abordada a Hematologia, uma das valências que escolhi dar mais ênfase. De seguida é abordada de forma sucinta a Bioquímica, onde faço uma descrição mais teórica de um conjunto de determinações analíticas mais comuns no laboratório e outras que considero importantes. Seguidamente decidi dar relevância à Microbiologia, onde a COVID-19 e a deteção do vírus SARS-CoV-2 adquirem especial destaque e relevância, considerando a pandemia que vivemos. Por último são discutidos alguns casos clínicos.

É também feita uma breve caracterização do laboratório de estágio.

Palavras-chave: Análises Clínicas; Hematologia; Bioquímica; Microbiologia; COVID-19; SARS-CoV-2; Affidea.

Abstract

Between May 3rd and October 1st, I had the opportunity to complete my curricular internship at Hemobiolab, Affidea's clinical analysis laboratory in Castelo Branco, Portugal.

This report describes activities that I have developed during my internship period. Firstly, Hematology is addressed, one of the valences that I chose to emphasize. Next, Biochemistry is briefly addressed, with a more theoretical approach of a set of most common analytical determinations in the laboratory and others that I consider important. Then, I decided to give relevance to Microbiology, where COVID-19 and the detection of the SARS-CoV-2 virus acquire special prominence and relevance, considering the pandemic we are going through. Finally, some clinical case studies are discussed.

A brief characterization of Affidea's clinical analysis laboratory is also addressed.

KeyWords: Clinical Analysis; Hematology; Biochemistry; Microbiology; COVID-19; SARS-CoV-2; Affidea.

Introdução

O estágio curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tem como principal objectivo o enquadramento pessoal e profissional no normal dia-a-dia de um Técnico Superior de Saúde num Laboratório de Análises Clínicas. Este é um estágio multidisciplinar que para além da aquisição de novos conhecimentos, visa a consolidação e aplicação dos aspectos teóricos e práticos, adquiridos ao longo do curso, em ambiente de trabalho.

Entre o início de maio e o primeiro dia de outubro de 2021 tive a oportunidade de estagiar no Hemobiolab, o laboratório de análises clínicas da Affidea em Castelo Branco. Em Portugal, o grupo Affidea marca presença desde 2007 e encontra-se nos dias de hoje em 6 unidades hospitalares, dispõe de 16 clínicas médicas, 2 das quais são policlínicas e 3 laboratórios centrais de análises clínicas (Castelo Branco, Lisboa e Porto) que abrangem mais de 300 postos de colheita. O grupo Affidea é acreditado por quatro organizações internacionais e todas as unidades da Affidea Portugal são certificadas de acordo com a Norma NP ISO 9001 (Affidea Portugal, [s.d.]).

A multidisciplinaridade inerente às Análises Clínicas e ao Analista, permitiu-me adquirir conhecimentos e experiência profissional, durante este estágio, em diferentes áreas como a Microbiologia, a Hematologia, Técnicas Imunológicas, a Bioquímica Clínica e Técnicas de Biologia Molecular na deteção de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real, assim como alguns dos processos envolvidos na Gestão e Garantia da Qualidade.

I. Caracterização do Laboratório de Estágio

O laboratório de análises clínicas da Affidea, encontra-se no interior da clínica, na Quinta da Milhã – Estrada do Salgueiro, 6000-168 Castelo Branco. O laboratório conta com a direção técnica da Dra. Ana Sofia Jorge, farmacêutica especialista em análises clínicas e genética humana. Para além da Dra. Ana Sofia Jorge, a equipa laboratorial da Affidea Castelo Branco é atualmente composta por mais 3 farmacêuticos, a Dra. Lídia Maguejo que assume as funções de diretora técnica adjunta, a Dra. Idalina Melfe e o Dr. Armindo Fernandes, farmacêuticos especialistas em análises clínicas e genética humana. Tive também o gosto de conhecer o Dr. Marco Amaral, farmacêutico especialista em análises clínicas e genética humana, durante o meu período de estágio. Esta equipa conta também com 2 técnicos superiores de saúde, a Dra. Vera Santos, mestre em bioquímica e o Dr. Duarte Rocha, mestre em ciências biomédicas. Vários técnico(a)s de análises clínicas e técnico(a)s de colheitas, fazem também parte da equipa do laboratório.

Este é um dos três laboratórios centrais da Affidea Portugal e recebe amostras de vários postos de colheita distribuídos pelos distritos de Castelo Branco, Guarda, Portalegre, Santarém e Beja. Com o surgimento da pandemia, o modo de funcionamento e o fluxo de amostras foi alterado, sendo que no primeiro pico da fase pandémica o laboratório recebeu e processou cerca de 900 amostras para pesquisa de SARS-CoV-2 no pior dia de todos. Em média, e em condições normais, o laboratório processa diariamente cerca de 600 a 700 amostras biológicas. O horário de funcionamento é das 8h30 às 18h30 de segunda-feira a sexta-feira e das 9h às 13h aos sábados. Para além do Serviço Nacional de Saúde, existem protocolos estabelecidos com outras entidades. O utente pode também fazer qualquer tipo de análise clínica a título particular ou no âmbito da higiene e segurança no trabalho.

À entrada da clínica encontram-se os balcões de atendimento e auxílio aos utentes e mais à frente à direita, duas salas de colheita com casa de banho. Os gabinetes da direção técnica, do controlo de qualidade, serviços administrativos e uma copa, estão localizados logo à direita da entrada principal. No laboratório propriamente dito, este está dividido pela secção da bioquímica, a secção da microbiologia, a área da hematologia e a mais recente área da biologia molecular, onde se faz exclusivamente RT-PCR em tempo real para a deteção do mais recente coronavírus.

Os equipamentos, parâmetros analisados e métodos de determinação, estão descritos na Tabela I:

Tabela I – Equipamento e parâmetros analíticos do laboratório.

Secção	Equipamento	Parâmetros avaliados	Método
Hematologia	BCS® XP	Hemostase e provas de coagulação	Coagulometria
	VES-MATIC CUBE 30	Velocidade de sedimentação	Westergreen automático
	VES-MATIC CUBE 80		
	Yumizen H2500	Hemograma completo e contagem de reticulócitos	Impedância com laser
	Yumizen H1500	Hemograma completo	
	G8 HbA _{1c} Analyser	Hemoglobina glicada A _{1c}	HPLC
Microbiologia	VITEK® 2 Compact	Identificação microbiana e susceptibilidade a agentes antimicrobianos	Turbidimetria (na susceptibilidade a agentes antimicrobianos)
	Atellica 1500	Análise sumária de urina – Urina tipo II	Refractometria
Bioquímica	V8 Nexus	Proteinograma	Electroforese
	Zenit UP	Autoanticorpos	ELISA e IFA
	ADVIA Centaur® XP	Bioquímicos	Imunoensaios
	ADVIA 1800		
	Liaison	Anticorpos	Quimioluminescência
Biologia Molecular	QuantStudio® 5	Genoma viral de SARS-CoV-2	RT-PCR em tempo real

2. Hematologia Clínica

A hematologia é a ciência que estuda o sangue. Nas vertentes da clínica e laboratório, analisam-se as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), assim como os órgãos hematopoiéticos: a medula óssea, o baço e os gânglios linfáticos (Keohane, Otto e Walenga, 2019).

Atualmente, a generalidade dos laboratórios dispõe de autoanalisadores que permitem a determinação dos parâmetros hematológicos rapidamente com um elevado grau de fiabilidade. No entanto, o analista clínico, o farmacêutico ou o médico patologista continuam a ser imprescindíveis na adequada análise, interpretação e valorização dos resultados. Têm um papel fundamental na deteção de inúmeras alterações morfológicas que se podem observar num esfregaço de sangue periférico ou num medulograma, auxiliando o médico no diagnóstico clínico (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A hematologia clínica, nas suas vertentes de diagnóstico e terapêutica, está em constante interação com outras áreas médicas como a oncologia, a medicina interna e a imunohematoterapia (Joaquim Chaves Saúde, [s.d.]).

2.1. Hematopoiese

A hematopoiese abrange todos os processos de formação, diferenciação e maturação celulares do sangue (Figura 1). Inicia-se na medula óssea com a finalidade de libertar para a corrente sanguínea as células maduras e diferenciadas, que irão desempenhar as suas funções (Associação Portuguesa Contra a Leucemia, 2017).

O tecido hematopoiético está presente na medula óssea, nos gânglios linfáticos, no fígado, no baço e no timo. Cada um destes órgãos desempenha o seu papel único para um normal funcionamento da hematopoiese ao longo das suas diferentes fases (Sans-Sabrafen, Besses Raebel e Vives Corrons, 2002).

A medula óssea é o tecido mais importante da hematopoiese. É lá que se encontram as células estaminais, que têm a capacidade de se dividir e autorrenovar, bem como de se diferenciar nos vários tipos de células sanguíneas. As células-tronco dão assim origem às células progenitoras das linhagens mieloide e linfoide (Sans-Sabrafen, Besses Raebel e Vives Corrons, 2002).

Nas crianças existe medula óssea em quase todos os ossos, ao contrário do adulto cuja distribuição é maioritariamente pelos ossos da bacia, esterno e costelas (Keohane, Otto e Walenga, 2019). A constituição da medula óssea é propícia ao normal crescimento e desenvolvimento das células estaminais (Anjos, Alvares-Silva e Borelli, 2000; Sans-Sabrafen, Besses Raebel e Vives Corrons, 2002).

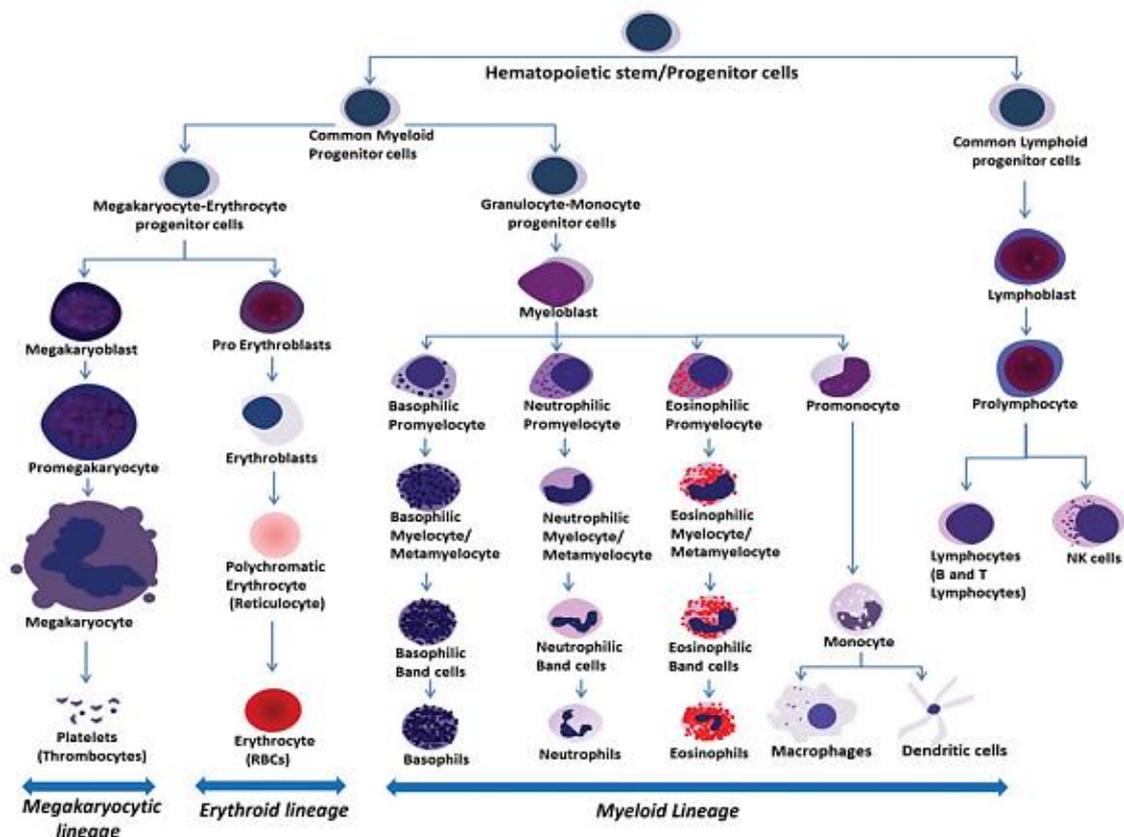


Figura 1 – Hierarquia das células hematopoiéticas (Mahalingaiah, Palenski e Vleet, Van, 2018).

Da linhagem mielóide derivam os eritrócitos (eritropoiese), as plaquetas (trombopoiese), os neutrófilos, eosinófilos e basófilos (granulopoiese) e os monócitos (monocitopoiese). Os linfócitos são os únicos descendentes da linhagem linfóide (Iwasaki e Akashi, 2007).

Pelo estímulo da eritropoietina, uma hormona produzida no rim, os eritroblastos dão origem aos reticulócitos na medula óssea, que atingindo o seu estado final de maturação, originam os eritrócitos na corrente sanguínea (eritropoiese). Este estímulo pode ocorrer quando existe uma diminuição dos níveis de oxigénio, em situações de anemia ou hipoxia e quando há renovação celular no fim de vida do eritrócito. Os eritrócitos são transportadores de oxigénio e dióxido de carbono (Dzierzak e Philipsen, 2013). O oxigénio é transportado dos pulmões para todos os tecidos do corpo humano e o dióxido de carbono é transportado para os pulmões para ser removido na expiração (Hamidi e Tajerzadeh, 2003). Cada eritrócito vive em média 120 dias e para a produção de novos glóbulos, além do estímulo da eritropoietina, são necessários o ferro, a vitamina B₁₂, o ácido fólico e o grupo heme (Braunstein, 2020).

Na trombopoiese, estimulada pela trombopoietina (uma hormona produzida no fígado e no rim), a medula óssea produz megacarioblastos. Chegando ao seu estado final de

diferenciação e maturação, estes originam os megacariócitos, que se fragmentam num grande número de plaquetas. Estas células atuam primariamente no controlo da hemorragia (Kaushansky, 2005).

Da granulopoiese resultam os leucócitos polimorfonucleares a partir de unidades formadoras de colónias granulocíticas (UFC-G). Os três tipos de granulócitos maduros são os neutrófilos (os mais abundantes, constituindo 55% a 65% de todos os glóbulos brancos), os eosinófilos (0,5% a 4%) e os basófilos (0,5% a 1%) (Cowland e Borregaard, 2016; Manz e Boettcher, 2014).

A formação dos monócitos a partir das unidades formadoras de colónias monocíticas (UFC-M) designa-se por monocitopoiese. A monocitopoiese envolve três fases de maturação, que se iniciam, respetivamente, nos mieloblastos, nos monoblastos e nos promonócitos. Os monócitos correspondem a 4% a 8% de todos os leucócitos circulantes, e a sua principal função é no combate à infeção, fagocitando microrganismos (bactérias, micobactérias, fungos, parasitas e vírus). Além de circularem no tecido sanguíneo, baço e medula óssea, durante os processos de inflamação os monócitos podem migrar para o tecido linfóide e não linfóide, dando origem aos macrófagos (Geissmann *et al.*, 2010).

A linfocitopoiese, ou linfopoiese, é o processo de formação dos linfócitos T e B. Enquanto os linfócitos B maturam completamente na medula óssea, os linfócitos T precisam de migrar para o timo para completarem o seu processo de maturação celular. Os linfócitos B podem ainda diferenciar-se em células plasmáticas ou plasmócitos (Busslinger, Nutt e Rolink, 2000; Hardy e Hayakawa, 1991).

Os fatores de crescimento hematopoiético (Figura 2) são hormonas glicoproteicas que têm a capacidade de regular a proliferação e a diferenciação das células progenitoras, bem como a função das células maduras (Groopman, Molina e Scadden, 1989).

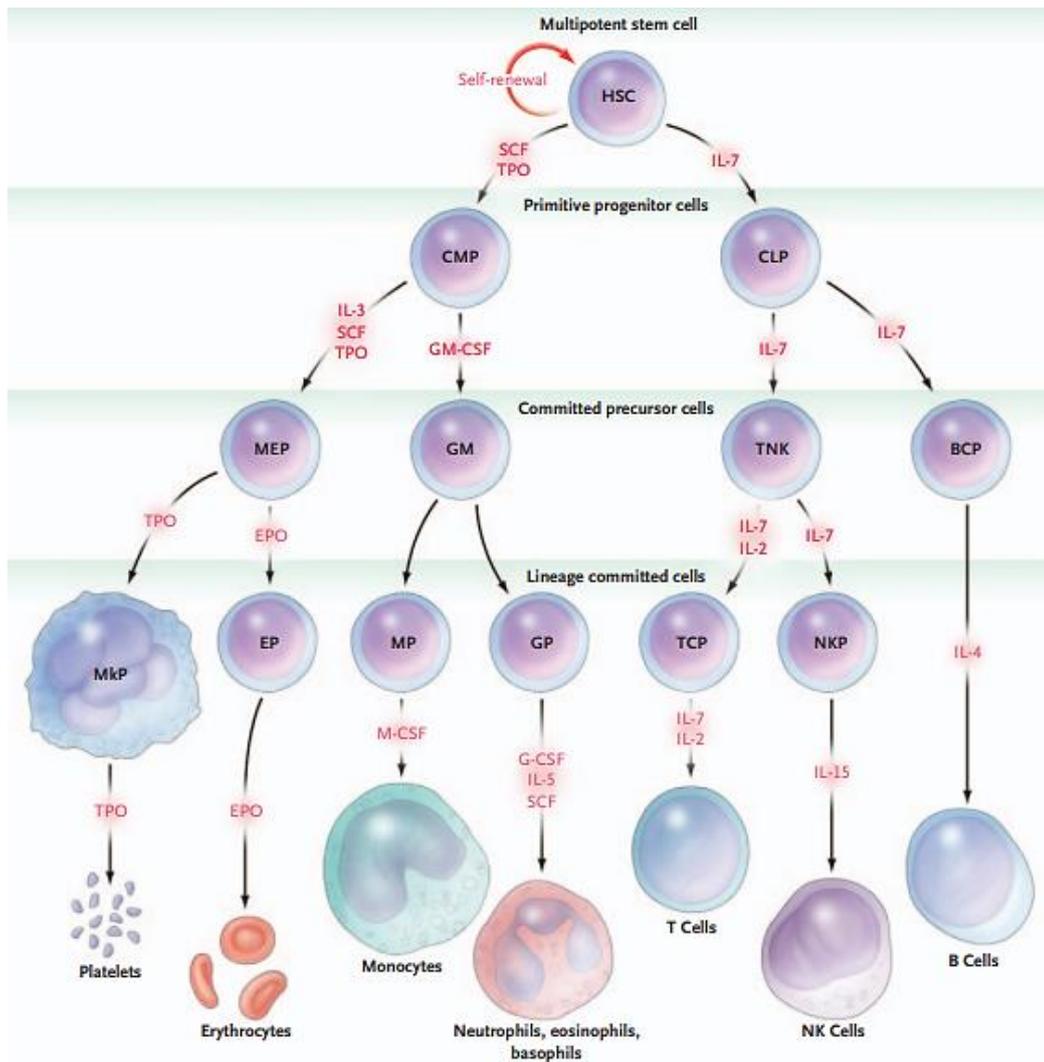


Figura 2 – Os fatores de crescimento na hematopoiese (Kaushansky, 2006).

