



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Mota Soares

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo Dr. Paulo Vieira e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

Inês Mota Soares

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo Dr. Paulo Vieira e
apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, pois a pessoa que sou hoje e todas as oportunidades que tive se deveram ao seu esforço, dedicação e amor.

Em segundo lugar agradeço à minha avó Isabel que, apesar de todos os anos que nos separam, ser a pessoa mais bonita, compreensiva e ouvinte.

A toda a minha família, avós, padrinhos, tios e primo, por todas as palavras de incentivo, carinho e preocupação.

Ao LAC-Gaia por me ter permitido a realização de parte do meu estágio no seu laboratório e nomeadamente à Dra. Ana Paula Silva por tudo o que me ensinou, toda a disponibilidade e simpatia, e ao Dr. Paulo Vieira pelo apoio e ajuda na elaboração deste presente relatório. À D. Paula Cristina por toda a força e sorrisos, mesmo quando a vida demonstra o contrário.

A todas as pessoas que conheci no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, por me terem acolhido tão bem. À Miranda pela simpatia, disponibilidade e por todo o conhecimento transmitido. À minha equipa, Diogo, Inês, Raquel e Sofia por não terem sido apenas colegas, mas sim amigos. Obrigada por tudo o que me ensinaram, por toda a paciência e boa disposição.

À Professora Doutora Ana Miguel, coordenadora do Mestrado e minha orientadora, por toda a paciência, apoio, disponibilidade e orientação durante o período de estágio e elaboração deste relatório.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer em especial ao Nuno, por acreditar sempre mim, mesmo quando eu não o faço. Obrigada por todo o incentivo, força e ajuda. Obrigada por cada palavra, sorriso e carinho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMO	VII
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	I
I. LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DE VILA NOVA DE GAIA.....	3
I.1 - CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO.....	3
I.2 - FASE PRÉ-ANALÍTICA	4
I.3 - CONTROLO DA QUALIDADE.....	6
I.4 - FASE ANALÍTICA E PÓS ANALÍTICA	7
BIOQUÍMICA	7
IMUNOLOGIA	9
MICROBIOLOGIA.....	10
HEMATOLOGIA.....	11
a) Hemograma	14
b) Esfregaço sanguíneo.....	17
c) Contagem de reticulócitos.....	19
d) Provas de Coagulação	22
e) Velocidade de Sedimentação	28
f) Tipagem Sanguínea	29
II. LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (SETOR COVID-19)	31
II.1 - VIROLOGIA	31
SARS-CoV-2	32
II.2 - CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	37
II.3 - FASE PRÉ-ANALÍTICA	39
II.4 - CONTROLO DA QUALIDADE.....	40
II.5 - FASE ANALÍTICA.....	41
a) Detecção do genoma viral	41
b) Detecção serológica	48
II.6 - FASE PÓS-ANALÍTICA	50
CONCLUSÃO	51
BIBLIOGRAFIA.....	53
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Hierarquia de diferenciação hematopoiética	13
Figura 2 - Procedimento para preparação de um esfregaço sanguíneo.....	17
Figura 3 - Esfregaço sanguíneo dividido em três diferentes zonas com diferentes densidades celulares.....	17
Figura 4 - Observações realizadas ao microscópio ótico (100x) em esfregaços sanguíneos no LAC-Gaia.....	18
Figura 5 - Esfregaço para observação de reticulócitos (100x).	19
Figura 6 - Cascata da Coagulação	24
Figura 7 - Grupos sanguíneos do sistema ABO	29
Figura 8 - Avaliação laboratorial do grupo sanguíneo	29
Figura 9 - Desenvolvimento da Doença Hemolítica do Recém-Nascido.....	30
Figura 10 - Imagem de microscopia eletrónica de coronavírus	33
Figura 11 - Esquema da constituição de um coronavírus	33
Figura 12 - Kit de colheita	40
Figura 13 - Parâmetros de um gráfico simplificado de PCR em tempo real	45
Figura 14 - Métodos de deteção do SARS-CoV-2 ao longo da evolução da infeção.	48
Figura 15 - Falha do controlo interno.....	63
Figura 16 - Falha do controlo interno - gráfico com escala logarítmica.....	63
Figura 17 - Controlo positivo	64
Figura 18 - Controlo positivo - gráfico com escala logarítmica.	64
Figura 19 - Controlo negativo	65
Figura 20 - Controlo negativo - gráfico com escala logarítmica.	65
Figura 21 - Curva esperada da água.....	66
Figura 22 - Curva esperada da água - gráfico com escala logarítmica.....	66
Figura 23 - Resultado negativo.....	67
Figura 24 - Resultado negativo - gráfico com escala logarítmica.....	67
Figura 25 - Resultado positivo com $C_t=12,76$	68
Figura 26 - Resultado positivo com $C_t=12,76$ - gráfico com escala logarítmica.	68
Figura 27 - Resultado inconclusivo devido a curva com padrão atípico.....	69
Figura 28 - Resultado inconclusivo devido a curva com padrão atípico - gráfico com escala logarítmica.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras recebidas no laboratório e seu respectivo recipiente de colheita.	5
Tabela 2 - Analitos bioquímicos avaliados no aparelho <i>Cobas Integra 400 plus</i>	8
Tabela 3 - Classificação morfológica dos diferentes tipos de anemia.....	20
Tabela 4 - Diagnóstico laboratorial dos diferentes tipos de anemia.....	21
Tabela 5 - Moléculas segregadas pelo endotélio vascular com importância na hemostase.....	23
Tabela 6 - Algumas causas possíveis que causam Hemorragia e Trombose.....	25