2.2. Hemograma

No laboratório o hemograma é provavelmente a análise mais solicitada. É um conjunto de determinações simples que nos permite obter muita informação acerca do estado de saúde do utente. Permite também averiguar precocemente manifestações clínicas de algumas patologias, através de uma única colheita de sangue total (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Para a obtenção de sangue total, a colheita deve ser feita para um tubo com anticoagulante. Na determinação do hemograma, a amostra de sangue total é colhida para um tubo com EDTA (tubo de tampa lilás). O EDTA é um agente quelante, que “capta” e forma complexos com o cálcio da amostra, impedindo a cascata de coagulação, evitando assim o sangue de coagular. A quantidade de anticoagulante nos tubos é proporcional ao volume dos mesmos. Desta forma, tendo em conta que o anticoagulante é sempre um interferente da amostra, o volume de sangue colhido para o tubo deve ser respeitado, de forma a que a razão entre sangue e anticoagulante seja a mais adequada (Banfi, Salvagno e Lippi, 2007).

A colheita de sangue venoso é normalmente feita na veia cubital. De acordo com as recomendações da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), a ordem de colheita para os vários tubos é sempre a mesma, e independentemente de se usar um sistema de vácuo ou convencional, é a seguinte: Frasco de hemocultura; Tubo com anticoagulante citrato de sódio (tampa azul) para as provas de coagulação; Tubo sem anticoagulante e com gel separador que permite obter soro após centrifugação (tampa amarela) para as determinações bioquímicas; Tubo com anticoagulante heparinato de lítio (tampa verde) que permite obter sangue total ou plasma (após centrifugação); Tubo com anticoagulante EDTA (tampa lilás) para a obtenção de sangue total, sendo o mais usado no laboratório para as determinações hematológicas; Tubo com anticoagulante fluoreto de sódio (tampa cinzenta) (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017*).

O hemograma é útil na avaliação das três principais linhagens celulares do sangue, sendo o autoanalisador capaz de determinar a quantidade de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como as suas possíveis atipias e alterações, através dos seguintes parâmetros (*Moraleda Jiménez, 2017*):

Glóbulos vermelhos

Os valores de referência para a totalidade de glóbulos vermelhos circulantes variam consoante o sexo. Na mulher são de $4,8 \pm 1 \times 10^{12}/l$ e no homem $5,5 \pm 1 \times 10^{12}/l$. No entanto, para uma adequada valorização da existência de anemia ou policitemia, é necessário fazer a determinação da concentração de hemoglobina e do hematócrito (*Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015*).

Hemoglobina

A concentração de hemoglobina no sangue, varia entre 14 ± 2 g/dl na mulher e 16 ± 2 g/dl no homem. É somente este parâmetro que define uma anemia, ou seja, entende-se por anemia, a diminuição da concentração sanguínea de hemoglobina, independentemente do número de eritrócitos.

A poliglobulia, é caracterizada por um aumento dos eritrócitos circulantes e pelo aumento da concentração de hemoglobina (*Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015*).

A palidez da pele e das mucosas, a astenia, palpitações e a dispneia, são alguns dos sinais e sintomas gerais típicos, comuns às diferentes anemias (*Moraleda Jiménez, 2017*).

Hematócrito

Este parâmetro avalia a proporção de volume ocupado pelos glóbulos vermelhos, em relação ao volume total de sangue. Em valores normais corresponde a 47% no homem e a 42% na mulher. Esta percentagem depende não só do número total de eritrócitos circulantes, mas também da sua forma e tamanho. É um parâmetro atualmente em desuso, que aumenta nas situações de policitemia e em estados de desidratação (devido à diminuição do volume plasmático) e diminui nas anemias (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Volume Corpuscular Médio (VCM)

O volume corpuscular médio, é um índice eritrocitário que nos dá informação sobre o tamanho do glóbulo vermelho (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015), e que se calcula da seguinte forma:

$$\text{VCM} = (\text{Valor do hematócrito} \times 10) / \text{Número de eritrócitos} (\times 10^{12}/l)$$

Em valores normais, o VCM varia entre os 83 fentolitros e os 97 fentolitros (fl). É um índice útil, para a caracterização semiológica de uma anemia quanto ao tamanho do eritrócito (Tabela II). Se o VCM for inferior a 83 fl (eritrócitos de pequeno tamanho), diz-se que a anemia é microcítica (muito típico nas anemias por deficiência em ferro e nas hemoglobinopatias). Ao invés, se o VCM exceder os 97 fl (eritrócitos de grandes proporções), trata-se de uma anemia macrocítica, seja por deficiência de vitamina B₁₂ ou ácido fólico, resultante de hipotireoidismo, hepatopatias, alcoolismo ou síndromes mielodisplásicas. Quando o VCM está dentro dos valores de referência (eritrócitos com tamanho normal), estamos perante uma anemia normocítica (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). É importante notar que este valor pode ser falsamente afetado pela presença de aglutinados eritrocitários, pelo que a realização de um esfregaço de sangue periférico, possa vir a ser necessária.

Tabela II – Classificação de anemias segundo o volume corpuscular médio e algumas das suas causas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

	Anemias microcíticas (VCM < 83 fl)	Anemias normocíticas (VCM entre 83 fl e 97 fl)	Anemias macrocíticas (VCM > 97 fl)
Causas	Anemia por deficiência em ferro	Anemia das doenças crónicas	Anemia megaloblástica
	Anemia sideroblástica	Anemias hemolíticas	Síndromes mielodisplásicas
	Hemoglobinopatias	Anemia aplásica	Alcoolismo
	Esferocitose hereditária	Anemia por hemorragias agudas	Hepatopatias crónicas
	Anemia por intoxicação por chumbo		Hipotireoidismo

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Este parâmetro expressa o conteúdo médio de hemoglobina em cada glóbulo vermelho (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015), e calcula-se segundo a fórmula:

$$\text{HCM} = \text{Hemoglobina (g/dl)} / \text{Número de eritrócitos} (\times 10^{12}/\text{l})$$

Um valor normal de HCM ronda as 29 ± 2 pg. Dá-nos informação acerca da cor do eritrócito e dizem-se hipocrómicos quando a HCM está diminuída (muito típica na ferropenia) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina (CCMH)

Expressa a quantidade de hemoglobina relativamente ao tamanho do glóbulo vermelho (Moraleda Jiménez, 2017), determinando-se da seguinte maneira:

$$\text{CCMH} = (\text{Hemoglobina (g/dl)} \times 100) / \text{Hematócrito (\%)}$$

O valor normal de CCMH é de 34 ± 2 g/dl e consideram-se hipocrómicas as anemias com uma CCMH inferior a 32 g/dl (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Quando aumenta a hemoglobina corpuscular média (HCM), é na maioria das vezes devido ao aumento do volume corpuscular médio (VCM), pelo que a concentração corpuscular média de hemoglobina (CCMH), pode permanecer normal (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A CCMH aumenta na esferocitose hereditária, devido a um menor volume dos glóbulos vermelhos, e em algumas hemoglobinopatias (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Amplitude de Distribuição Eritrocitária ou Red Distribution Width (RDW)

O RDW é uma característica que os autoanalisadores nos proporcionam, em que avaliam a variação de tamanho dos eritrócitos. É por isso um índice de anisocitose quando o RDW excede o seu valor de referência ($13 \pm 2\%$) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos, sem núcleo, mas ainda com algumas mitocôndrias, ribossomas e retículo endoplasmático. O seu tamanho é superior ao de um eritrócito maduro e conserva uma ligeira policromatofilia. Os reticulócitos abandonam a medula óssea e terminam a sua maturação no sangue periférico, onde residem aproximadamente 24 horas. Em valores normais, o número de reticulócitos no sangue periférico varia entre 35.000 e 75.000/ μl . Embora a contagem de reticulócitos não faça parte

do hemograma convencional, esta informação pode ser preciosa para avaliar a evolução de uma determinada anemia, por exemplo, na anemia aplásica e na anemia por deficiência de vitamina B₁₂, a contagem de reticulócitos estará diminuída, enquanto na anemia hemolítica ou em hemorragias, este número encontrar-se-á aumentado, uma vez que se tratam, respetivamente, de anemias não regenerativas e regenerativas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Glóbulos brancos e fórmula leucocitária

Além da contagem total de leucócitos, por norma entre 6.000 e 10.000/ μ l, o hemograma oferece-nos a fórmula leucocitária, uma contagem relativa (em percentagem) e absoluta (em número/ μ l de sangue) de cada tipo distinto de leucócito, cujos valores normais estão apresentados na Tabela III (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Tabela III – Fórmula leucocitária em valores relativos e absolutos (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Tipo de leucócito	Valor relativo	Valor absoluto
Neutrófilos	55% a 65%	3.000/ μ l a 5.000/ μ l
Linfócitos	25% a 35%	1.500/ μ l a 4.000/ μ l
Monócitos	4% a 8%	100/ μ l a 500/ μ l
Eosinófilos	0,5% a 4%	20/ μ l a 350/ μ l
Basófilos	0,5% a 1%	10/ μ l a 100/ μ l

Plaquetas

O hemograma oferece-nos a contagem total de plaquetas, que em números normais, oscilam entre as 150.000 e as 350.000/ μ l. Estamos na presença de trombocitose, quando a contagem de plaquetas excede os valores de referência, e considera-se trombocitopenia quando este número se encontra abaixo dos valores normais (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A presença de agregados plaquetários, devido a uma colheita difícil ou a um processamento inadequado da amostra, pode contribuir falsamente para a diminuição da contagem total de plaquetas e para o aumento do PDW, visto que os autoanalisadores não têm a capacidade de fazer a distinção e a contagem celulares de forma correta. Deste modo, a observação do esfregaço de sangue periférico é fundamental, para avaliar se se trata de uma trombocitopenia verdadeira ou da presença de agregados plaquetários.

A vida média das plaquetas são normalmente 8 a 10 dias, no entanto, este período encontra-se diminuído em pacientes com trombocitopenias periféricas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A variação de tamanho entre plaquetas, através do PDW (Platelet Distribution Width), que é um possível indicador de anisocitose plaquetária quando aumentado, é outro parâmetro avaliado num hemograma.

2.3. Esfregaço de Sangue Periférico

A realização de um esfregaço de sangue periférico é um importante passo na valorização e compreensão do hemograma. A sua correta interpretação no laboratório pode ser fundamental para o médico chegar a um diagnóstico clínico ou na monitorização da doença hematológica.

Os hemogramas cujas determinações estejam dentro dos valores de referência (considerando idade e sexo do utente), são automaticamente validados pelo autoanalisador. Quando existem alterações nos parâmetros hematológicos, os hemogramas ficam retidos para serem validados manualmente. Nestas situações, temos de interpretar os resultados analíticos de acordo com a história clínica fornecida ao laboratório e executar a técnica do esfregaço de sangue periférico, quando se justificar, para se avaliarem microscopicamente as linhas celulares. O laboratório recebe também amostras provenientes de clínicas veterinárias. Nestes casos, a extensão sanguínea é sempre realizada e a fórmula leucocitária é feita manualmente.

Durante o meu período de estágio na secção de hematologia, tive a oportunidade de executar a técnica do esfregaço de sangue periférico. Em condições normais, as lâminas são preparadas da parte da tarde e são vistas na manhã seguinte. No caso de haver uma urgência, o hemograma e a observação microscópica da amostra são feitos o mais rapidamente possível.

A técnica pode ser executada com lâmina e lamela ou com duas lâminas (Figura 3). Todas as extensões de sangue que tive a oportunidade de fazer, foram com recurso a duas lâminas. Esta técnica simples e rápida de obter uma extensão de sangue periférico, consiste em colocar uma gota de sangue da nossa amostra (cerca de 2 mm a 3 mm), com recurso a uma pipeta pasteur estéril, numa das extremidades na lâmina. Com a outra lâmina, num ângulo entre 30° a 45°, tocamos na gota de sangue e recuamos ligeiramente de maneira a que o sangue se espalhe totalmente pela largura da lâmina. Depois, deslizamos a lâmina de forma gentil mas determinada, de maneira a obter uma extensão de sangue com uma franja no último terço da lâmina, onde teremos as células isoladas e onde iremos analisar microscopicamente a nossa amostra (Keohane, Otto e Walenga, 2019).

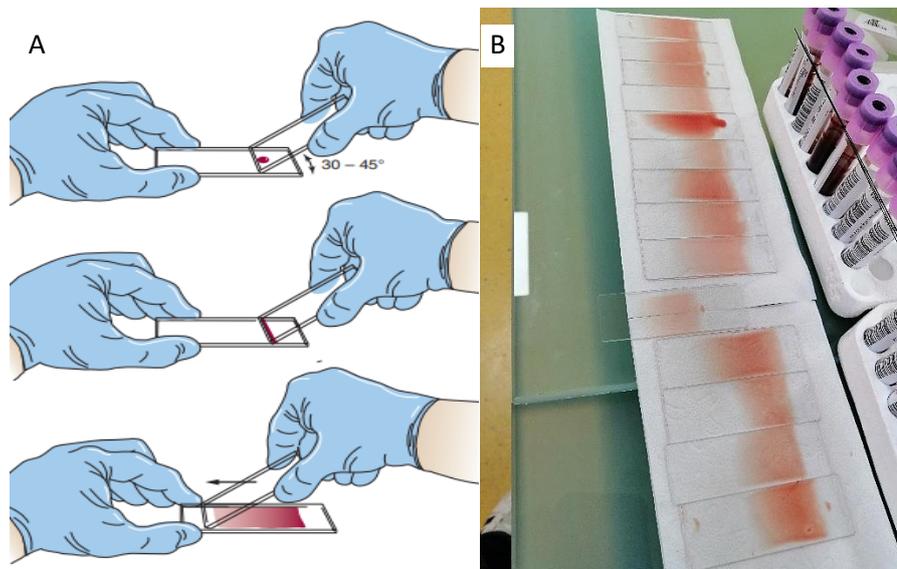


Figura 3 – A: Representação esquemática da técnica de esfregaço de sangue periférico (Keohane, Otto e Walenga, 2019); B: Extensões de sangue periférico executadas pela técnica descrita acima.

A coloração das lâminas é executada manualmente pela coloração de Wright modificada. Após fixação das lâminas em metanol, a técnica consiste em mergulhar as lâminas em dois corantes, primeiramente em eosina, um corante ácido que cora por afinidade a hemoglobina e as granulações eosinofílicas e de seguida em azul-de-metileno, que tem afinidade para componentes ácidos como o DNA presente no núcleo das células e as granulações dos neutrófilos. No final, o excesso de tinta é retirada com água destilada (Keohane, Otto e Walenga, 2019; Woronzoff-Dashkoff, 2002).

2.4. Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação globular, enquadra-se nos marcadores de inflamação e infeção. É dos marcadores de inflamação mais usados na prática clínica, e embora não sendo específica de nenhuma patologia, a determinação da VS proporciona informação útil no auxílio ao diagnóstico, no prognóstico e na monitorização das doenças inflamatórias. Modifica-se quando existe um desequilíbrio humoral que afeta as proteínas plasmáticas, acelerando quando aumenta a proporção de fibrinogénio, formando *rouleaux*, ou a proporção de globulinas. A elevação da VS é assim indicativa de um aumento dos biomarcadores de fase aguda, como por exemplo, o fibrinogénio e as gamaglobulinas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Valores normais de velocidade de sedimentação, variam entre 3 mm/h e 10 mm/h.

A VS é uma prova simples e fácil de executar, que representa uma medida indireta dos biomarcadores de fase aguda, e cujo método se baseia na observação da velocidade de descida dos eritrócitos, numa amostra de sangue total, colhida em tubo com citrato de sódio, e colocada numa coluna vertical durante 1 e 2 horas. Tal como referido acima, o ritmo de

descida dos glóbulos vermelhos, tem relação direta com os níveis de fibrinogênio e gamaglobulinas. No entanto, o grau de anemia, a forma e o tamanho do eritrócito, influenciam igualmente a velocidade de sedimentação (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

2.5. Determinação de grupos sanguíneos

No laboratório, faz-se uso da técnica em gel para a determinação dos grupos sanguíneos, dos sistemas AB0 e Rhésus (Rh), utilizando os cartões DG Gel Confirm (Figura 4).

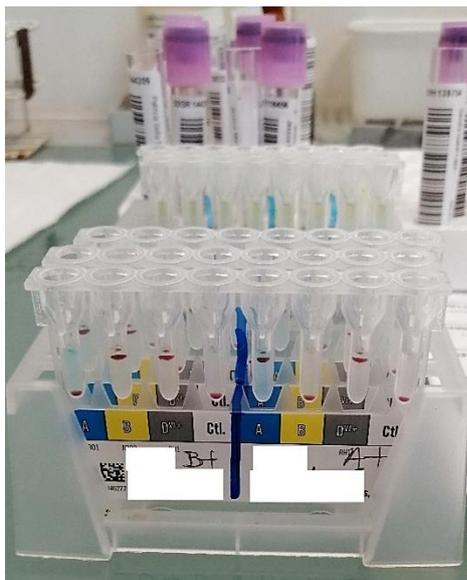


Figura 4 – Determinação de grupos sanguíneos utilizando os cartões DG Gel Confirm.

Tendo sido descoberto por Landsteiner em 1900, o sistema AB0 (Tabela IV), foi o primeiro sistema de grupos sanguíneos humanos a ser descrito, e continua a ser importante em medicina transfusional, nos dias de hoje. Este sistema é definido pela presença ou ausência dos antígenos A e/ou dos antígenos B, assim como pela presença de anticorpos correspondentes aos antígenos em falta nos eritrócitos. Ou seja, um indivíduo cujo grupo sanguíneo é AB, apresenta nas suas hemácias os antígenos A e os antígenos B, logo não terá quaisquer anticorpos no plasma. Pelo contrário, uma pessoa com o grupo sanguíneo 0, não apresenta nenhum antígeno eritrocitário, pelo que terá anticorpos anti-A e anticorpos anti-B em circulação (Dean, 2005). A determinação do sistema Rh é definida pela presença ou ausência do antígeno D (RH1), nos glóbulos vermelhos (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A técnica de gel, descrita por Yves Lapierre, em 1985, consiste em reações de aglutinação eritrocitária. Os cartões DG Gel Confirm são compostos por oito microtubos, sendo que cada microtubo corresponde a uma coluna de reação, e cada cartão vem preparado para determinar 2 amostras de pessoas diferentes em simultâneo. Todos os microtubos foram

previamente inoculados com uma solução de gel tamponada, contendo anticorpos monoclonais específicos anti-A, anti-B e anti-D.

Ocorre aglutinação quando os antígenos eritrocitários reagem com os respectivos anticorpos, presentes na solução gel, formando complexos antígeno-anticorpo. Após centrifugação, a coluna de gel separa os eritrócitos aglutinados dos não aglutinados com base no tamanho, sendo que quando há aglutinação, os eritrócitos aglutinados ficam retidos no topo ou ao longo da coluna de gel e os não aglutinados depositam no fundo do microtubo, formando sedimentação celular.

Tabela IV – Grupos sanguíneos segundo o sistema ABO (Hosoi, 2008).

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo 0
Tipo de hemácia	A	B	AB	0
Antígenos presentes nos eritrócitos	Antígenos A	Antígenos B	Antígenos A e Antígenos B	Ausência de antígenos eritrocitários
Anticorpos presentes no plasma	Anti-B	Anti-A	Ausência de anticorpos contra antígenos eritrocitários	Anti-A e Anti-B

2.6. Teste de Coombs

As provas de Coombs, têm o objetivo de detectar a existência de anticorpos contra algum antígeno eritrocitário, mediante a adição do soro de Coombs (antiglobulina humana – IgG).

No teste de Coombs direto (Figura 5), detetam-se os anticorpos unidos aos eritrócitos do paciente, como tal, usa-se uma amostra de sangue total do indivíduo (sensibilização no próprio organismo). É positivo (ocorrência de aglutinação) nas anemias hemolíticas autoimunes e induzidas por fármacos e na doença hemolítica do recém-nascido (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Segel e Lichtman, 2014; Zarandona e Yazer, 2006).

O teste de Coombs indireto (Figura 5), deteta anticorpos livres no soro do paciente. Provoca-se a sensibilização de eritrócitos normais *in vitro*, e adiciona-se posteriormente o soro de Coombs, para observar a formação, ou não, de aglutinação. Estes anticorpos podem surgir como consequência de uma transfusão de sangue não compatível, ou quando há contacto sanguíneo, durante a gestação ou no parto, entre uma mãe Rh⁻ e um(a) filho(a) Rh⁺ (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Zarandona e Yazer, 2006).

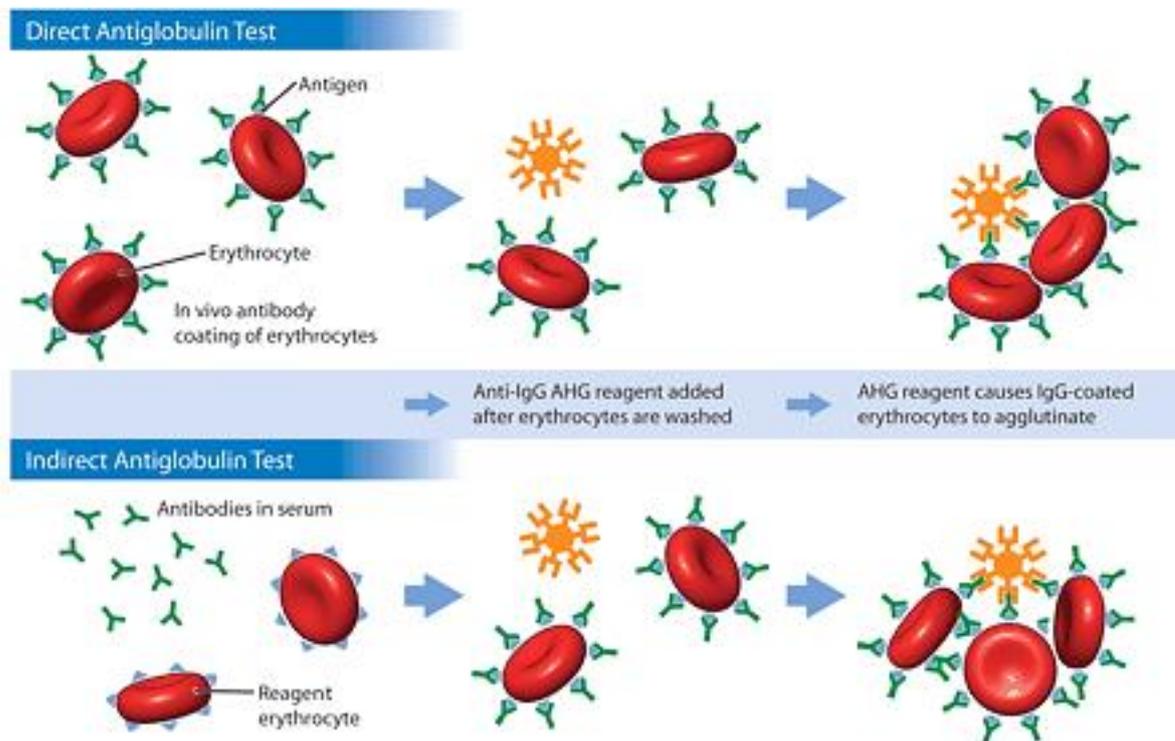


Figura 5 – Teste de Coombs direto e indireto (Zarandona e Yazer, 2006).

2.7. Estudo da Hemóstase

A hemostasia tem o objetivo de manter a integridade vascular, evitando uma perda de sangue excessiva, quando ocorre uma lesão. O sistema hemostático compreende quatro fases que se dão de forma simultânea *in vivo* (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015):

- Vasoconstrição da zona lesionada;
- Adesão e agregação plaquetária;
- Formação de fibrinogénio, para reforçar o trombo plaquetário;
- Fibrinólise, quando reparada a lesão vascular.

A avaliação da hemóstase assenta em provas de coagulação, para as quais a amostra de eleição é o plasma, obtido após centrifugação de um tubo com citrato de sódio.

Tempo de protrombina

É o tempo de coagulação do plasma, após a adição em excesso, de tromboplastina (com fator tissular) e cálcio. Serve para avaliar a via comum e a via extrínseca da coagulação. Esta determinação tanto pode ser expressa em segundos, como em percentagem (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

É uma prova útil na monitorização de terapêuticas com anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K, como a Varfarina e o Acenocumarol, em que se calcula uma razão

internacional normalizada, ou INR, dependendo do tipo de tromboplastina usada (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Nos casos de deficiência congénita ou adquirida dos fatores V, VII e X, bem como de protrombina ou de fibrinogénio, devido a défice de vitamina K, comprometimento da função hepática ou uso incorreto de anticoagulantes orais, o tempo de protrombina encontrar-se-á prolongado (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). Determina-se no laboratório pelo método de coagulometria.

Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

É o tempo de coagulação do plasma, quando em contacto com cálcio e fosfolípidos. A adição de Cefalina[®] (fosfolípidos), de cálcio e de caolino (um ativador do sistema de contacto), vai induzir a formação de fibrina. Avalia então a via intrínseca e comum, mede a atividade global de todos os fatores de coagulação, com exceção do VII e do XIII. Usa-se para monitorizar terapias anticoagulantes com heparina não fracionada (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Tempo de trombina

O tempo de trombina é a duração de tempo até à formação do coágulo, após a adição de trombina ao plasma da amostra. Esta análise tem utilidade na valorização do passo final da cascata de coagulação, a formação de fibrina (Figura 6). O tempo de trombina encontra-se prolongado nas seguintes situações (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015):

- Hipofibrinogénemia ou disfibrinogénemia;
- Hiperfibrinólise;
- Presença de inibidores com ação antitrombina (heparina).

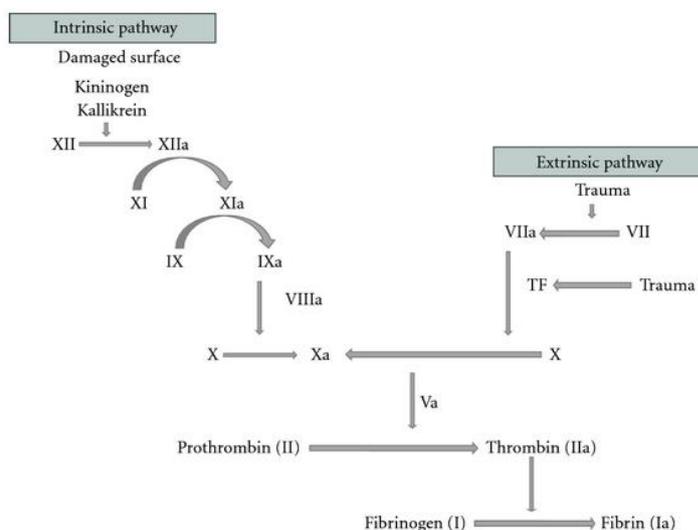


Figura 6 – A cascata da coagulação (Perez-Pujol, Aras e Escolar, 2012).

Fibrinogénio

No laboratório, esta análise determinava-se semanalmente, usualmente às quartas-feiras devido ao baixo número de requisições. Desta forma, se não ocorresse o caso de nenhuma urgência, a amostra chegava ao laboratório, era triada e imediatamente congelada, até à quarta-feira seguinte.

Os valores normais de fibrinogénio plasmático, oscilam entre 150 e 350 mg/dl. Encontra-se aumentado em processos inflamatórios e comporta-se como um biomarcador de fase aguda. Tem também um papel importante como marcador de risco vascular (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A diminuição dos seus valores, é sugestivo de uma hipofibrinogenémia, congénita ou adquirida, ou de uma disfibrinogenémia (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

D-Dímeros

Os monómeros de fibrina, ou D-Dímeros, são um produto resultante da degradação de fibrina (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). Quantificam-se no laboratório, pelo auxílio de um método imunoturbidimétrico mediante partículas de látex.

Recentemente tem havido um interesse crescente no uso dos D-Dímeros como biomarcadores da hipercoagulabilidade. Apresentam um elevado valor preditivo negativo, no auxílio ao diagnóstico do tromboembolismo venoso (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

3. Bioquímica Clínica

A secção da bioquímica no laboratório é a mais automatizada. Através de uma única colheita de sangue para tubo sem anticoagulante, obtém-se o soro, a amostra de eleição para inúmeras determinações analíticas. Para a obtenção do soro, centrifuga-se a amostra de sangue a 4000 rotações por minuto (RPM), durante 15 minutos.

3.1. Metabolismo dos hidratos de carbono

Glucose

Em jejum, as concentrações normais de glicose, oscilam entre 80-110 mg/dl. É um açúcar simples, constituído por 6 átomos de carbono, que proporciona a maior parte da energia ao nosso organismo (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Para uma correta determinação da glicose, por método colorimétrico, é necessário um jejum de 8h a 12h antes da colheita da amostra. O soro pode ficar armazenado durante 24h, a uma temperatura de 2-8°C.

Diabetes mellitus

Segundo os critérios de 2006 da Organização Mundial de Saúde (OMS), a diabetes *mellitus* é um distúrbio metabólico, de etiologia variada, que se caracteriza por um defeito na síntese de insulina ou na resistência à insulina. Podemos classificar a doença segundo os diferentes tipos (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015):

- *Diabetes mellitus tipo I*: Existe uma deficiência total na secreção de insulina nas células β pancreáticas dos ilhéus de Langerhans e é normalmente de cariz autoimune. É uma situação que pode estar acompanhada de cetoacidose.
- *Diabetes mellitus tipo II*: É o tipo de diabetes mais comum. Caracteriza-se pelo aparecimento da resistência à insulina, que pode ou não, ser acompanhada pela diminuição da sua secreção. A obesidade, o sedentarismo e as dislipidemias, são fatores de risco, a este tipo de diabetes, que normalmente surge na idade adulta mais avançada.
- *Diabetes gestacional*: É um importante fator preditor de diabetes *mellitus*, em que cerca de 60% das mulheres que apresentam diabetes gestacional, desenvolvem diabetes *mellitus* durante os próximos 15 anos.

Diagnóstico de diabetes

Para um diagnóstico de diabetes, devem existir sintomas (poliúria, polifagia e polidipsia), associados a pelo menos um dos seguintes achados laboratoriais (Alberti e Zimmet, 1998):

- Valor obtido, por repetição na mesma amostra, de glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl;
- Glicémia ao acaso ≥ 200 mg/dl;
- Glicémia ≥ 200 mg/dl, 2h após a prova de tolerância oral à glucose (PTOG), usando 75 g de glucose;
- Valor de HbA_{1c} $\geq 6,5\%$.

Para a diabetes gestacional, faz-se a medição da glicémia basal e 1h após a ingestão oral de 50 g de glucose. Na eventualidade de um resultado positivo, leva-se a cabo a prova com a ingestão adicional de 100 g de glucose oral e mede-se a glicémia basal, 1, 2 e 3h após (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Segundo as boas práticas de laboratório, todas estas determinações analíticas referentes ao diagnóstico da diabetes, devem ser sempre confirmadas por repetição na mesma amostra.

Hemoglobina Glicada A_{1C} (HbA_{1C})

A glicose tem a capacidade de ser ligar irreversivelmente à hemoglobina durante o tempo de semivida do eritrócito (cerca de 120 dias). Entre 2% e 4% do total da hemoglobina encontra-se glicada, e cerca de 4% e 6% desta hemoglobina glicada, é HbA_{1C}. Desta forma, a concentração de HbA_{1C} é proporcional à concentração plasmática média de glicose, o que nos indica, indiretamente, os níveis de glicémia média nas últimas 4 a 8 semanas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Valores normais de hemoglobina glicada oscilam entre os 4% e os 6,4%, sendo que a sua principal utilidade é a de contribuir para a monitorização da glicémia no paciente diabético e como preditor de complicações (> 12%) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Para o diagnóstico de diabetes mellitus, basta obter uma determinação de HbA_{1C} que seja igual ou superior a 6,5% (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Para uma correta valorização dos resultados, devemos ter em conta que a concentração de HbA_{1C} pode aumentar nas seguintes circunstâncias:

- Presença de HbF em quantidades elevadas;
- Insuficiência renal crónica com ou sem hemodiálise;
- Anemias ferropénicas e por défice de vitamina B₁₂ e/ou ácido fólico;
- Esplenectomia;
- Alcoolismo;
- Intoxicação por chumbo e opiáceos;
- Tratamento com salicilatos em doses elevadas.

E pode diminuir nas seguintes situações:

- Presença de HbS, HbC e HbD;
- Anemia hemolítica, perda de sangue aguda ou crónica e tratamento com eritropoietina;
- Gravidez;
- Ingestão de grandes quantidades de vitaminas C e E.

Para a determinação da HbA_{1C}, no G8 HbA_{1C} Analyzer, o método utilizado é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), que pela diferença de cargas, separa a HbA_{1C} que nos interessa quantificar, de outras frações da hemoglobina (Burtis e Bruns, 2016).

3.2. Biomarcadores da função pancreática

O pâncreas é uma glândula mista, caracterizado pela sua função endócrina e exócrina. Na porção endócrina do pâncreas, há secreção das hormonas insulina, glucagina e somatostatina (Merino, 2004). A porção exócrina, é responsável pela secreção do suco pancreático, que tem um papel ativo e fundamental na digestão de proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Bertolini, 2017).

A pancreatite aguda, a pancreatite crónica, tumores e síndromes de mal absorção ou mal digestão, podem resultar num comprometimento da função exócrina do pâncreas (Bertolini, 2017).

A pancreatite crónica, é uma lesão do pâncreas caracterizada por estadios de inflamação e fibrose. A fibrose pancreática, e consequente morte celular, leva a uma insuficiência total do pâncreas, estando comprometidas as funções endócrina e/ou exócrina (Braganza *et al.*, 2011).

Na pancreatite aguda, há uma inflamação aguda do pâncreas, normalmente autolimitada, mas potencialmente fatal (Whitcomb, 2006).

Amílase

Por si só, esta enzima não é um biomarcador muito específico da função pancreática, uma vez que a sua origem é muito heterogénea. Além do pâncreas, é originada nas glândulas salivares, e em menor medida nas trompas de Falópio, no músculo-esquelético, no intestino, nos pulmões e no tecido adiposo. O seu valor sérico normal, varia entre 35-115 U/l (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Embora não sendo habitual no laboratório, é também possível fazer o doseamento da amílase pancreática e salivar, nomeadamente das isoenzimas P e S, respetivamente.

A principal utilidade clínica da amílase é no auxílio ao diagnóstico e na monitorização da pancreatite aguda, embora possa estar também elevada em outros processos. Ainda assim, em cerca de 10% dos casos de pancreatite, os níveis da amílase não se elevam. Nestes casos, é útil a determinação da lipase (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). A amostra de soro, para o doseamento da amílase e das suas isoenzimas, tem estabilidade durante uma semana se armazenada entre 2°C a 8°C.

Lípase

É uma enzima produzida no pâncreas, no estômago, no intestino e nos pulmões, cujos valores de referência se compreendem entre 3 U/l e 19 U/l (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

De uma forma geral, a lípase é mais sensível a processos de inflamação pancreática que a amilase (Uc e Fishman, 2017). Nas situações de pancreatite aguda, o doseamento da lípase é mais específico em relação à amilase. Na pancreatite crônica, o aumento da lípase é mais constante que o da amilase. Encontra-se também elevada nos carcinomas esofágico, do ovário e pulmonar, bem como na cetoacidose diabética (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Uma elevação simultânea da amilase e da lípase apoia a hipótese, de transtornos a nível pancreático (Uc e Fishman, 2017).

Tal como na determinação da amilase, a amostra de soro para a quantificação da lípase, tem estabilidade durante uma semana, se refrigerada entre 2-8°C.

3.3. Biomarcadores de avaliação hepática

O fígado é a maior glândula do organismo e um dos órgãos mais importantes com diversas funções fisiológicas, nomeadamente a síntese de biliar, a síntese de lípidos e lipoproteínas, a síntese e o metabolismo das proteínas, o metabolismo dos hidratos de carbono e a manutenção da homeostase da glucose, a biotransformação de xenobióticos e o metabolismo e excreção de bilirrubina e sais biliares (Ozougwu e Ozougwu, 2017; Sakka, 2007).

Os biomarcadores de avaliação hepática são:

- Aspartato aminotransferase (AST);
- Alanina aminotransferase (ALT);
- Bilirrubina;
- Fosfatase alcalina;
- Gamaglutamil transpeptidase (γ GT);
- Albumina;
- Tempo de protrombina.

As transaminases (AST e ALT), estão mais associadas ao dano e morte do hepatócito. São enzimas que estão presentes no citosol da célula hepática e que se libertam para a corrente sanguínea em situações de lesão celular. São biomarcadores de lesão hepatocelular sensíveis,

mas não específicas, apresentando diferentes etiologias. No entanto, a ALT é mais específica do fígado, que a AST, e é uma enzima exclusivamente citoplasmática, ao contrário da AST, que apresenta duas isoenzimas, uma citoplasmática e outra mitocondrial. Os valores normais das aminotransferases, oscilam entre 9 U/l e 35 U/l, sendo que a razão AST/ALT, é normalmente 1,3. Desta forma, os índices de ALT tendem a ser superiores aos da AST na generalidade das situações de lesão hepática. Exceção na doença hepática alcoólica, em que os níveis séricos de AST, são duas ou três vezes superiores aos da ALT (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Sakka, 2007).

A bilirrubina, é o biomarcador que faz o diagnóstico à icterícia. Nos casos de hiperbilirrubinémia, considera-se um indivíduo icterico, quando a concentração de bilirrubina sérica excede as 2,5 mg/dl. De facto, a hiperbilirrubinémia pode ser considerada um marcador de colestase, no entanto, um aumento de bilirrubina no sangue, pode ser devida a vários fatores, desde causas fisiológicas a causas secundárias de alguma condição clínica. Não apresenta uma relação muito direta com a severidade da lesão colestática (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Sakka, 2007).

A fosfatase alcalina é uma enzima que tem várias origens (fígado, rim, placenta, intestino, ossos e glóbulos brancos). Está presente nos ductos biliares, logo, um aumento da sua síntese, é sugestivo de uma lesão ductal. Assim, a fosfatase alcalina é um biomarcador de colestase hepática. Os valores de referência para a idade adulta são entre 45 U/l e 115 U/l. Níveis de fosfatase alcalina estão mais elevados na infância e na adolescência (devido ao aumento da atividade osteoblástica), e na gravidez (pelo aumento da enzima na placenta). É possível determinar a origem da fosfatase alcalina, recorrendo à eletroforese das suas isoenzimas (hepática, óssea e intestinal). No entanto, na prática clínica, e na suspeita de uma origem hepática da fosfatase alcalina, o doseamento da γ GT pode ser suficiente para confirmar a elevação dos seus níveis séricos devido à causa hepática (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Sakka, 2007).

A γ GT é uma enzima presente no fígado (ductos biliares e hepatócito), no pâncreas, no baço e nos pulmões. É simultaneamente um biomarcador de dano colestático (pois acompanha os aumentos dos níveis de fosfatase alcalina), e um biomarcador de lesão hepatocelular (pois aumenta com a elevação da ALT e da AST). O seu aumento, é também muito característico no consumo excessivo de álcool, e pode ser também devida a fármacos. Os valores séricos normais de γ GT, são mais elevados no homem (≤ 40 U/l), que na mulher (≤ 28 U/l) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Sakka, 2007).

Para avaliar a função de síntese hepática, podemos recorrer ao doseamento da albumina e à avaliação do tempo de protrombina. O principal produto da síntese proteica hepática é a albumina, sendo a hipoalbuminémia, uma condição sugestiva, de um comprometimento da síntese hepática. Apresenta-se na insuficiência hepática aguda e, principalmente, na doença crónica avançada. Os seus valores normais, oscilam entre 3,2 g/dl e 5,2 g/dl. As doenças hepáticas, caracterizam-se por um aumento do tempo de protrombina (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015; Sakka, 2007).