ABREVIATURAS

ACE2	Enzima de Conversora da Angiotensina 2
ADP	Adenosina difosfato
AEFA	Asociación Española del Laboratorio Clínico
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMBAR	Anàlises Médiqes Barcelona
ARSC	Administração Regional de Saúde do Centro
AST	Aspartato Aminotransferase
BSL	Nível de Biossegurança
Ca ²⁺	Ião Cálcio
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
CK	Creatina Cinase
CLED	Gelose cistina-lactose com défice de eletrólitos
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CPS	Gelose ChromID Cps Elite
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CRP	Proteína C Reativa
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleico cadeia dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FvW	Fator de <i>Von Willebrand</i>
FT	Fator tecidual
GGT	Gamaglutamil transferase

h	Horas
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Ht	Hematócrito
Ig	Imunoglobulina
INR	Razão Normalizada International
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPO	Instituto Português de Oncologia
ISI	Índice Internacional de Sensibilidade
ISO	Organização Internacional de Padronização
LAC-GAIA	Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MERS-CoV	Síndrome Respiratório do Médio Oriente - Coronavírus
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pH	Potencial de Hidrogénio
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
PTH	Hormona Paratiroideia
qRT-PCR	PCR em tempo real com Transcriptase Reversa
RBC	Eritrócitos
RDW	Distribuição do diâmetro dos eritrócitos
Rh	Rhesus
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SARS-CoV 2	Síndrome Agudo Respiratório Severo - Coronavirus 2
SEQC	Sociedad Española de Medicina de Laboratorio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
SS	Meio de <i>Salmonella-Shigella</i>

ssDNA	Ácido Desoxirribonucleico de cadeia simples
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TFPI	Inibidor do Fator Tecidual
Th	<i>Threshold line</i>
TIBC	Capacidade total de ligação de ferro à transferrina
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
TP	Tempo de Protrombina
t-PA	Ativador do Plasminogénio Tecidual
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
VAP	Proteína de Adsorção Viral
VCM	Volume Corpuscular Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
WBC	Leucócitos

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo a descrição das principais atividades desenvolvidas durante o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu em dois laboratórios distintos, Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia e no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19). Este relatório inclui uma abordagem geral de cada local de estágio, bem como dos procedimentos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos.

As principais valências desenvolvidas neste relatório são a Hematologia e a Virologia, sendo esta dedicada ao estudo e diagnóstico do *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

Palavras-chave: Análises Clínicas; Diagnóstico; Hematologia; Virologia; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

This report aims to describe the main activities developed during the curricular internship in the master's degree in Clinical Analysis from Pharmacy's Faculty of Universidade de Coimbra. The internship took place in two separate laboratories, Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia (LAC-Gaia) and in the Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (COVID-19 sector). This report includes a general approach to each laboratory, as well as pre-analytical, analytical, and post-analytical procedures.

The main valences developed in this report are hematology and virology, which are dedicated to the study and diagnosis of *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

Keywords: Clinical Analysis; Diagnostic; Hematology; Virology; SARS-CoV-2.