3.4. Biomarcadores da função renal

Os rins são órgãos fundamentais na excreção e na regulação osmótica. Filtram metabolitos de excreção no sangue, que serão eliminados pela urina (Finco, 1997). Além destas, os rins desempenham muitas outras funções, como na:

- Manutenção do equilíbrio hidro-electrolítico, através da regulação do sódio, cloro, potássio, magnésio, cálcio e fosfato (Finco, 1997);
- Manutenção do equilíbrio ácido-base, através da regulação do hidrogénio e do bicarbonato (Finco, 1997);
- Excreção de fármacos e xenobióticos (Finco, 1997);
- Síntese e libertação de eritropoietina (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015);
- Produção de calcitriol, cuja principal função, é a de estimular o aumento da absorção de cálcio no intestino (Teng *et al.*, 2003);
- Produção de urina e excreção de ureia e creatinina (Finco, 1997).

A ureia, a creatinina e a taxa de filtração glomerular (TFG), são biomarcadores da função renal (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Ureia

A ureia resulta do catabolismo das proteínas. Os seus valores de referência, variam entre 12 mg/dl e 54 mg/dl (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A ureia é filtrada no glomérulo renal, e juntamente com a água, é reabsorvida ou secretada. Na desidratação, há uma menor perfusão renal, e conseqüentemente, diminuição da água filtrada, o que aumenta a reabsorção de ureia. À medida que se filtra maior quantidade de água, mais ureia é excretada. A urémia é um indicador de diálise, quando os seus valores excedem as 200 mg/dl (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Creatinina

A creatinina é o produto resultante do catabolismo muscular. No homem varia entre 0,8 mg/dl e 1,3 mg/dl, e na mulher os valores normais oscilam entre 0,6 mg/dl e 1,1 mg/dl. Até à idade adulta, os valores normais de creatinina variam consoante a idade e o sexo (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Elimina-se quase exclusivamente pelos rins, sendo um biomarcador da função renal mais sensível e específico que a ureia, pois o seu valor é menos variável com a dieta e não se modifica com o exercício físico, nem com alterações no metabolismo proteico (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Na generalidade das alterações da função renal, a creatinina eleva-se nas mesmas condições que os níveis de ureia. No entanto, na insuficiência pré-renal, o aumento da creatinina é menos acentuado que o da ureia, e na insuficiência pós-renal, os aumentos de ureia e creatinina são paralelos. Nas doenças musculares degenerativas e em situações de rabdomiólise, a creatinina plasmática estará elevada (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Os níveis de creatinina diminuem quando há perda de massa muscular e na gravidez, sendo o valor normal neste estado de saúde de 0,4 mg/dl a 0,6 mg/dl (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Depuração de creatinina e filtração glomerular

A depuração de creatinina é uma estimativa da filtração glomerular (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). É uma análise que requer uma amostra de soro e uma amostra de urina de 24h. Esta determinação reflete a capacidade do rim em eliminar uma substância presente no sangue por unidade de tempo. Geralmente, a creatinina é a substância de eleição para se avaliar a filtração glomerular, devido ao seu baixo custo e simplicidade de quantificação (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). Assim, é possível determinar a depuração da creatinina, da seguinte forma:

$$\text{Depuração da creatinina (ml/min)} = \frac{([\text{Creatinina na urina}] \times \text{Volume de urina nas 24h})}{([\text{Creatinina plasmática}] \times 24 \times 60)}$$

Esta determinação é útil no auxílio ao diagnóstico da insuficiência renal crónica, na sua monitorização, na prevenção de complicações e em ajustes farmacológicos. O seu valor varia com a idade, o sexo e a massa corporal da pessoa. Num adulto saudável, esta taxa ronda os 140 ml/min/1,73m². Valores abaixo de 60 ml/min/1,73m², sugerem a necessidade de

intervenção clínica, e níveis abaixo de $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$, são indicativos de falência renal e necessidade de diálise (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

3.5. Ionograma

É usado para avaliar o nível de eletrólitos no sangue. Fazem parte os doseamentos dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- . É importante ter em conta, que pequenas variações nas concentrações iônicas, podem traduzir-se em situações de elevado significado clínico.

Sódio

Valores normais de sódio plasmático, variam entre 135 mmol/l e 145 mmol/l . O sódio contribui para a regulação do volume extracelular, e é o principal fator que influencia a osmolalidade (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A hiponatremia define-se como uma concentração de sódio menor que 135 mmol/l . Adquire significado clínico para valores abaixo de 130 mmol/l , e considera-se um valor crítico, quando a concentração de sódio plasmático é inferior a 120 mmol/l . Na hiponatremia verdadeira, acontece uma diminuição da concentração plasmática do sódio, acompanhada pela diminuição da osmolalidade. Pode dever-se a uma perda de sódio, superior à da água, a um excesso de água sem edema associado, ou a um volume extracelular aumentado, com edema associado (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Considera-se hipernatremia, quando a concentração de sódio plasmático, é superior a 145 mmol/l . Representa um valor crítico, uma determinação acima de 160 mmol/l . Pode ser devida a uma perda de água superior à de sódio, com diminuição do volume extracelular, ou muito menos frequentemente, pelo excesso de sódio plasmático (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Potássio

O potássio intervém nos mecanismos de excitação muscular. A hipocaliémia e hipercaliémia, podem traduzir-se num comprometimento da função cardíaca e neuromuscular. Os valores de referência, para a concentração de potássio no sangue, são entre $3,5 \text{ mmol/l}$ e 5 mmol/l (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Considera-se hipercaliémia, determinações de potássio acima de 5 mmol/l , e é crítica, quando o seu doseamento, excede as 6 mmol/l . Esta é uma alteração eletrolítica grave, pois pode gerar arritmias ventriculares de forma rápida e potencialmente fatais. O potássio, é o catião intracelular mais prevalente. Os seus níveis séricos podem ser falsamente aumentados no caso de ocorrer hemólise *in vitro*. Esta é a causa mais frequente e pode ser devida a uma

colheita difícil, ou à própria fragilidade da membrana do eritrócito. Após centrifugação, é possível observar a amostra hemolisada (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A hipocaliémia define-se como uma concentração de potássio inferior a 3,5 mmol/l, e é considerada crítica, quando a sua determinação é abaixo de 2,5 mmol/l. Pode dever-se a um aumento nas perdas de potássio e a défices no seu aporte ou absorção (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Cloro

Os valores de referência para o ião cloro são normalmente de 96 mmol/l a 109 mmol/l. Por norma as alterações do cloro acompanham as do sódio. A hiperclorémia é menos frequente que a hipoclorémia, devendo-se na maioria das vezes a um consumo excessivo de sal (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

3.6. Biomarcadores de lesão cardíaca e muscular

Creatina cinase

A creatina cinase (CK), é uma enzima presente no músculo-esquelético, no músculo cardíaco, e no cérebro. A CK é um dímero, composta pelas subunidades M (*muscle*) e B (*brain*), cuja combinação dá origem a três isoenzimas (Tabela V) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Tabela V – Isoenzimas da creatina cinase (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Isoenzima	Comentários
CK-BB (CK1)	Predomina no tecido cerebral e representa 90% do total de creatina cinase.
CK-MB (CK2)	Predomina no músculo cardíaco, onde representa 40% a 50% do total de creatina cinase neste tecido. No músculo-esquelético, a sua proporção é muito menor.
CK-MM (CK3)	Representa cerca de 96% do total de creatina cinase no músculo-esquelético.

Os valores de referência para a creatina cinase oscilam entre 45 U/l a 135 U/l na mulher e entre 55 U/l a 170 U/l no homem (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

O aumento da CK está associado a necrose, inflamação, ou atrofia do músculo-esquelético, onde a isoenzima CK-MB, é normalmente inferior a 6% do total de creatina cinase. No enfarte agudo do miocárdio (EAM), produz-se a elevação da CK total, 6h após o início do evento. Tendo um pico máximo às 18h após o início do enfarte e volta à sua normalidade em 3 dias. No auxílio ao diagnóstico, e na avaliação do risco de EAM, a determinação da CK-MB pode ser útil. Caracteristicamente, nestas situações, a percentagem de CK-MB, corresponde a mais de 6% do total de creatina cinase. Em termos absolutos, os valores normais de CK-MB,

são inferiores a 6 µg/l. Os níveis de CK, podem também aumentar com o consumo de xenobióticos, e no acidente vascular cerebral extenso (Norris *et al.*, 1979; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A diminuição de creatina cinase está associada a perdas significativas de massa muscular, e a processos reumáticos, como por exemplo, na artrite reumatoide (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Troponinas

As troponinas, são proteínas presentes nas fibras musculares do miocárdio. A troponina T e a troponina I são os biomarcadores de eleição no diagnóstico ao EAM, devido à sua elevada sensibilidade e cardiospecificidade. Num indivíduo saudável, os níveis séricos de troponinas cardíacas são muito baixos ou indetectáveis, com valores de referência de 10 ng/l na troponina T, e de 40 ng/l para a troponina I. Ainda assim, a troponina T é ligeiramente menos específica que a troponina I, na lesão do miocárdio (Hamm *et al.*, 1997; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

No fundo, aumentos nas troponinas cardíacas, associam-se a uma maior incidência na lesão do miocárdio, o que lhes confere, para além da utilidade como biomarcadores de lesão, a vantagem de serem úteis como biomarcadores de previsão (Hamm *et al.*, 1997; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína de pequeno tamanho, presente no músculo-esquelético e no músculo cardíaco. No soro, o seu valor de referência é abaixo de 90 ng/ml. Eleva-se nas situações de lesão muscular, de forma similar à creatina cinase. Pode estar também aumentada em regime pós-operatório, e após injeções intramusculares (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

É um biomarcador pouco específico. No entanto, adquire interesse clínico devido à sua rápida libertação na lesão do miocárdio. A sua elevação é possível de detetar 2h após o início da necrose do tecido cardíaco (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

3.7. Proteinograma

As proteínas plasmáticas, adquirem interesse clínico e extrema relevância, devido às suas diversas e importantes funções:

- Manter a pressão oncótica do plasma;

- Regular o equilíbrio ácido-base, funcionando como sistema tampão;
- Transportam substâncias endógenas e fármacos;
- Algumas proteínas são biomarcadores de fase aguda, e outras, participam na defesa humoral contra processos infecciosos.

O doseamento das proteínas totais no soro, em valores normais, varia entre 6,3 g/dl e 8 g/dl (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Além da concentração de proteínas totais, é fundamental a análise do proteinograma, para se conhecer a concentração de cada uma das frações constituintes, através da eletroforese do soro, em acetato de celulose.

A Tabela VI e a Figura 7 representam, respectivamente, os valores normais absolutos e em percentagem das diferentes frações do proteinograma, bem como o perfil electroforético normal, desta determinação.

Tabela VI – Valores absolutos e em percentagem das diferentes frações de um proteinograma (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Fração do proteinograma	Valor absoluto (g/dl)	Valor em percentagem (%)
Albumina	3,2-5,2	57-74
α_1 -globulina	0,2-0,4	3-5
α_2 -globulina	0,4-0,7	5-9
β -globulina	0,7-0,9	9-14
γ -globulina	0,7-1,4	12-20

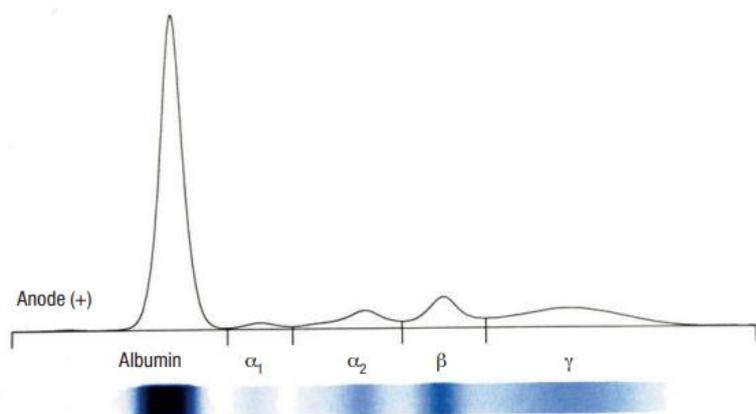


Figura 7 – Perfil eletroforético normal de um proteinograma do soro (Lee et al., 2017)

Os valores de referência, das diferentes classes de Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), são os seguintes (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015):

- **IgG:** 800-1800 mg/dl;
- **IgA:** 90-400 mg/dl;
- **IgM:** 60-250 mg/dl;
- **IgD:** 0,3-40 mg/dl;
- **IgE:** 0,01-0,43 mg/dl.

3.8. Marcadores tumorais

Os processos neoplásicos, caracterizam-se por defeitos na proliferação, maturação e pela apoptose de um determinado tipo celular. As alterações morfológicas, aberrantes, das células cancerígenas, são causadas por mutações genómicas que se traduzem em alterações na expressão genética e no metabolismo (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Os marcadores tumorais, englobam vários tipos de moléculas. Desta forma, diferentes proteínas, enzimas, metabolitos ou hormonas podem ser doseados, e cujo nível de secreção ou indução pelas células neoplásicas, é indicativo da presença e/ou da evolução de uma determinada doença (Tabela VII) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). Estes marcadores não apresentam qualquer valor diagnóstico por si só, uma vez que não são específicos do cancro. No entanto, podem ser extremamente úteis no auxílio ao diagnóstico, e principalmente na avaliação da evolução de uma doença, e na resposta a uma determinada terapêutica.

Tabela VII – Principais marcadores tumorais usados na prática clínica e patologias associadas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Marcador tumoral	Patologia(s) associada(s)
PSA	Cancro da próstata.
β -hCG	Tumores testiculares e do trofoblasto.
AFP	Carcinoma hepatocelular e tumores testiculares.
TG	Carcinoma folicular da tiroide.
CEA	Neoplasias do cólon, do pulmão, da mama e do estômago.
CA-19.9	Neoplasias do pâncreas, do estômago, do ovário e do endométrio.
CA-125	Neoplasias do ovário, do endométrio e do pulmão.
LDH	Linfomas, carcinoma hepatocelular e metástases hepáticas.

4. Microbiologia Clínica

A microbiologia clínica, e consequentemente, o laboratório ou a secção de microbiologia clínica, compreende diversas áreas da ciência. A bacteriologia, a micologia, a micobacteriologia, a parasitologia, a virologia e algumas técnicas imunológicas, são partes integrantes desta valência laboratorial.

O correto diagnóstico laboratorial de uma possível doença infecciosa, está dependente de diversos fatores e diferentes pessoas. Cada amostra microbiológica, deve sofrer uma colheita adequada, um transporte apropriado e um processamento correto, sendo da nossa responsabilidade, saber diferenciar uma boa de uma má amostra, rejeitando-a, se esta não for compatível com um resultado analítico fiável.

4.1. Urina

A urina é provavelmente a amostra mais comum no laboratório de microbiologia clínica convencional (Faron *et al.*, 2019). Na Tabela VIII são apresentadas as diferentes técnicas de colheita para amostras de urina (Direção-Geral da Saúde, 2012).

Tabela VIII – Técnicas para recolha de urina e algumas indicações (Direção-Geral da Saúde, 2012).

Técnica	Comentários
Colheita do jato intermédio.	O doente deve fazer a recolha da <u>primeira urina da manhã</u> . Para isso, após <u>higienização das mãos e da área genital</u> , deve iniciar a micção, <u>rejeitando a primeira porção</u> . A recolha do <u>jato intermédio</u> deve ocorrer num <u>recipiente estéril</u> , <u>rejeitando-se a última porção de urina</u> . O volume de amostra ideal, varia entre <u>10 e 20 ml</u> .
Colheita para saco coletor de urina.	Útil para colheitas em <u>crianças de fralda</u> . Após higienização da pele do bebé, cola-se o saco coletor na área genital. <u>Imediatamente após a micção, deve retirar-se e selar-se o saco</u> . Se demorar mais de uma hora, o saco coletor deverá ser substituído.
Colheita de amostra cateterizada.	A amostra deve ser colhida por <u>punção do cateter com uma agulha</u> , devendo <u>rejeitar-se o fluxo inicial de urina</u> . A recolha da amostra <u>nunca deve ser feita a partir do saco</u> .
Colheita por punção suprapúbica.	É o método de eleição para recolha de urina não contaminada, uma vez que <u>após higienização da pele</u> , procede-se à <u>punção diretamente na bexiga com uma agulha e seringa</u> .

4.1.1. Urocultura

Cultura quantitativa da urina

Do ponto de vista microbiológico, uma urocultura serve para confirmar uma infeção do trato urinário. Genericamente, considera-se positiva, quando se observa um crescimento

superior a 100.000 unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro (número de Kass). No exame direto, a observação de uma, ou mais bactérias, por campo de focagem (em pelo menos cinco campos distintos) ao microscópio ótico, na objetiva de imersão, com recurso à coloração de Gram de uma gota de urina não centrifugada, é indicativa de bacteriúria significativa, e correlaciona-se de igual forma, a uma quantificação superior a 10^5 UFC/ml (Direção-Geral da Saúde, 2012; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A correta interpretação dos resultados de uma urocultura segue algumas regras e tem em consideração os achados laboratoriais da Tabela IX.

Tabela IX – Regras a ter em consideração na valorização de uma urocultura (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Achados laboratoriais	Considerações
Presença de <u>dois ou mais</u> microrganismos.	É suspeito de uma contaminação da amostra, e devemos considerar em pedir a repetição da colheita.
Presença de <u>um</u> , ou <u>raramente dois</u> , microrganismos <u>significativos</u> (quantificação $\geq 10^5$ UFC/ml).	Procede-se à identificação microbiana e à realização de testes de suscetibilidade.
Presença de <u>um ou dois</u> microrganismos em quantidades <u>não significativas</u> (10^2 - 10^5 UFC/ml).	Poderá ser valorizável de acordo com a clínica e, caso se justifique, procede-se à identificação microbiana e à realização de testes de suscetibilidade.

No laboratório, o meio usado nas uroculturas (Figura 8) é o CPS[®] Elite, da BioMérieux. Este é um meio cromogénico, composto por substratos específicos que permitem detetar certas atividades enzimáticas (Yarbrough et al., 2016). Após incubação durante 24h a 35°C em atmosfera de aerobiose, se existirem microrganismos presentes na amostra, as colónias exibem uma coloração distinta para os possíveis patogéneos do trato urinário. É assim possível quantificar o número de bactérias presentes por mililitro de amostra e fazer uma identificação presuntiva. As infeções do trato urinário são bastante comuns, sendo que a maioria delas são causadas por bactérias de Gram-negativo e outras, por algumas estirpes Gram-positivas. Determinados fungos também provocam este tipo de infeção.

A inoculação da placa de Petri deve ser feita com uma ansa estéril de 10 µl, em condições de assepsia, fazendo traços paralelos de maneira a espalhar de forma uniforme o produto. O objetivo desta inoculação é, simultaneamente, quantificar a amostra e fazer uma identificação presuntiva com base na cor das colónias.

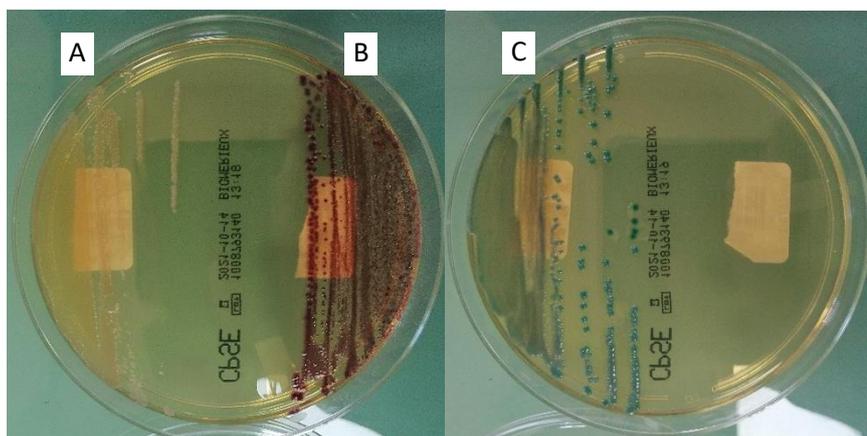


Figura 8 – A: Colónias sugestivas de *Proteus mirabilis* em meio CPS Elite; B: Colónias sugestivas de *Escherichia coli* em meio CPS Elite; C: Colónias sugestivas de *Klebsiella pneumoniae* em meio CPS Elite.