INTRODUÇÃO

As Análises Clínicas adquiriram ao longo do tempo um papel preponderante e essencial para a prevenção, controlo, diagnóstico, monitorização e tratamento de patologias diversas. O estudo dos diferentes produtos biológicos processados num laboratório de Análises Clínicas integra especialidades como a Hematologia, a Microbiologia, a Bioquímica e a Imunologia. Apesar de valências distintas, a valorização dos diferentes analitos numa abordagem transversal e integrada, contribui para uma melhor compreensão da patofisiologia humana.

A atual situação pandémica, além de novos desafios, impactos socioeconómicos e autodisciplina, enfatizou ainda mais o papel fulcral do laboratório na toma de decisões clínicas. O mundo começou a notar a importância de um laboratório de diagnóstico e neste pressuposto, a busca pela obtenção de resultados cada vez mais exatos, precisos e rápidos continuam a ser o principal motor para a contínua melhoria do laboratório, tanto do seu equipamento como da formação dos seus profissionais.

A automatização é cada vez mais expressiva, mas não tornou menos necessária a existência de pessoal extremamente competente e qualificado para processar amostras, controlar técnicas, equipamentos e interpretar e validar resultados. A existência de programas de controlo de qualidade internos e externos asseguram a qualidade dos resultados emitidos.

Ser munido de um forte sentido crítico e procurar fazer sempre mais e melhor são características fulcrais para enfrentar os desafios que este tipo de laboratório nos pode apresentar.

A realização deste tipo de estágio curricular no 2ºano do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) pretende, não só a consolidação dos conhecimentos teóricos abordados no 1ºano, bem como o ganho de prática laboratorial. O estágio foi realizado em dois laboratórios distintos, tendo iniciado pelo Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia (LAC-Gaia) de dezembro de 2019 a março de 2020 e terminado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19) de julho de 2020 a agosto de 2020.

No presente relatório irei abordar a caracterização dos laboratórios, o controlo de qualidade e as quatro valências principais das Análises Clínicas. A Bioquímica e Imunologia serão descritas sucintamente, enquanto que a Hematologia e a Microbiologia, nomeadamente a Virologia serão apresentadas com maior pormenor. Os conteúdos apresentados nas áreas

de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia estão relacionados ao estágio realizado no LAC-Gaia. A Virologia contempla a parte final do estágio que foi exclusivamente dedicada ao estudo e diagnóstico do novo coronavírus, cientificamente designado como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*.

I. Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia

I.1 - CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

i. Considerações gerais

O Laboratório de Análises Clínicas de Vila Nova de Gaia (LAC-Gaia) é um laboratório de comunidade certificado pela norma ISO 9001, com sede e laboratório central no centro de Vila Nova de Gaia. Dispõe de treze postos de colheita: Airões, Arcozelo, Avintes 1 e 2, Felgueiras, Foz do Sousa, Laboratório central, Gaia 2, Moure, Oliveira do Douro - Associação Oliveirense, Oliveira do Douro - Centro médico MgMadureira, Torrados e Vilar de Andorinho. Além da operação nestas instalações, realiza colheitas ao domicílio e em lares e presta apoio a empresas no âmbito da medicina do trabalho.

O laboratório central está aberto de segunda a sexta feira das 7h30 às 18h30 e sábado das 8h30 às 12h.

A direção do laboratório pertence à Dra. Albina Filomena Marques (Diretora Técnica) e ao Eng.º Albino Marques (Diretor Administrativo).

Como laboratório de comunidade, é movido por uma missão de proximidade, assumindo um compromisso de eficácia, qualidade e satisfação dos utentes, sendo estes os princípios que regem o trabalho de todos os funcionários no seu dia a dia.

ii. Organização laboratorial

O laboratório é dividido em receção, sala de colheita, gabinete de direção, espaço de triagem, setor da bioquímica e imunologia, setor de microbiologia, setor de hematologia, zona de lavagens, sala de reuniões e sala polivalente.

A automatização do laboratório é evidente, sendo a maioria dos parâmetros analíticos realizados em equipamentos devidamente certificados, calibrados e controlados por controlos internos devidamente certificados pelos fabricantes e através da participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade Laboratorial nacionais e internacionais. A existência de um manual de qualidade, segurança, pré-análise, análise e pós-análise permite a consulta facilitada de métodos de trabalho, organização e da gestão laboratorial.