Quando não há crescimento microbiano numa urocultura, mas é possível observar leucócitos na urina, devemos colocar em hipótese o facto de estar presente um microrganismo que não cresce na urocultura de rotina, como fungos, bactérias anaeróbias, *Mycobacterium sp.*, *Leptospira sp.* e *Chlamydia sp.*, devendo continuar a análise com técnicas e meios de cultura adequados (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Análise sumária de urina (Urina tipo II)

O sedimento urinário é obtido após centrifugação de uma alíquota de 10 ml de urina em meio ácido, a 2000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, eliminam-se os 9 ml do sobrenadante e observa-se o remanescente entre lâmina e lamela, ao microscópio ótico. Em indivíduos saudáveis, é normal observar até 3 eritrócitos por campo e até 5 leucócitos por campo. Podem também estar presentes alguns cilindros hialinos, células epiteliais e cristais, em condições normais. O objetivo do exame do sedimento urinário é observar e avaliar a presença de células epiteliais, eritrócitos, cilindros e cristais (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

O exame microscópico do sedimento urinário é um método sensível, no entanto pouco específico. Permite-nos detetar piúria (leucócitos), sugestivo de inflamação, e células epiteliais de descamação, que podem ser devidas a contaminação da amostra (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Além do sedimento urinário, a análise sumária de urina contempla a avaliação de outros parâmetros descritos na Tabela X.

Tabela X – Exame macroscópico, determinações físico-químicas e a sua relação com a clínica (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Parâmetro	Observações
Cor	Em condições normais, a urina é de cor amarela-clara. Pode estar diluída (amarela e transparente), ou concentrada (amarela-escura). Uma aparência turva, pode dever-se à presença de células, pigmentos ou cristais. Alguns medicamentos e corantes, podem alterar a cor da urina.
Odor	Caracteristicamente, a urina tem um odor <i>suis generis</i> , que se pode acentuar em amostras concentradas e em ITU. Nas amostras de doentes diabéticos, é comum a urina apresentar um odor frutado.
Densidade	Normalmente, a densidade urinária varia entre 1,015 e 1,020. É equivalente ao peso de 1 ml de urina em comparação com 1 ml de água. A densidade é reflexo da concentração e pode estar aumentada na <i>diabetes mellitus</i> , na insuficiência suprarrenal, na insuficiência cardíaca, nas hepatopatias e em situações de vômitos e diarreias. Por outro lado, nas pielonefrites, a densidade está habitualmente diminuída.
pH	A utilização de fármacos e a nossa dieta, podem variar o pH da urina, que normalmente oscila entre 4,6 e 8. Uma urina ácida (pH < 4,5) pode estar associada a acidoses metabólicas, diarreias crónicas, dietas à base de carne e insuficiências respiratórias crónicas. Já uma urina alcalina (pH > 8), está muitas vezes associada a, por exemplo, dietas vegetarianas e infeções urinárias por patógenos produtores de urease, como o <i>Proteus mirabilis</i> .
Eritrócitos	Por campo de focagem, considera-se normal a presença de 1-3 hemácias. Microhematúria, define-se pela contagem entre 3-100 eritrócitos/campo e macrohematúria, quando essa determinação excede os 100-150 glóbulos vermelhos/campo. A etiologia da hematúria, no exame do sedimento urinário, pode ter origem nefrológica, urológica, extrarrenal ou renal. No entanto, a presença de hematúria, pode não apresentar qualquer significado patológico, por exemplo, quando se recolhe a amostra de urina durante a menstruação, durante períodos de febre e após a prática de exercício físico. Na presença de hematúria, é importante ter em consideração se existem outras alterações no sedimento urinário, como a presença de cilindros, e se esta se associa ou não, a proteinúria.
Proteínas	De forma genérica, a quantidade normal de proteinúria é de 100-150 mg/dl. Em condições normais, a membrana de filtração glomerular, constitui uma barreira eficaz à filtração de macromoléculas. A filtração das proteínas no glomérulo, está dependente do tamanho, da carga elétrica e da conformação molecular. Ainda, da integridade, ou não, da membrana e de variações no fluxo sanguíneo e na pressão hidrostática. Desta forma, as proteínas filtradas (de baixo peso molecular), são quase totalmente reabsorvidas no túbulo proximal. Na ocorrência de dano glomerular, há um aumento na permeabilidade da membrana basal para as proteínas do plasma. Considera-se significativa, uma proteinúria superior a 300 mg/24 h, ou superior a 200 mg/g de creatinina. A determinação da microalbuminúria, é útil na doença renal precoce, em especial nos diabéticos.
Glicose	Em condições normais, a glicose não aparece na urina. Começa a haver glicosúria, quando a glicémia excede as 180 mg/dl. No caso da gravidez, é possível haver glicosúria, sem apresentar hiperglicémia.
Corpos cetónicos	A cetonúria, caracteriza-se pela presença de acetona, ácido β -hidroxibutírico e ácido acetoacético na urina. Está geralmente associada à cetoacidose diabética e a períodos de jejum prolongado. Reflete uma desregulação do metabolismo dos hidratos de carbono, como fonte de energia, e um aumento do metabolismo lipídico, em que o fígado transforma os ácidos gordos livres em corpos cetónicos, para obtenção de energia.

Nitritos	Em condições normais, os nitritos não se detetam na urina. Ocasionalmente, em algumas infeções do trato urinário, é possível determinar nitritos na urina pela redução dos nitratos a nitritos, por ação de algumas bactérias.
Bilirrubina	Normalmente, não se deteta bilirrubina na urina. A bilirrubina conjugada (hidrossolúvel e não ligada à albumina), pode ser filtrada pelo glomérulo. A sua presença na urina, pode indicar uma disfunção hepática ao nível da conjugação ou alterações na sua excreção.
Urobilinogénio	Atualmente em desuso, o urobilinogénio urinário é normalmente eliminado em quantidades que variam entre 0-4 mg/dia. A sua presença em excesso na urina, é indicativa da passagem de bilirrubina para o intestino, como acontece por exemplo na insuficiência hepática e nas anemias hemolíticas.

4.1.2. Infeções do trato urinário (ITU)

Uma infeção do trato urinário (ITU), caracteriza-se pela combinação de aspetos clínicos (existência de sintomatologia) e uma urocultura positiva (Direção-Geral da Saúde, 2012). As ITU podem classificar-se de diversas formas (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015):

- Infeções do trato urinário superior (pielonefrites e ureterites) e infeções do trato urinário inferior (cistites, uretites, cervicites, vaginites e prostatites);
- ITU agudas ou crónicas;
- ITU não complicadas (normalmente mulheres jovens) ou ITU complicadas (indivíduos imunodeprimidos, cateterizados, em imunossupressão ou com algum tipo de anomalia funcional e/ou estrutural do sistema urinário);
- ITU sintomáticas ou não sintomáticas;
- ITU decorrentes de uma reinfeção (microrganismos diferentes) ou de uma recidiva (mesmo microrganismo);
- ITU adquiridas na comunidade ou nosocomiais.

O homem é menos suscetível a uma ITU, no entanto, quando presente, são quase consideradas como complicadas. Além da própria anatomia do trato urinário, uma osmolaridade elevada, um pH ácido e a presença de fluidos prostáticos (no homem), constituem barreiras de defesa contra possíveis agentes patogénicos.

Consoante o sexo do indivíduo, existem diferentes critérios para classificar positivamente uma urocultura (Tabela XI) (Direção-Geral da Saúde, 2012; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Tabela XI – Critérios de classificação para considerar uma urocultura positiva (Direção-Geral da Saúde, 2012; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

	Mulher	Homem
Bacteriúria significativa	Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^5$ UFC/ml.	Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^3$ UFC/ml.
Bacteriúria assintomática	Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^5$ UFC/ml, em duas amostras consecutivas.	Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^5$ UFC/ml, numa única amostra.
ITU	<u>Cistite</u> : Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^5$ UFC/ml. <u>Pielonefrite</u> : Um uropatógeno em quantidade $\geq 10^4$ UFC/ml.	<u>Cistite</u> : Uma cultura em quantidade $\geq 10^3$ UFC/ml.

Nas amostras obtidas por punção suprapúbica, qualquer quantidade de bactérias é significativa (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

4.2. Esperma

4.2.1. Espermocultura

A espermocultura é uma análise microbiológica com a finalidade de avaliar a presença ou ausência de agentes patogénicos no sistema reprodutor masculino. A espermocultura é avaliada com recurso à microscopia ótica e à cultura microbiológica.

A amostra de esperma é obtida por masturbação, após higienização prévia do pénis, sendo armazenada num recipiente coletor estéril. Após a colheita, a amostra pode ser conservada a temperatura ambiente e entregue ao laboratório, num período de tempo máximo até 12h.

Assim que a amostra de esperma chega ao laboratório, depois do processo de triagem e identificação da amostra, são preparadas duas lâminas para observação microscópica e inoculados cinco meios de cultura, para avaliação de crescimento microbiológico e identificação presuntiva. É importante salientar, que a ordem de inoculação dos meios de cultura deve partir do menos seletivo, para o mais seletivo. Desta forma, não se corre o risco de haver qualquer inibição de crescimento microbiológico nos meios de cultura menos seletivos, provocada por substâncias provenientes dos meios seletivos.

A inoculação nos meios de cultura, segue a técnica de esgotamento nos quatro quadrantes, que nos permite obter colónias isoladas.

A ordem e meios de cultura utilizados nesta análise são: **PVX** (gelose Chocolate) → **CNA** (gelose Columbia com 5% sangue de carneiro) → **CAN2** (meio cromogénico para o isolamento seletivo de leveduras e identificação direta de *Candida albicans*) → **MCK** (gelose Mac Conkey) → **MSA2** (gelose Chapman).

4.2.2. Espermograma

Um espermograma é o estudo do sémen, sendo a prova diagnóstica mais utilizada para a avaliação da infertilidade masculina. A finalidade ao realizar um espermograma, é avaliar o número de espermatozoides, bem como a sua motilidade e morfologia. É útil no estudo da fertilidade e na avaliação evolutiva ao tratamento da infertilidade (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A amostra de esperma é obtida por masturbação, sem recurso ao preservativo, após uma abstinência sexual entre 2 a 7 dias. Intervalos de abstinência superiores a 4 dias, podem elevar o número total de espermatozoides, mas diminuir a sua motilidade (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). A totalidade de sémen ejaculado, deve ser recolhido para um recipiente coletor estéril. Preferencialmente, a colheita deve ser feita na clínica (numa sala apropriada). Se não for possível, a recolha da amostra poderá ser efetuada em casa, e deverá ser entregue ao laboratório nos 30 minutos seguintes.

É fundamental que o estudo da amostra seja efetuado na primeira hora após a colheita, e que a temperatura da mesma se mantenha sempre entre 20°C e 37°C. Desta forma, asseguramos a reprodutibilidade da análise.

Os parâmetros avaliados no espermograma são referidos na Tabela XII.

Tabela XII – Parâmetros do espermograma e sua interpretação (Direcção-Geral da Saúde, 2011; Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Liquefação	Para a realização do espermograma, o sémen necessita de estar no estado líquido. Após a colheita, apresenta uma consistência coagulada, e em condições normais, a sua liquefação total, ocorre 1h depois da ejaculação.
Viscosidade	Uma viscosidade acrescida, ou muito excessiva, pode ser sugestiva de uma disfunção da próstata.
Volume	Se o período de abstinência for cumprido, o volume normal por ejaculação é de aproximadamente 1,5 ml. Quantidades inferiores, denominam-se de hipospermia.
Cor	Em condições normais, o esperma apresenta uma coloração de branco opalescente, ligeiramente amarelado.
pH	O pH normal do sémen é > 7,1. Valores inferiores podem indicar processos inflamatórios crónicos, ou a ausência de espermatozoides.

Concentração de espermatozoides	Em média, são ejaculados 15 milhões de espermatozoides por mililitro de sémen. Concentrações inferiores, designam-se oligozoospermia.
Motilidade	Valoriza-se a percentagem de espermatozoides móveis e progressivos, devendo este número ser superior a 32%. Quando a determinação de espermatozoides móveis progressivos é inferior a esta percentagem, falamos de astenozoospermia.
Vitalidade	Uma percentagem normal de espermatozoides vivos por amostra, é superior a 58%. Quanto menor for este número, mais acentuada será a necrozoospermia.
Morfologia	Num espermograma normal, a percentagem de espermatozoides perfeitamente normais quanto à sua forma e tamanho, deve ser $\geq 4\%$. Determinações inferiores a este valor, denomina-se teratospermia.
Leucócitos	Quando existe leucocitose, a concentração de glóbulos brancos no sémen é superior a 1 milhão por mililitro de esperma.

4.3. Fezes

O exame às fezes tem a sua principal utilidade no estudo da diarreia crónica e aguda (de origem infecciosa) (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Uma amostra de fezes é normalmente recolhida em casa do paciente, e deve ser efetuada uma higiene prévia da zona. Idealmente, o paciente deve realizar uma micção completa antes da recolha de fezes, para se reduzir o risco de contaminação da amostra.

Após a deposição, as fezes devem ser recolhidas para um recipiente de plástico estéril, que contém uma pequena espátula. A amostra deve ser entregue ao laboratório num período máximo de até 24 horas e pode ser armazenada a frio, devidamente fechada, até ao ato da entrega.

4.3.1. Exame bacteriológico de fezes

Cerca de um terço do peso seco das fezes são microrganismos. No adulto, a flora normal é predominantemente Gram negativa, já nos lactentes é Gram positiva (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

Um exame bacteriológico de fezes, constitui a observação microscópica de uma extensão de fezes após coloração e a coprocultura.

Coprocultura

Para o exame cultural, podem chegar ao laboratório 1 ou 3 amostras de fezes (de 3 dias consecutivos), e o *kit* FecalSwab[®] (Figura 9). No coletor estéril, o paciente deve colocar uma amostra com aproximadamente 5 cm a 10 cm, de porções purulentas ou sanguinolentas das suas fezes. Deve evitar-se ao máximo a contaminação da amostra por água, desinfetantes

ou urina. O *kit* FecalSwab[®], contém uma zaragatoa e um tubo, de tampa verde, com 2 ml de meio de transporte Cary-Blair. É um *kit* extremamente útil, que assegura a colheita da amostra e a preservação de microrganismos Gram negativos e anaeróbios, durante o seu transporte. Após a colheita para o recipiente coletor estéril, o paciente deve abrir a embalagem do *kit*, e desenroscar a tampa verde com cuidado para não verter qualquer líquido no seu interior (meio de transporte Cary-Blair). Depois, com a zaragatoa, deve tirar uma pequena porção de fezes do coletor estéril, e introduzi-la de imediato no tubo que contém o meio líquido. Após partir o cabo da zaragatoa na linha colorida, o tubo deve ficar bem fechado, deixando a ponta da zaragatoa no seu interior. As amostras de fezes, têm uma viabilidade de até 12h a temperatura ambiente (recipiente coletor estéril), ou até 4 dias num *kit* FecalSwab[®].

Numa coprocultura convencional, é possível identificar *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Shigella sp.* Num paciente com diarreia aguda, uma identificação positiva para qualquer um destes agentes patogénicos, interpreta-se como sendo um resultado verdadeiro positivo. Em caso de infeção, estes microrganismos estão presentes nas fezes de forma contínua (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

No laboratório, os procedimentos para a realização de uma coprocultura, são os seguintes:

- Pipetar 800 µl do meio líquido Cary-Blair (proveniente do *kit* FecalSwab[®]), para um caldo de enriquecimento seletivo BBL[™] GN broth. Este meio é usado para o enriquecimento seletivo de *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*. Posteriormente, o caldo de enriquecimento seletivo, é incubado a 35°C, durante 18h a 24h em atmosfera O₂. Depois do período de incubação, devemos inocular 10 µl de amostra, proveniente do caldo BBL[™] GN broth, num meio Hektoen (agar seletivo para o isolamento de *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*). Após executar a técnica de esgotamento do produto nos 4 quadrantes, devemos incubar a gelose Hektoen a 35°C, durante 18-24 horas em atmosfera O₂.
- Pipetar 100 µl do meio líquido Cary-Blair, para uma gelose Campyloesel (agar seletivo para o isolamento de *Campylobacter sp.*). Após a execução da técnica de esgotamento do produto nos 4 quadrantes, o meio de cultura é incubado a 35 °C, durante 40h a 48h em condições de microaerofilia.

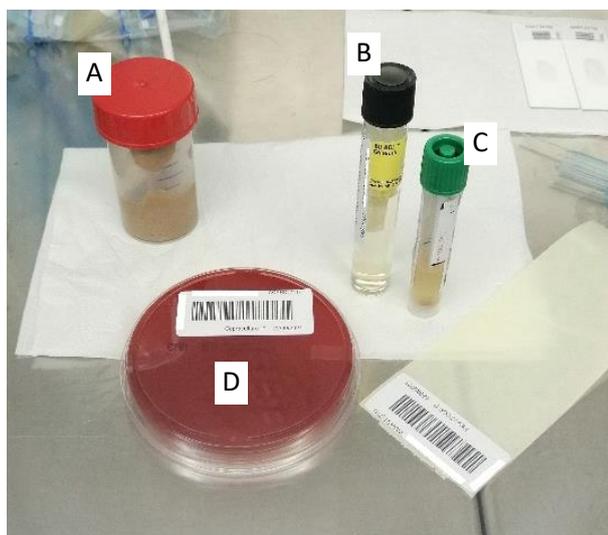


Figura 9 – Coprocultura; A: Recipiente coletor de fezes; B: Caldo de enriquecimento seletivo BBL™ GN broth; C: kit FecalSwab®; D: gelose Campyloset.

Em amostras fecais, provenientes de crianças com idade igual ou inferior a 5 anos, é realizada adicionalmente, a pesquisa rápida de antígenos, mediante técnicas imunológicas, para *Rotavírus sp.* e *Escherichia coli O157:H7* (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

4.3.2. Exame parasitológico de fezes

Na realização de um exame parasitológico de fezes, é importante a observação microscópica a fresco de uma amostra recente de fezes e sem conservantes, para a pesquisa de estruturas parasitárias na amostra (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015).

A excreção de formas parasitárias nas fezes pode ser intermitente, pelo que se recomenda a recolha de 3 amostras de fezes em 3 dias consecutivos, para 3 recipientes coletores estéreis com espátula. Após a receção e triagem das amostras no laboratório, estas podem ficar refrigeradas entre 2°C e 8°C durante, no máximo, 3 dias.

Para proceder ao exame microscópico direto, prepara-se uma suspensão de fezes em água ou soro fisiológico, entre lâmina e lamela. A pesquisa de quistos é efetuada com a objetiva de 40×, já a observação de ovos faz-se com recurso à objetiva de 10× (Figura 10). Esta é uma técnica simples e fácil de executar, no entanto, apenas os resultados positivos apresentam valor clínico, ou seja, um resultado negativo, num exame parasitológico de fezes usando esta técnica, não exclui, por si só, a possibilidade de existir uma parasitose.