A média de amostras diárias recebidas no laboratório situa-se entre 70 e 80.

iii. Gestão laboratorial

No fim de cada dia de trabalho, as amostras são guardadas para eventual necessidade de repetição de análises ou seu acréscimo de pedido. Os soros são criopreservados por nove meses, os sangues totais por uma semana e os plasmas são descartados no próprio dia. No caso das urinas, fezes e outros produtos biológicos são conservados até à emissão de resultado.

Quanto à gestão dos lixos, estes são recolhidos e separados diariamente. O lixo de Grupo IV (Resíduos específicos) é armazenado em contentores amarelos com o símbolo de risco biológico. O lixo de Grupo III (Resíduos de risco biológico) é armazenado em contentores pretos. Estes dois grupos são acondicionados numa zona específica e recolhidos semanalmente por uma empresa especializada em transporte de resíduos perigosos. O Grupo II (Resíduos não perigosos) e Grupo I (Resíduos equiparados a urbanos) são colocados em caixotes do lixo normais e tratados como tal. O material de vidro é lavável e reutilizável e o material de plástico é de uso único.

I.2 - FASE PRÉ-ANALÍTICA

Todo o processo inicia-se quando o utente apresenta a requisição de análises na receção do laboratório. É obrigação do laboratório dar informação sobre as análises requeridas e formas específicas de colheita, quando estas são realizadas pelo utente, assim como dar conhecimento da eventual necessidade de jejum, quando os analitos a analisar assim o exigem. Após verificação do cumprimento desses requisitos prévios, o utente e as amostras recebem um número de identificação único. Após inserção informática dos dados da pessoa e análises solicitadas, é emitido um talão de levantamento dos resultados com a data a partir da qual o utente poderá levantar as suas análises. A punção venosa é efetuada por uma pessoa qualificada (especialista em análises clínicas, técnico de análises clínicas ou enfermeiro) e com formação específica no sistema de colheitas usado no laboratório. Os tubos/contentores com as amostras colhidas no laboratório e as amostras colhidas pela própria pessoa seguem para triagem e são divididos pelas valências a que pertencem (Tabela I), com posterior processamento, dependente do tipo de amostra em causa. No caso dos postos de colheita, o transporte das amostras para o laboratório central deve ser o mais rápido possível, sem exposição à luz e de modo refrigerado, para não comprometer a estabilidade das amostras biológicas.

Tabela 1 - Amostras recebidas no laboratório e seu respectivo recipiente de colheita.

Amostras	Contentor	Análise
Soro	Tubo com ativador de coágulo e gel separador 	Bioquímica/Imunologia
Sangue total	Tubo com EDTA 	Hematologia, HbA1c e PTH
Plasma	Tubo com citrato de sódio 1:9 	Provas de coagulação
Sangue total	Tubo com citrato sódio 1:4 	Velocidade de sedimentação
Urina	Contentor para urina 	Bioquímica/Microbiologia/Albumina de baixa concentração na urina
Urina 24h	Contentor para urina 	Albumina de baixa concentração na urina
Fezes	Contentor para fezes 	Imunologia/Microbiologia
Outros produtos biológicos (expetoração, exsudados vaginais)	Contentor próprio/Meio adequado/Zaragatoa 	Microbiologia

Durante a triagem das amostras, é de salientar a importância da observação destas, para se concluir a sua aceitação ou rejeição. Critérios de rejeição de amostras são hemólise, amostra coagulada, volume incorreto, tubo incorreto para a análise solicitada e amostra sem identificação. A atenção e cuidado na parte pré-analítica são de extrema importância, pois a maior percentagem de erros laboratoriais acontece nesta fase (46-68%)(1).

As análises requisitadas que não se realizem neste laboratório são enviadas para um laboratório externo: *AMBAR (Anàlisis Mèdiques Barcelona)*.

I.3 - CONTROLO DA QUALIDADE

i. Controlos

Nos laboratórios de Análises Clínicas o controlo da qualidade assume extrema importância, pois a obtenção de resultados fiáveis, fidedignos e rigorosos é a principal busca de todos os laboratórios. Para isso é necessário haver normas implementadas para controlar a qualidade. A participação em programas de controlo da qualidade interno e externo são fundamentais para este processo.

A. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O Controlo de Qualidade Interno é feito diariamente no laboratório, com o objetivo de assegurar a precisão dos resultados. Recorre ao uso de uma amostra de controlo com uma composição definida qualitativa e quantitativamente adaptada aos métodos usados. Consoante a valência e aparelho utilizado, o tipo e frequência de controlo varia. Genericamente, no caso da valência de Bioquímica e Hematologia são feitos controlos diariamente, alternando entre controlo normal e controlo patológico; na Imunologia é feito com menos frequência, mas de acordo com as instruções do fabricante, recorrendo a controlo positivo e controlo negativo. Estes controlos vêm juntamente com os kits comerciais ou são comprados separadamente a outras empresas comerciais. No caso da Microbiologia, a esterilidade da solução salina (NaCl) usada na preparação da suspensão bacteriana é controlada quinzenalmente inoculando uma gota dessa solução numa placa com gelose de sangue, com posterior leitura após 24 e 48h.

B. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A avaliação externa da qualidade permite fazer uma análise retrospectiva do trabalho, possibilitando a evolução e melhoria dos resultados dados pelo laboratório. Tem por objetivo avaliar a exatidão dos resultados, sendo os controlos enviados por uma entidade externa ao laboratório.

Os controlos são enviados pela entidade externa *AEFA (Asociación Española del Laboratorio Clínico)*, *SEQC (Sociedad Española de Medicina de Laboratorio)* e *INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)* e são processados e analisados como uma amostra comum. A frequência deste tipo de controlo varia entre as valências. Após a saída do resultado, são enviados para a respetiva entidade. Os valores esperados dos controlos são posteriormente disponibilizados ao laboratório. A análises dos valores, o desvio entre o valor

dado e o valor esperado é averiguado pela diretora técnica e falado em conjunto com os técnicos responsáveis por essa análise. Sempre que necessário, procede-se a medidas corretivas, em busca sempre da obtenção de resultados cada vez mais exatos.

ii. Auditorias

A realização de auditorias tem por base a observação, análise do grau de cumprimento de um conjunto de requisitos permitindo obter um retrato do desempenho do Laboratório face a um referencial normativo. São realizadas uma auditoria interna geral e externa uma vez por ano. A auditoria interna é feita por um especialista em análises clínicas contratado pelo laboratório que sugere melhorias de natureza diversa, como técnica e organizacional, com vista à otimização dos diferentes processos, analíticos e de suporte, do Laboratório. A auditoria externa é realizada por uma empresa externa certificadora.

I.4 - FASE ANALÍTICA E PÓS ANALÍTICA

Na fase analítica as amostras são sujeitas ao processamento e posterior procedimento das análises, seja este manual ou automático. Após a saída de resultados, é feita uma validação analítica pelo técnico. A validação analítica consiste numa avaliação geral e de coerência de todos os valores obtidos em determinada análise, no correto controlo de qualidade interno e no bom funcionamento dos aparelhos.

Na fase pós-analítica, os resultados validados analiticamente seguem para validação biopatológica. O especialista em Análises Clínicas olha para os resultados como um todo, interpreta e relaciona, se possível, com o estado clínico e conclui sobre a concordância dos valores obtidos. Após esta validação é emitido o boletim de análises para o utente, seja em formato papel ou digital.

BIOQUÍMICA

A bioquímica é a ciência que se dedica ao estudo das vias metabólicas e sua fisiologia, sendo crucial a sua avaliação para percepção da homeostase corporal.

No LAC-GAIA esta valência é assegurada pelo aparelho *Cobas Integra 400 plus* para determinações sanguíneas e pelo *Urysis 2400* para determinações urinárias.

O controlo de qualidade nesta área assume extrema importância devido à forte automatização existente neste setor, sendo essencial para a fiabilidade dos resultados dados.

i. Cobas Integra 400 plus

A avaliação de parâmetros bioquímicos é das análises mais requisitadas, sendo por isso a área que recebe mais amostras por dia. Consoante o analito, as amostras usadas são na sua maioria o soro (obtido por centrifugação do tubo com gel separador de coágulo), sangue total e urina. Na Tabela 2 estão apresentados os analitos avaliados neste laboratório com a sua respetiva função e tipo de amostra utilizada.

Tabela 2 - Analitos bioquímicos avaliados no aparelho Cobas Integra 400 plus.