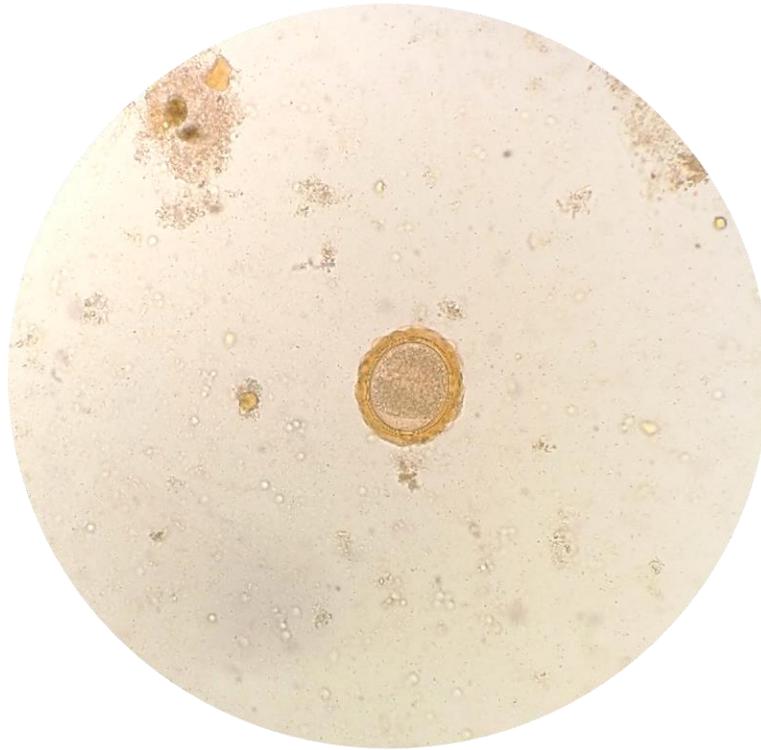


Figura 10 – Ovo fértil de *Ascaris lumbricoides* observado na objetiva de 10x numa amostra de fezes com lugol.

4.4. Exsudado vaginal

A colheita de um exsudado vaginal, deve ser feita com recurso a um espéculo ginecológico, expondo a vagina e o colo do útero. Em grávidas, não se deve recorrer ao espéculo. São usadas duas zaragatoas neste procedimento, sendo que a primeira é colocada num meio de transporte com carvão (colheita do exsudado vaginal na zona do fundo do saco posterior) e a outra (uma zaragatoa seca), serve para a realização de dois esfregaços do exsudado em duas lâminas, no momento da colheita, devendo a zaragatoa ser posteriormente enviada ao laboratório em 1 ml de soro fisiológico estéril. Deverá observar-se e indicar no inquérito a cor do exsudado, a presença ou não de algum odor característico e o aspeto da mucosa vaginal. No dia da colheita, a higienização da zona deve ser feita apenas com água e sabão, evitando o uso de qualquer desinfetante. Se já estiver a fazer algum tipo de tratamento, este deve ser interrompido, idealmente, uma semana antes da colheita. É recomendada abstinência sexual nos dois dias que antecedem a colheita.

No laboratório, após receção e triagem da zaragatoa em meio de transporte com carvão, devemos identificar e inocular, pela técnica de esgotamento do produto nos quatro quadrantes, os seguintes meios de cultura do menos ao mais seletivo: **PVX** (gelose Chocolate para o isolamento de bactérias fastidiosas como *Neisseria gonorrhoeae*. Incubação numa atmosfera com 5% de CO₂ a 35°C, durante 24h a 48h.) → **CNA** (gelose Columbia com 5%

de sangue de carneiro para o isolamento seletivo de bactérias fastidiosas e detecção de hemólise. Incubação numa atmosfera com 5% de CO₂ a 35°C, durante 24h a 48h.) → **CAN2** (meio de cultura cromogénico para o isolamento seletivo de leveduras e a identificação direta de *Candida albicans*. Incubação numa atmosfera de O₂ a 35°C, durante 24h a 72h.) (Figura 11). As zaragoas podem ficar a temperatura ambiente por um período máximo de 12 horas.

Os dois esfregaços do exsudado vaginal, são devidamente identificados e submetidos à coloração de Gram, para serem observados ao microscópio ótico.

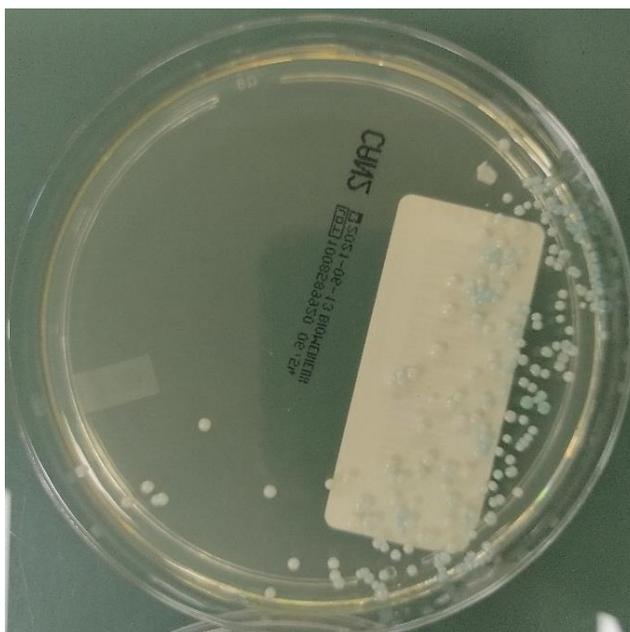


Figura 11 – Isolamento de colónias de *Candida sp.* em meio de cultura CAN2.

4.5. Exsudado auricular

Para proceder ao exame cultural de um exsudado auricular, são necessárias duas lâminas para a realização do esfregaço da amostra em duplicado, e uma zaragoa em meio de transporte Stuart ou Amies. A colheita do exsudado, ocorre ao nível do canal auditivo externo.

Após receção e triagem da amostra no laboratório, identificam-se os meios de cultura necessários nesta análise, bem como as lâminas para a realização dos esfregaços. Estas lâminas são posteriormente coradas com recurso à coloração de Gram, para exame direto ao microscópio ótico. Os meios de cultura são inoculados pela técnica de esgotamento do produto nos quatro quadrantes, do menos seletivo, ao mais seletivo e são os seguintes: **PVX** (gelose Chocolate, incubação numa atmosfera com 5% CO₂) → **CNA** (agar Columbia com 5% de sangue de carneiro, incubação numa atmosfera com 5% de CO₂) → **CAN2** (meio de cultura cromogénico para o isolamento seletivo de leveduras e identificação direta para

Candida albicans, incubação numa atmosfera de O₂) → **MCK** (gelose Mac Conkey para o isolamento seletivo de *Enterobacteriaceae*, incubação numa atmosfera de O₂) → **MSA2** (gelose Chapman para o isolamento seletivo de *staphylococci*, incubação numa atmosfera de O₂). Todos os meios de cultura vão para a estufa a 35°C, durante 24h a 48h. Poderá ser necessário estender o período de incubação da gelose CAN2 para 72 horas.

Uma amostra de exsudado auricular, tem viabilidade durante 24 horas e requer refrigeração entre 2°C a 8°C.

4.6. Pesquisa de streptococci Grupo B de Lancefield (*Streptococcus agalactae*)

Os *Streptococcus spp.* são cocos Gram positivos, que se agrupam em diplococos e/ou em cadeia. São microrganismos anaeróbios facultativos, de crescimento capnófilico (necessitam de uma atmosfera rica em dióxido de carbono). Caracterizam-se também pela ausência de catalase. Podem ser classificados quanto ao tipo de hemólise (β – hemólise completa, α – hemólise incompleta, δ – ausência de hemólise), pela classificação de Lancefield (distinção serológica, agrupando-os quanto ao tipo de antígenos da parede celular), avaliando as suas características fisiológicas e quanto à espécie, com recurso a testes bioquímicos e técnicas de biologia molecular (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016; Patterson, 1996).

A classificação de Lancefield surge em 1933, agrupando os *streptococci* segundo os hidratos de carbono presentes na parede celular (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016).

O *Streptococcus agalactae* (Grupo B de Lancefield) é β hemolítico, produz o fator CAMP e hidrolisa o hipurato (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2016). Está associado a doença invasiva no recém-nascido, com complicações do parto e pneumonia ou meningite com bacteriemia, podendo evoluir para sépsis neonatal e morte (Brimil *et al.*, 2006). A infeção nos adultos é rara, sendo que a sua pesquisa faz hoje parte do diagnóstico pré-natal, e é feita entre a 35^a e a 37^a semana de gestação (Direção-Geral da Saúde, 2013).

Para a realização desta análise, são necessárias duas zaragatoas em meio de transporte Stuart ou Amies, sendo que uma delas é usada na colheita do exsudado vaginal e a outra na recolha do exsudado retal. Em relação à colheita do exsudado vaginal, existem algumas recomendações que a utente deve seguir:

- No dia da colheita, a higiene deve ser feita apenas com água e sabão, sem recorrer a qualquer tipo de desinfetante;

- Uma semana antes da colheita, deve suspender qualquer tipo de terapia oral ou local, que possa afetar a viabilidade destes microrganismos e causar falsos negativos;
- É recomendada abstinência sexual nos dois dias que antecedem a colheita.

A colheita do exsudado, deve ser feita no primeiro terço da vagina sem recorrer ao espécuro ginecológico.

Com a segunda zaragatoa, a colheita do exsudado retal deve ser efetuada nas margens do ânus.

Na chegada das amostras ao laboratório, devemos triar as duas zaragatoas em meio de transporte (uma correspondente ao exsudado vaginal e a outra referente ao exsudado retal). Posteriormente, identificamos um meio de cultura Granada, sendo que numa metade da gelose vamos inocular o exsudado vaginal, e na outra metade da placa o exsudado retal. Este meio de cultura é seletivo para o screening e identificação de *Streptococcus agalactiae*. Um resultado positivo, caracteriza-se pela observação de colónias cor de laranja após incubação a 35°C durante 24h a 48h, numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono (Figura 12).



Figura 12 – Isolamento de colónias de *Streptococcus agalactiae* (colónias cor-de-laranja) em meio de cultura Granada.

5. SARS-CoV-2 e a COVID-19

A COVID-19 é uma doença infecciosa respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2 (Boopathi, Poma e Kolandaivel, 2021). A Organização Mundial de Saúde (OMS) foi pela primeira vez notificada a 31 de dezembro de 2019, acerca de um surto, que se pensava ser de pneumonia viral, em Wuhan, na República Popular da China (World Health Organization,

2021). A 11 de março de 2020, a COVID-19 foi oficialmente categorizada como pandemia pela OMS (World Health Organization, 2022).

O SARS-CoV-2 (**S**evere **A**cute **R**espiratory **S**yndrome-related **C**oronavirus **2**), cujos hospedeiros naturais são os morcegos e roedores, é o mais recente vírus do género *Betacoronavirus*, pertencente à subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales*. É um vírus envelopado, de cápside helicoidal, com um genoma RNA de cadeia simples e polaridade positiva, apresentando um aspeto característico em “coroa”. Codifica quatro proteínas estruturais: **S** – *spike*, **E** – envelope, **M** – membrana e **N** – nucleocápside (Figura 13) (Ludwig e Zarbock, 2020). A glicoproteína *spike*, ou espícula, é responsável pela ligação viral ao recetor celular no hospedeiro, e pela fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula do hospedeiro (Li, 2016) (Ni *et al.*, 2020). Posteriormente, o citoplasma celular é invadido pela proteína da nucleocápside, cuja principal função é a encapsidação do genoma (Li, 2016). A formação de novas proteínas estruturais dará origem a novos vírus. Mediante processos de exocitose, estes novos vírus vão abandonar as células hospedeiras e continuarão a infetar outras células.

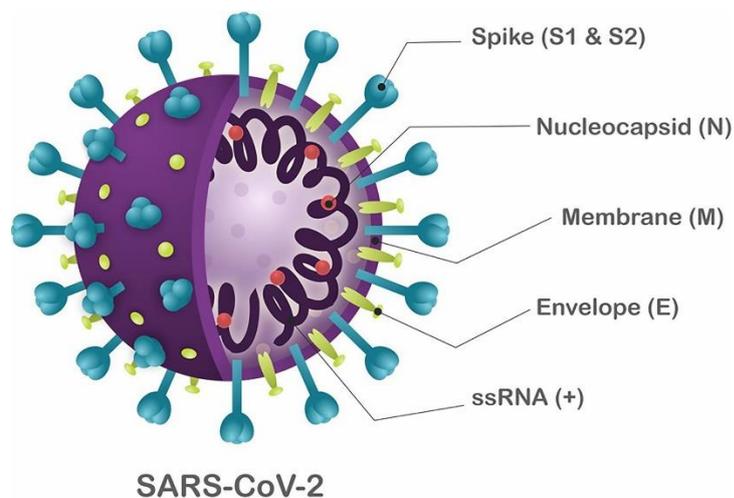


Figura 13 – Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2 (Santos *et al.*, 2020).

Além do síndrome respiratório agudo grave, a patogenicidade deste vírus nos humanos, está associada a infeções graves do trato respiratório inferior e a outras manifestações clínicas extrapulmonares (Serviço Nacional de Saúde, 2021). No entanto, o portador assintomático ou com sintomas ligeiros, é cada vez mais comum nos dias de hoje. Isto deve-se ao facto da eficácia comprovada da vacinação, na prevenção da doença grave.

A transmissão viral, direta ou indireta, ocorre por meio de gotículas expelidas por portadores. A tosse, o espirro e a expiração, são as principais formas de disseminação viral, já que o vírus se encontra presente no interior dos aerossóis e das gotículas expelidas (Cevik *et*

al., 2020). A transmissão direta ocorre quando uma pessoa inala gotículas ou aerossóis, provenientes de indivíduos infetados. Na transmissão indireta as gotículas expelidas por pessoas infetadas ficam depositadas em objetos e superfícies. Ao tocar nestes objetos e superfícies, pode haver contaminação se a pessoa levar as mãos aos olhos, à boca ou ao nariz. A prevenção da transmissão, passa pela redução dos contactos interpessoais próximos, em espaços fechados e de longa duração, pelo uso correto da máscara facial (preferencialmente do tipo FFP2 ou cirúrgica), e pela lavagem e desinfeção das mãos (World Health Organization, 2021).

O diagnóstico da COVID-19 implica a deteção do vírus SARS-CoV-2. No laboratório são usados métodos diretos, como a deteção e amplificação do genoma viral por RT-PCR em tempo real e a deteção de uma proteína viral, nos testes rápidos para pesquisa de antigénio, por meio de um ensaio de fluxo lateral. O diagnóstico direto, permite estabelecer uma clara relação com a infeção aguda, ou ativa. O doseamento de anticorpos anti-SARS-CoV-2 do tipo IgG e IgM corresponde a métodos de deteção indiretos, sendo principalmente útil na avaliação da imunidade desenvolvida pelo nosso organismo a este patógeno ou à vacina. O doseamento destes anticorpos é realizado no soro e não está descrito no presente relatório (Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021).

5.1. Amostra

Para a deteção do vírus SARS-CoV-2, a amostra de eleição é o exsudado nasofaríngeo. O local de colheitas de todas as amostras no contexto da COVID-19, para pesquisa direta de SARS-CoV-2, é num espaço no exterior do laboratório, devidamente preparado e equipado, assegurando o cumprimento de todas as normas e recomendações da Direção-Geral da Saúde (Direção Geral da Saúde, 2020).

O procedimento de colheita da amostra inicia-se pedindo ao utente para inclinar a cabeça ligeiramente para trás, em 20°. Deve, posteriormente, destapar apenas o nariz e permanecer com a boca coberta pela máscara. A partir deste momento, é aconselhável ao utente que realize os processos de inspiração e expiração apenas pela boca.

Devemos inserir a zaragatoa numa das narinas e percorrer cuidadosamente cerca de 5 centímetros, sempre paralelamente ao palato duro, até sentirmos uma pequena resistência. Na nasofaringe, a zaragatoa deve permanecer uns segundos para absorver bem as secreções. Depois, removemos lentamente a zaragatoa, sempre com movimentos em rotação, e repete-se o procedimento na outra narina com a mesma zaragatoa. No final coloca-se a zaragatoa

num tubo com meio de transporte viral, já corretamente identificado com o código de barras, o nome do utente, o tipo de amostra e o código alfa numérico correspondente.

Estas amostras apresentam estabilidade durante 5 dias, se refrigeradas entre 2°C a 8°C. Amostras provenientes de postos de colheita exteriores, devem ser transportadas em malas de transporte refrigeradas, devidamente desinfetadas com álcool a 70% e exclusivas a este tipo de amostra (Direção Geral da Saúde, 2020).

5.2. Teste rápido para pesquisa de antigénio

Os testes rápidos para pesquisa de antigénio SARS-CoV-2, usados no laboratório, são os CLINITEST® Rapid COVID-19 Antigen Test da SIEMENS Healthineers. Por meio de um ensaio de fluxo lateral, é possível detetar qualitativamente a proteína da nucleocápside do vírus SARS-CoV-2. Este teste rápido, não permite a diferenciação entre o vírus SARS-CoV e o mais recente SARS-CoV-2. É possível realizar o teste, recorrendo a amostras de exsudado nasofaríngeo ou nasal (Siemens Healthcare, 2021). A amostra de eleição, colhida no laboratório, é o exsudado da nasofarínge. Qualquer pessoa pode deslocar-se ao laboratório com a finalidade de realizar um teste rápido para pesquisa de antigénio, com ou sem marcação prévia. O laboratório compromete-se a enviar por correio eletrónico o resultado do teste com o certificado de testagem até 3h após a colheita do exsudado nasofaríngeo.

Os “*lateral flow assays*”, e em concreto este teste rápido para a pesquisa de antigénio, usa anticorpos monoclonais com elevada sensibilidade, para a deteção da proteína da nucleocápside do vírus SARS-CoV-2 (Siemens Healthcare, 2021).

A tira de teste é constituída por quatro regiões distintas: A região da amostra; A região reagente, onde os anticorpos monoclonais (específicos da proteína N do SARS-CoV-2) estão conjugados com ouro coloidal; A região onde ocorre a reação, composta por anticorpos primários que reconhecem a proteína da nucleocápside na linha de teste, e por anticorpos secundários anti-anticorpo monoclonal, na linha de controlo (Figura 14). A última porção da tira de teste, denomina-se região de absorção (Koczula e Gallotta, 2016; Siemens Healthcare, 2021).

Ao adicionar a amostra no respetivo poço (S – “*sample*”), o conjugado pré formado entre o ouro coloidal e os anticorpos monoclonais, presentes na região reagente, são completamente dissolvidos e migram juntamente com a amostra. Se a proteína da nucleocápside estiver presente na amostra, formar-se-ão complexos antigénio-anticorpo. Assim, a proteína do vírus será captada pelos anticorpos primários específicos, presentes na região onde irá aparecer uma linha vermelha, correspondente à linha de teste (T). Um teste

positivo ou um teste negativo, só é válido se a linha de controlo (C) aparecer. É suposto a linha de controlo ser visível em todos os ensaios, o que nos indica que foi utilizado um volume adequado de amostra, que a absorção na membrana foi eficaz e que o ensaio é válido. Para que isto aconteça, são utilizados na linha de controlo, anticorpos secundários anti-anticorpo. Ao migrarem com a amostra e com o reagente, os anticorpos monoclonais provenientes da região reagente, são reconhecidos pelos anticorpos secundários anti-anticorpo e ficarão retidos na linha de controlo. O ouro coloidal, é o responsável pela coloração vermelha nas linhas de teste e de controlo (Koczula e Gallotta, 2016; Siemens Healthcare, 2021).

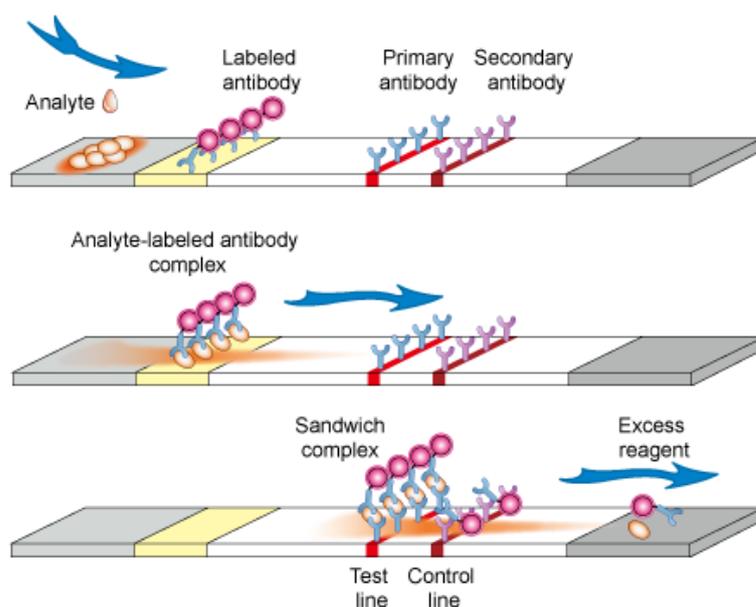


Figura 14 – Representação esquemática de um ensaio de fluxo lateral (Qriouet et al., 2021).

Um teste negativo, é apenas caracterizado pelo aparecimento da linha de controlo. Um teste positivo, caracteriza-se pelo aparecimento da linha de teste e da linha de controlo. (Figura 15). Considera-se inválido, qualquer teste em que não seja visível a linha de controlo, após a realização da técnica (Koczula e Gallotta, 2016; Siemens Healthcare, 2021).

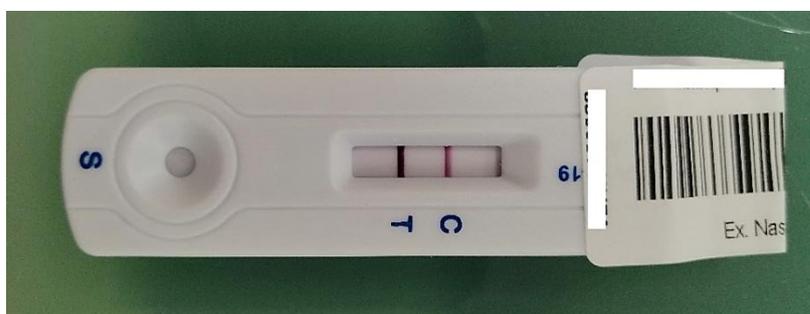


Figura 15 – Teste rápido para pesquisa de antígeno viral positivo.

Na chegada da amostra ao interior do laboratório, esta é triada e procede-se à identificação da cassetete de teste e de um tubo de extração correspondente. A partir deste

momento, a manipulação da amostra e a execução do ensaio, devem ocorrer na câmara de segurança biológica de classe II.

Adicionamos 10 ou 11 gotas da solução tampão de extração (fornecida nos kits CLINITEST® Rapid COVID-19 Antigen Test da SIEMENS Healthineers), ao tubo de extração estéril. Depois, introduz-se a zaragatoa da amostra no tubo de extração estéril com a solução tampão, e fricciona-se vigorosamente a ponta da zaragatoa contra o fundo e as laterais do tubo, durante 10 a 15 segundos. Cronometramos 1 minuto e deixamos a zaragatoa no interior do tubo em repouso. Após este período de tempo, retiramos a zaragatoa apertando a abertura do tubo de modo a preservar a maior quantidade de solução-amostra possível. No final, introduzimos uma ponta de extração ao tubo e descartamos a zaragatoa para o contentor de resíduos de risco biológico. Para dar início ao ensaio colocamos 4 gotas de solução-amostra no poço da cassette de teste, e após 15 minutos analisamos os resultados obtidos (Siemens Healthcare, 2021).

Este teste rápido para pesquisa de antígeno viral, apresenta uma sensibilidade relativa de 98,32%, uma especificidade relativa de 99,60% e uma precisão de 99,42%. Estes resultados estatísticos foram obtidos processando as mesmas amostras de exsudados nasofaríngeos em testes rápidos para pesquisa de antígeno e RT-PCR (Siemens Healthcare, 2021).

5.3. Pesquisa de genoma viral por RT-PCR em tempo real

As técnicas de biologia molecular, adquiriram uma importância e uma utilidade exponenciais com o decorrer da presente pandemia. Por transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), em tempo real, é possível detetar e amplificar de forma específica, determinadas regiões genéticas do vírus SARS-CoV-2 (sequências alvo nos genes S, E, N, RdRp e ORF1a/b (Sheikhzadeh *et al.*, 2020; Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021).

O SARS-CoV-2, apresenta um genoma RNA. De forma a ser possível a sua deteção por PCR, é necessário que ocorra a transcrição reversa das moléculas de RNA, para as suas sequências complementares de DNA (DNA complementar). Estas sequências de DNA complementar (cDNA) sintetizadas, podem então ser amplificadas por técnicas de PCR standardizadas. De forma resumida, é este o fundamento da RT-PCR (Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021).

Antes de dar início à técnica, triamos as amostras normalmente em grupos de 16. Isto acontece, pois o equipamento mais usado no laboratório para a extração dos ácidos nucleicos é o NE48, da Genrui Biotech. Este equipamento tem a capacidade de processar 48 amostras de cada vez, distribuídas por 3 placas de 96 poços, ou seja, 16 amostras em cada placa. A

triagem das amostras é um momento crucial e de grande responsabilidade, em que devemos anotar a hora exata de quando iniciamos a triagem das 16 amostras, para podermos imprimir a lista de trabalho correspondente. Depois, ordenamos as amostras por ordem igual à da lista de trabalho e numeramos. Os últimos dois poços da placa de amplificação, ficam sempre reservados para o controlo positivo, que contém genes do vírus SARS-CoV-2, e para o controlo negativo, em que a amostra é substituída por água estéril (Kitane *et al.*, 2021)(Kitane *et al.*, 2021; Sheikhzadeh *et al.*, 2020; Stephenson *et al.*, 2021; Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021). Se a ordem das amostras, ou a numeração das mesmas for alterada por algum erro ou descuido, podemos correr o risco de reportar um caso positivo numa pessoa negativa (falso positivo), ou dar um resultado negativo numa pessoa infetada com SARS-CoV-2 (falso negativo).

Além do processo de triagem e organização das amostras, tive a oportunidade de participar ativamente na preparação de alíquotas e na inativação e extração virais. Executando todos os procedimentos na câmara de segurança biológica de classe II (MSC-ADVANTAGE™ da Thermo Scientific™), as alíquotas de cada amostra são preparadas, após homogeneização em agitador vortex, dispensando cerca de 1 ml para tubos Eppendorf® estéreis.

Antes do processo de extração do RNA viral, é necessário assegurar a inativação do vírus. Este é um passo importante para a segurança do operador. Para isso, preparamos uma mistura (ou “mix”) com 850 µl de Proteinase K e 136 µl de controlo interno. A Proteinase K, é uma enzima recombinante que teve origem no fungo *Tritirachium album* (Ebeling *et al.*, 1974). É utilizada em técnicas de biologia molecular, devido à sua capacidade de inativação de RNases e DNases. Neste caso, a inativação da RNase, assegura o isolamento da molécula de RNA intacta (Genoud *et al.*, 2021). Esta mistura de Proteinase K e controlo interno, deve posteriormente ser bem homogeneizada num agitador vortex. Após a preparação da mix, devemos pipetar 250 µl de cada amostra (das alíquotas preparadas), para novos tubos Eppendorf® estéreis e adicionar em cada um, 58 µl de mix. Cada um destes tubos, contendo a solução “amostra + mix”, deve ser muito bem homogeneizado, em agitador vortex, durante 5 a 10 segundos. Fica posteriormente a incubar alguns minutos a temperatura ambiente. A partir deste momento, começamos a preparar a placa de extração. Devemos identificar, nas laterais da placa, o número correspondente a cada amostra. A placa de extração é dividida ao meio, e cada amostra corresponde a uma linha com 6 poços. Pipetamos 260 µl de cada solução “amostra + mix” no poço mais à esquerda da linha correspondente. No final, pipetamos em cada um dos poços mais à esquerda, 28 µl de beads magnéticas e homogeneizamos bem com a pipeta, usando movimentos de aspiração e libertação suaves. A finalidade destas beads

magnéticas é a extração e purificação do RNA (Klein *et al.*, 2020). Posteriormente, colocamos a placa e as hastes magnéticas no equipamento. Este sistema automático, para a extração e purificação dos ácidos nucleicos, por tecnologia das *beads* magnéticas, permite-nos obter os eluados em apenas 24 minutos. O equipamento tem uma elevada capacidade de rápido aquecimento e arrefecimento, atingindo uma temperatura máxima de aproximadamente 90°C. No final, recolhemos os eluados correspondentes a cada amostra, no poço mais à direita de cada linha. O volume dos eluados obtidos, são cerca de 20 µl. Finalmente, devemos dispensar as placas, bem como as hastes magnéticas, de forma segura, no contentor de resíduos de risco biológico. Antes da próxima utilização, limpamos o interior do equipamento com álcool a 70% e executamos o programa de desinfecção por luz ultra-violeta, durante 15 minutos. Os eluados devem ser refrigerados a uma temperatura entre 2°C a 8°C, até à preparação da placa de amplificação que irá para o termociclador.

O QuantStudio™ 5, da appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific, foi o termociclador usado pelo laboratório, durante o meu período de estágio. Para a deteção do genoma viral, são usados *primers* específicos para os genes S (*spike*), N (nucleocápside) e ORF1a/b, do vírus SARS-CoV-2. Os kits de extração comerciais, consistem essencialmente em enzimas de transcriptase reversa, nucleotídeos, *primers*, sondas TaqMan™ e DNA polimerase (Stephenson *et al.*, 2021). A RT-PCR inicia-se com a transcrição reversa. Para isso, o *reverse primer* liga-se à molécula de cDNA, que dá origem a um seguimento complementar do genoma viral (RNA). A transcriptase reversa, é responsável pela adição de nucleotídeos na extremidade 3' do *primer*, que originará cDNA do RNA viral. Seguem-se processos de desnaturação dos híbridos de RNA-DNA, com o termociclador a atingir uma temperatura máxima de 95°C. A ação da transcriptase reversa, é também inibida nesta altura. Uma PCR consiste em vários ciclos térmicos, sendo que cada um desses ciclos se caracteriza por processos de desnaturação, hibridização e amplificação. Após a desnaturação, a temperatura no interior do termociclador baixa, o que permite a ligação do *forward primer* ao seu cDNA. Na etapa de extensão, a DNA polimerase sintetiza novo DNA, adicionando nucleotídeos da extremidade 5' para a extremidade 3'. No final do primeiro ciclo da reação, obtem-se uma dupla cadeia de DNA, que volta a ser desnaturada no início do segundo ciclo. Depois, ocorre novamente a ligação dos *primers* nas cadeias simples de DNA, e a ligação da sonda TaqMan™ na sua região complementar do DNA alvo. Esta sonda é constituída por um fluoróforo (situado na extremidade 5'), que emitirá fluorescência, quando excitado pela fonte de radiação do termociclador. Na extremidade 3' da sonda, encontra-se um *quencher*, que tem a capacidade de absorver a energia emitida pelo fluoróforo. Quando a DNA polimerase atinge a sonda

TaqMan™, a nuclease quebra a ligação da sonda, e o fluoróforo liberta-se do seu quencher. À medida que o número de ciclos aumenta, o número de cópias de moléculas formadas é superior e proporcional à intensidade de fluorescência resultante. No final de cada PCR, são formadas milhões a bilhões de cópias, sendo que a cada ciclo da reação, o número de moléculas de DNA de dupla cadeia é duplicado (Bustin *et al.*, 2005; Kitane *et al.*, 2021; Sheikhzadeh *et al.*, 2020; Stephenson *et al.*, 2021; Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021).

A grande vantagem desta técnica, é que a detecção dos produtos amplificados ocorre à medida que estes são sintetizados, o que nos permite monitorizar, em tempo real, a nossa reação.

Interpretação de um caso positivo de infeção por SARS-CoV-2

Após término da RT-PCR em tempo real, analisam-se as curvas de amplificação do controlo positivo, do controlo negativo, do controlo interno e das amostras. É um processo que requer a análise e a interpretação individuais, de todas as curvas de amplificação (controlos e amostras).

COVID-19 Kit Detailed Sample Report

Batch ID	2021-05-10_172023
Batch QC Status	Pass
Software Version	COVID-19 Interpretive Software 2.5
Date & Time of Report	05-11-2021 10:22:43

Quality Control Samples

Sample Name	Status	Interpretive Result	Action*
CN	VALID	NA	REPORT
PC	VALID	NA	REPORT

Sample Result

Sample Name	Status	Interpretive Result	Action*
52SE18139	VALID	Positive SARS-CoV-2	REPORT

*See COVID-19 Kit IFU for reporting activities.

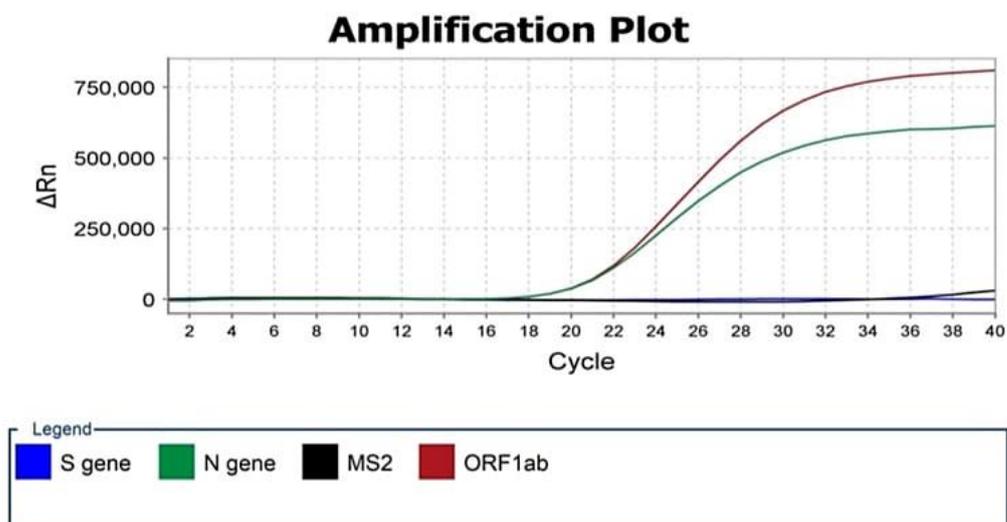


Figura 16 – Amostra positiva para SARS-CoV-2 identificado por RT-PCR em tempo real.

Usando a Figura 16 como exemplo, chegamos à conclusão que a partir do ciclo 18, foi possível detetar fluorescência. O ciclo 18, corresponde assim ao *cycle threshold* (CT), momento a partir do qual a intensidade de fluorescência ultrapassa o seu nível basal e pode ser detetada e quantificada. A reação tem um número máximo de 40 ciclos, representados no eixo das abcissas. Um CT mais baixo, é indicativo de uma carga viral mais elevada, uma vez que foram necessários menos ciclos de amplificação para se obter uma intensidade de fluorescência detetável. Em raciocínio inverso, um CT mais alto, sugere uma carga viral na amostra menor. A intensidade de fluorescência, está representada no eixo das ordenadas (Rao *et al.*, 2020; Tom e Mina, 2020).

Pela análise do gráfico de amplificação, constatamos a presença dos genes da proteína da nucleocápside (N) e do ORF1a/b na amostra de exsudado nasofaríngeo, pelo que há

evidência laboratorial de infecção por SARS-CoV-2. Não houve amplificação do gene que codifica a proteína *spike* (S). O gene MS2 funciona como controlo interno (Kumar *et al.*, 2020).

Qualquer pessoa pode deslocar-se ao laboratório para realizar um teste molecular à COVID-19, com ou sem marcação prévia, apresentando uma requisição do Sistema Nacional de Saúde, ou de índole particular. As colheitas devem ser efectadas até às 17h, sendo que o laboratório se compromete a enviar por correio eletrónico o resultado do teste molecular até às 21h do próprio dia. Todos os resultados positivos e negativos são notificados na plataforma SINAVElab (Direção-Geral da Saúde, 2022).

6. Casos Clínicos

6.1. Caso Clínico I

Homem de 28 anos colheu uma amostra de sangue total para se realizar um hemograma. O autoanalisador indicou a presença de macroplaquetas e não efetuou uma contagem de plaquetas totalmente eficaz. Os resultados foram os seguintes:

Plaquetas totais: 175.000/mm³ (Valores de referência: 150.000 a 410.000)

PDW: 24,2 fL (Valores de referência: 11,0 a 18,0)

Perante estes resultados analíticos, decidiu-se realizar um esfregaço de sangue periférico desta amostra e confirmar a presença de macroplaquetas e avaliar a ocorrência de agregação plaquetar. Após coloração do esfregaço sanguíneo, observou-se o seguinte ao microscópio ótico na objetiva de 40×:

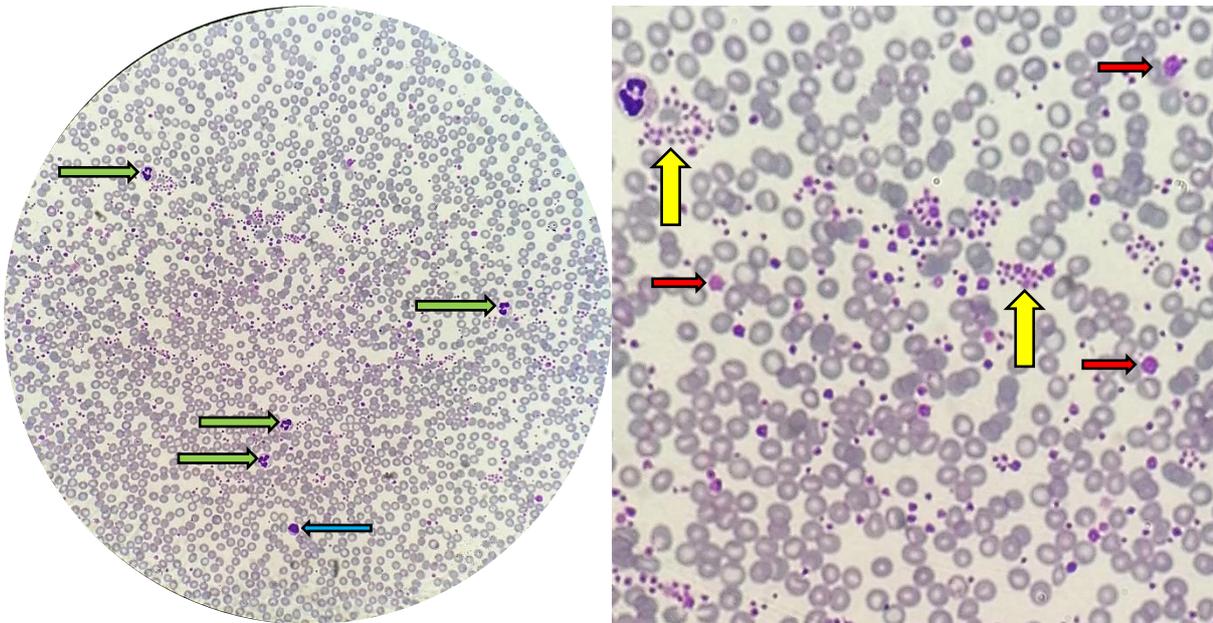


Figura 17 – Esfregaço de sangue periférico evidenciando a presença de macroplaquetas e agregados plaquetários.

Discussão: É possível observar macroplaquetas (setas vermelhas), assim como a presença de agregados plaquetários (setas amarelas). Considerando que o número de plaquetas se encontra dentro dos valores de referência, sem evidência laboratorial de trombocitopenia, estes agregados plaquetários podem resultar de uma colheita de sangue traumática, em que houve uma lesão mais acentuada do vaso sanguíneo. Esta anisocitose plaquetaria, sugerida pelo valor aumentado do PDW, bem como a presença de agregados, sugere ainda que a contagem total de plaquetas se encontra por defeito. É possível identificar na imagem mais à esquerda 4 neutrófilos (setas verdes) e 1 linfócito (seta azul).

6.2. Caso Clínico 2

Mulher de 81 anos, dirigiu-se ao laboratório para realizar um hemograma:

Eritrócitos: **6.210.000**/mm³ (Valores de referência: 3.800.000 a 4.800.000)

Concentração de hemoglobina: **12,0** g/dl (Valores de referência: 12,0 g/dl a 15,0 g/dl)

VCM: **59,6** fL (Valores de referência: 83,0 fL a 101,0 fL)

HCM: **19,3** pg (Valores de referência: 27,0 pg a 33,0 pg)

RDW: **19,1**% (Valores de referência: 11,0% a 14,0%)

Tendo em conta os resultados laboratoriais do hemograma, preparou-se um esfregaço de sangue periférico desta amostra, cujas observações microscópicas foram as seguintes:

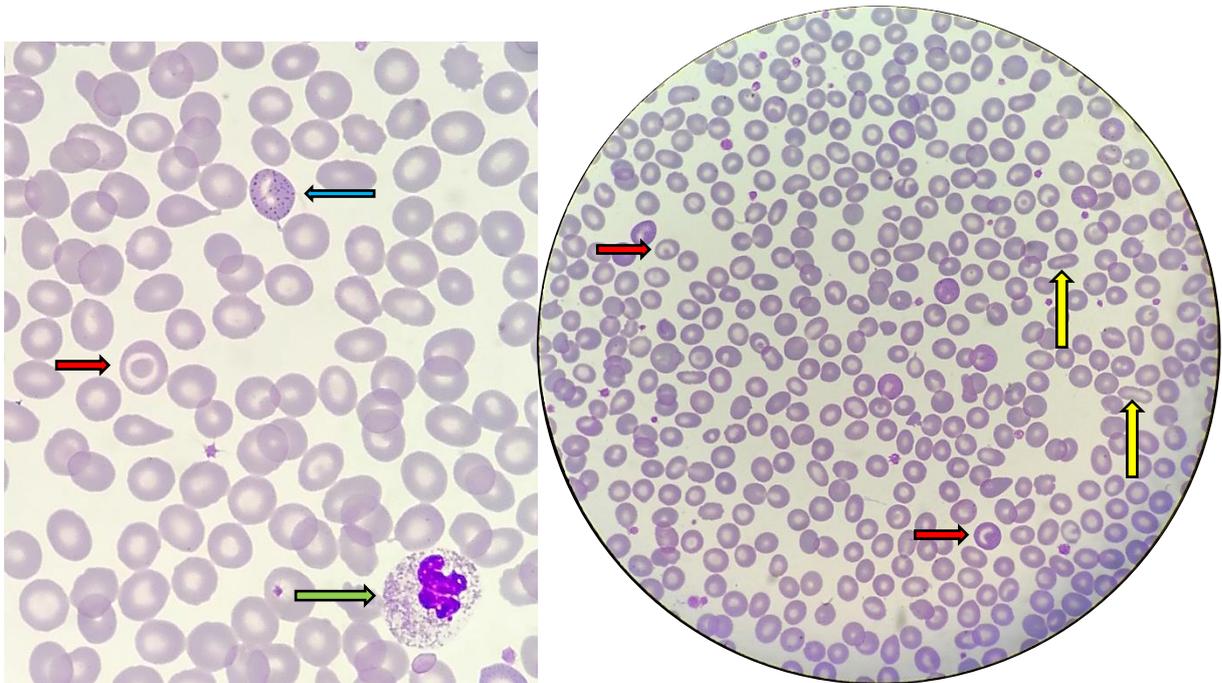


Figura 18 – Esfregaço de sangue periférico evidenciando eritrócitos com ponteados basófilos, algumas células em alvo, algumas células em charuto e poiquilocitose.

Discussão: Em função da concentração de hemoglobina, podemos concluir que a utente não tem anemia. Evidencia uma eritrocitose ligeira, confirmada pelo aumento do número de glóbulos vermelhos. O autoanalisador alertou para uma hipocromia e microcitose acentuadas, o que não me parece o caso, observando microscopicamente o esfregaço de sangue. As hemácias apresentam uma anisocitose e poiquilocitose, sendo que a anisocitose eritrocitária é reforçada com o aumento do RDW e a poiquilocitose deve-se ao facto dos glóbulos vermelhos desta amostra assumirem várias formas distintas. Destas formas podemos destacar a presença de algumas células em alvo (setas vermelhas) e de algumas células em charuto (setas amarelas). É também possível observar eritrócitos com ponteados basófilos (seta azul). Este fenómeno resulta de uma acumulação de ribossomas. Este conjunto de achados laboratoriais como a eritrocitose, as células em alvo e o ponteados basófilos, podem ser resultantes da presença de uma talassémia (Prieto Valtueña e Yuste Ara, 2015). Para se confirmar este diagnóstico, poderia ser feita uma electroforese das hemoglobinas. Na imagem mais à esquerda observa-se um neutrófilo (seta verde).

Conclusão

Considero que tive uma experiência pessoal e profissional muito positiva enquanto estagiário no laboratório de análises clínicas da Affidea, na minha terra natal. O facto de já ter tido a oportunidade de aqui estagiar no verão de 2019, tornou o processo de adaptação e integração muito mais fáceis para mim numa altura difícil a meu nível pessoal. Em 2019 tinha ficado com uma impressão muito boa de todos os profissionais do laboratório e hoje, sinto que os levo no coração mesmo que os nossos caminhos nunca mais se cruzem.

São pessoas e profissionais de muito valor, que me fizeram sentir por completo parte da equipa. Além da amizade e de todas as dicas e ensinamentos que me foram dando, aquilo que mais apreciei foi a confiança e a autonomia que me deram em ambiente de trabalho. Desde a receção e triagem das amostras, passando pela execução de técnicas e procedimentos como a serologia, as uroculturas, culturas de exsudados, espermocultura, coproculturas, observação e avaliação de esfregaços sanguíneos, introdução de resultados e participar nas metodologias de biologia molecular. Tive a sorte de poder fazer tudo isto sozinho sentindo-me sempre acompanhado e orientado. Foi um estágio pouco observacional e muito prático, onde aprendi muito, ganhei bases e motivação para iniciar a minha vida profissional da melhor maneira, onde ambiciono chegar o mais longe possível tendo sempre a noção das minhas capacidades e limitações numa área onde a aquisição de conhecimentos é contínua e fundamental para se continuar a evoluir. Não me irei esquecer da hora do chá nem das pessoas com quem tive o gosto de trabalhar durante o meu estágio. Numa altura difícil a nível pessoal, onde nada parece totalmente normal devido à pandemia que vivemos, consegui sentir-me feliz e motivado.

Em condições normais sinto que poderia ter dado mais de mim, no entanto considero-me satisfeito e tenho orgulho no meu percurso como estagiário. Dadas as circunstâncias sei que dei o meu melhor e resta-me agradecer em especial à minha namorada, à minha mãe e restante família, à equipa da Affidea Castelo Branco e à Professora Doutora Ana Miguel.

Referências Bibliográficas

- AFFIDEA PORTUGAL - **Sobre a Affidea** [Consult. 27 jan. 2022]. Disponível em: <https://affidea.pt/sobre/#sobre>
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. - Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. **Diabetic Medicine**. 15:7 (1998) 539–553.
- ANJOS, Adriana R. Dos; ALVARES-SILVA, Márcio; BORELLI, Primavera - Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 22:3 (2000) 404–412.
- ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA CONTRA A LEUCEMIA - **Medula Óssea e Hematopoiese** atual. 2017. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/medula-ossea-e-hematopoiese>
- BANFI, Giuseppe; SALVAGNO, Gian Luca; LIPPI, Giuseppe - The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**. 45:5 (2007) 565–576.
- BERTOLINI, Giovanna - The Exocrine Pancreas. Em **Body MDCT in Small Animals** 1ª ed. Cham : Springer International Publishing, 2017 Disponível em :http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46904-1_8 ISBN 978-3-319-46904-1. p. 183–197.
- BOOPATHI, Subramanian; POMA, Adolfo B.; KOLANDAIVEL, Ponmalai - Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. 39:9 (2021) 3409–3418.
- BRAGANZA, Joan M. *et al.* - Chronic pancreatitis. **The Lancet**. 377:9772 (2011) 1184–1197.
- BRAUNSTEIN, Evan M. - **Produção de eritrócitos** atual. 2020. [Consult. 2 fev. 2022]. Disponível em: [www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/abordagem-ao-paciente-com-anemia/produção-de-eritrócitos](http://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/abordagem-ao-paciente-com-anemia/producao-de-eritrocitos)
- BRIMIL, Nadia *et al.* - Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany. **International Journal of Medical Microbiology**. 296:1 (2006) 39–44.
- BURTIS, Carl; BRUNS, David - **Tietz Fundamentos de QUÍMICA CLÍNICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR**. 7ª ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2016. ISBN 978-85-352-8166-8.
- BUSSLINGER, Meinrad; NUTT, Stephen L.; ROLINK, Antonius G. - Lineage commitment in lymphopoiesis. **Current Opinion in Immunology**. 12:2 (2000) 151–158.

BUSTIN, S. A. *et al.* - Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**. 34:3 (2005) 597–601.

CEVIK, Muge *et al.* - Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **BMJ**. 371:m3862 (2020).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - **GP4I: Collection of diagnostic venous blood specimens**. 7^a ed. Wayne : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. ISBN 1-56238-813-4.

COWLAND, Jack Bernard; BORREGAARD, Niels - Granulopoiesis and granules of human neutrophils. **Immunological Reviews**. 273:1 (2016) 11–28.

DEAN, Laura - Chapter 5: The ABO blood group. Em **Blood Groups and Red Cell Antigens** 1^a ed. Bethesda : National Center for Biotechnology Information (US), 2005
Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 008/2012: Diagnóstico e Tratamento da Infecção do Trato Urinário em Idade Pediátrica** atual. 2012. [Consult. 25 jan. 2022].
Disponível em: www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf.

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 037/2011: Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco** atual. 2013. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em:
www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0372011-de-30092011-jpg.aspx

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 019/2020: COVID-19: Estratégia Nacional de Testes para SARS-CoV-2** atual. 2022. [Consult. 2 fev. 2022]. Disponível em:
www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0192020-de-26102020-pdf.aspx

DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE - **Orientação 015-2020 - COVID-19: Diagnóstico Laboratorial** atual. 2020. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em: www.spmi.pt/wp-content/uploads/2020/04/DGS-Orientação-diagnóstica-laboratorial.pdf

DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Norma nº 003/2011: Saúde Reprodutiva Infertilidade** atual. 2011. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em:
www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf

DZIERZAK, Elaine; PHILIPSEN, Sjaak - Erythropoiesis: Development and Differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 3:4 (2013) a011601–a011601.

EBELING, Wolfgang *et al.* - Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **European Journal**

of **Biochemistry**. 47:1 (1974) 91–97.

FARON, Matthew L. *et al.* - Evaluation of WASPLab Software To Automatically Read chromID CPS Elite Agar for Reporting of Urine Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. 58:1 (2019) 1–9.

FINCO, Delmar R. - Chapter 17 - Kidney Function. Em **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5^a ed. San Diego : Academic Press, 1997. ISBN 978-0-12-396305-5. p. 441–484.

GEISSMANN, Frederic *et al.* - Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**. 327:5966 (2010) 656–661.

GENOUD, Valeria *et al.* - Extraction-free protocol combining proteinase K and heat inactivation for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. **PLoS ONE**. 16:2 (2021) e0247792.

GROOPMAN, Jerome E.; MOLINA, Jean-Michel; SCADDEN, David T. - Hematopoietic Growth Factors. **New England Journal of Medicine**. 321:21 (1989) 1449–1459.

HAMIDI, Mehrdad; TAJERZADEH, Hosnieh - Carrier Erythrocytes: An Overview. **Drug Delivery**. . ISSN 1071-7544. 10:1 (2003) 9–20.

HAMM, Christian W. *et al.* - Emergency Room Triage of Patients with Acute Chest Pain by Means of Rapid Testing for Cardiac Troponin T or Troponin I. **New England Journal of Medicine**. 337:23 (1997) 1648–1653.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. - A developmental switch in B lymphopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 88:24 (1991) 11550–11554.

HOSOI, Eiji - Biological and clinical aspects of ABO blood group system. **Journal of Medical Investigation**. 55:. (2008) 174–182.

IWASAKI, H.; AKASHI, K. - Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. **Oncogene**. 26:47 (2007) 6687–6696.

JOAQUIM CHAVES SAÚDE - **Hematologia** [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em: www.jcs.pt/pt/outras_especialidades/ver/26

KAUSHANSKY, Kenneth - The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **Journal of Clinical Investigation**. 115:12 (2005) 3339–3347.

KAUSHANSKY, Kenneth - Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. **New England Journal of Medicine**. 354:19 (2006) 2034–2045.

KEOHANE, Elaine M.; OTTO, Catherine N.; WALENGA, Jeanine M. - **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 6^a ed. St. Louis : Elsevier, 2019. ISBN

9780323530453.

KITANE, Driss Lahlou *et al.* - A simple and fast spectroscopy-based technique for Covid-19 diagnosis. **Scientific Reports**. 11:1 (2021) 1–11.

KLEIN, Steffen *et al.* - SARS-CoV-2 RNA extraction using magnetic beads for rapid large-scale testing by RT-qPCR and RT-LAMP. **Viruses**. 12:8 (2020).

KOCZULA, Katarzyna M.; GALLOTTA, Andrea - Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**. 60:. (2016) 111–120.

KUMAR, Manish *et al.* - First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. **Science of the Total Environment**. 746:141326 (2020).

LEE, Adrian Y. S. *et al.* - Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. **British Journal of Hospital Medicine**. 78:2 (2017) C18–C20.

LI, Fang - Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**. 3:1 (2016) 237–261.

LUDWIG, Stephan; ZARBOCK, Alexander - Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. **Anesthesia & Analgesia**. 131:1 (2020) 93–96.

MAHALINGAIAH, Prathap Kumar; PALENSKI, Tammy; VLEET, Terry R. VAN - An In Vitro Model of Hematotoxicity: Differentiation of Bone Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells into Hematopoietic Lineages and Evaluation of Lineage-Specific Hematotoxicity. **Current Protocols in Toxicology**. 76:1 (2018).

MANZ, Markus G.; BOETTCHER, Steffen - Emergency granulopoiesis. **Nature Reviews Immunology**. 14:5 (2014) 302–314.

MERINO, Pedro Luis Herrera - Developmental Biology of the Pancreas. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 40:3S (2004) 127–142.

MORALEDA JIMÉNEZ, José María - **Pregado de Hematología**. 4^a ed. Madrid : LUZÁN 5, 2017. ISBN 978-84-7989-874-8.

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

NI, Wentao *et al.* - Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Critical Care**. 24:1 (2020) 422.

NORRIS, J. W. *et al.* - Serum cardiac enzymes in stroke. **Stroke**. 10:5 (1979) 548–553.

OZOUGWU, Jervas; OZOUGWU, Jervas C. - Physiology of the liver Cite this paper Physiology of the liver. **International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences**. 4:18 (2017) 13.

PATTERSON, Maria Jevitz - Chapter 13: Streptococcus. Em BARON, SAMUEL (Ed.) - **Medical Microbiology** 4^a ed. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996 Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/?fbclid=IwAR2KWdI5e8zsCuow4I-p6EPY3eAQsSSMd_HDVQWzrSs4J_f6Kwr67Q_D_v8

PEREZ-PUJOL, Silvia; ARAS, Omer; ESCOLAR, Gines - Factor V Leiden and Inflammation. **Thrombosis**. 2012:594986 (2012) 1–10.

PRIETO VALTUEÑA, Jesús; YUSTE ARA, José - **Balcells. La clínica y el laboratorio**. 23^a ed. Barcelona : Elsevier, 2015. ISBN 978-84-9113-524-1.

QRIQUET, Zidane *et al.* - Monoclonal Antibodies Application in Lateral Flow Immunochromatographic Assays for Drugs of Abuse Detection. **Molecules**. 26:4 (2021) 1058.

RAO, Sonia N. *et al.* - A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. **Infectious Diseases and Therapy**. 9:3 (2020) 573–586.

SAKKA, Samir G. - Assessing liver function. **Current Opinion in Critical Care**. 13:2 (2007) 207–214.

SANS-SABRAFEN, Jordi; BESSES RAEBEL, Carlos; VIVES CORRONS, Juan Lluís - **Hematología Clínica**. 4^a ed. Madrid : Harcourt, 2002. ISBN 8481744859.

SANTOS, Igor De Andrade *et al.* - Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? **Frontiers in Microbiology**. 11:1818 (2020).

SEGEL, George B.; LICHTMAN, Marshall A. - Direct antiglobulin (“Coombs”) test-negative autoimmune hemolytic anemia: A review. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. 52:4 (2014) 152–160.

SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE - **COVID-19** atual. 2021. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em: www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/?fbclid=IwAR0_z1nn_Ky7x3Mtgwh5uukQXjluQOP4qRezUeE2LdfNM6e4cOrOLYUyrQo#sec-0

SHEIKHZADEH, Elham *et al.* - Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. **Talanta**. 220:121392 (2020).

SIEMENS HEALTHCARE - **CLINITEST® Rapid COVID-19 Antigen Test**, atual. 2021. [Consult. 25 jan. 2022]. Disponível em: www.siemens-healthineers.com/pt/point-of-care-testing/covid-19-testing/covid-19-tests/clinitest-covid-19-antigen-test

STEPHENSON, Patrick *et al.* - Validation of the Thermo Scientific™ SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Workflow for the Detection of SARS-CoV-2 from Stainless-Steel Environmental Surface Swabs: AOAC Performance Tested Method SM 012103. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. 104:4 (2021) 935–947.

TENG, Ming *et al.* - Survival of Patients Undergoing Hemodialysis with Paricalcitol or Calcitriol Therapy. **New England Journal of Medicine**. 349:5 (2003) 446–456.

TOM, Michael R.; MINA, Michael J. - To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. **Clinical Infectious Diseases**. 71:16 (2020) 2252–2254.

UC, Aliye; FISHMAN, Douglas S. - Pancreatic Disorders. **Pediatric Clinics of North America**. 64:3 (2017) 685–706.

WHITCOMB, David C. - Acute Pancreatitis. **New England Journal of Medicine**. 354:20 (2006) 2142–2150.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Coronavirus disease (COVID-19)**, atual. 2021. [Consult. 3 fev. 2022]. Disponível em: www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?** atual. 2021. [Consult. 27 jan. 2022]. Disponível em: www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted?fbclid=IwAR0dkybXQgYcgmm0NG55BEXtGc97fDK0bT6-dlKgPvchobW38jPXS6e3BRg

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Timeline: WHO's COVID-19 response** atual. 2022. [Consult. 27 jan. 2022]. Disponível em: www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline?fbclid=IwAR2-5SmKtlbMCT2ZmoUKQ7EIUPIM4NVTkaiM7cPfbCEA3cG880DtSFkGHnA#

WORONZOFF-DASHKOFF, Kristine Krafts - The Wright-Giemsa stain: Secrets revealed. **Clinics in Laboratory Medicine**. 22:1 (2002) 15–23.

YARBROUGH, Melanie L. *et al.* - Culture of Urine Specimens by Use of chromID CPS Elite Medium Can Expedite Escherichia coli Identification and Reduce Hands-On Time in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. 54:11 (2016) 2767–2773.

YÜCE, Meral; FILIZTEKIN, Elif; ÖZKAYA, Korin Gasia - COVID-19 diagnosis —A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**. 172:112752 (2021).

ZARANDONA, J. Manuel; YAZER, Mark H. - The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. **CMAJ**. 174:3 (2006) 305–307.