Função/Metabolismo	Analitos	Amostra
Hepático	AST, ALT, ALP, GGT, bilirrubina direta e bilirrubina total	Soro
Renal	Ácido úrico, ureia e creatinina	Soro
	Albumina de baixa concentração na urina	Urina ocasional ou urina 24h
	Clearance da creatinina	Urina 24h
	creatinina	Urina
Pancreático	Alfa-amilase e lipase	Soro
Lipídica	HDL, LDL, colesterol e triglicéridos	Soro
Glicémico	glicose	Soro
	HbA1c	Sangue total
	PTGO	Soro
Muscular	CK, LDH e lactato	Soro
Óssea e Mineral	Ferro, cálcio, magnésio e fosfato	Soro
Imunológico	IgA, IgG e IgM	Soro
Proteico	Proteína C reativa, albumina e transferrina	Soro
	Proteínas totais	Soro
Equilíbrio Hidroeletrólítico	Sódio, potássio e cloreto (ionograma)	Soro e urina

Os métodos de determinação usados por este aparelho baseiam-se na colorimetria e imunoturbidimetria, com posterior leitura por espectrofotometria. O ionograma recorre à potenciometria com uso de elétrodos seletivos de iões.

O controlo de qualidade é feito diariamente, alternando-se entre controlo normal e controlo patológico. A calibração é feita diariamente para o ionograma. Para os outros analitos, é feita após mudança de lote de reagente ou quando o controlo de qualidade interno está fora dos valores aceitáveis (de acordo com as regras de Westgard implementadas).

ii. Urysis 2400

A análise sumária de urina, ou tipo II, é feita pelo aparelho *Urysis 2400*. São avaliados diferentes constituintes da urina com vista à avaliação de possíveis alterações renais, urinárias, hepáticas e metabólicas. O aparelho recorre a tiras-teste para determinação semiquantitativa de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e eritrócitos, com posterior leitura da tira teste por refletância. A densidade é medida por refratometria.

Após determinação dos parâmetros bioquímicos, as urinas são centrifugadas para posterior observação do sedimento urinário e confirmação dos resultados obtidos.

O controlo de qualidade é feito em dias alternados, variando entre controlo normal e patológico e as calibrações são realizadas mensalmente ou aquando a mudança de lote de tiras.

IMUNOLOGIA

A Imunologia é a ciência que estuda o sistema imunológico e as suas interações com agentes externos ou do próprio organismo. Tem papel fundamental na defesa contra microrganismos patogénicos ou oportunistas e células tumorais. O estudo de processos complexos e desequilibrados provocados pelo próprio sistema imune, como autoimunidade, hipersensibilidade, imunodeficiência e rejeição de transplantes, também são estudados nesta valência. É uma área extremamente ampla, complexa e em constante evolução.

A vertente da imunologia no LAC-Gaia é associada à serologia infecciosa e ao estudo das hipersensibilidades. Contudo, o estudo endocrinológico e a pesquisa de marcadores tumorais são incluídos nesta área do laboratório, visto que o seu método de deteção se baseia na formação de um complexo antigénio-anticorpo.

Os aparelhos existentes no laboratório pertencentes a esta valência são *Cobas e411*, *VIDAS* e *Phadia 100*. O controlo desta valência é feito recorrendo a controlos positivos e negativos, variando o seu uso consoante o analito avaliado e aparelho utilizado.

MICROBIOLOGIA

A Microbiologia é a ciência que se dedica ao estudo das bactérias, fungos, parasitas e vírus e é a valência em que a intervenção humana é mais evidente, pois apresenta um nível menor de automatização.

No LAC-Gaia são realizadas análises bacteriológicas, micológicas e parasitológicas. As amostras recebidas incluem urina, fezes, exsudado vaginal, expectoração e unhas. Cada amostra biológica chega em contentores estéreis e adequados ao produto. O primeiro passo é sempre a execução do método cultural, seguida, quando aplicável, por um método direto. O método cultural, realizado numa câmara de fluxo laminar, baseia-se na inoculação de amostra num meio de cultura apropriado com posterior observação de crescimento bacteriano. O método direto consiste na observação de lâminas, a fresco ou com coloração, ao microscópio ótico. Esta visualização, precedida de conhecimentos sobre a microbiota típica de cada local, permite concluir sobre a proporção dos tipos bacterianos existentes e qual a sua predominância.

Os aparelhos usados nesta valência são o *Vitek 2 Compact* e o microscópio ótico. O *Vitek 2 Compact* tem como função a identificação automatizada de microrganismos e respetivos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA). O microscópio ótico é usado para observação do sedimento urinário e outros exames a fresco ou com coloração.

Urina

O exame bacteriológico de urina é a análise microbiológica mais pedida e baseia-se num método cultural e num exame direto. O exame direto é a observação do sedimento urinário ao microscópio ótico para procura de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, cristais, leveduras e bactérias. A urocultura traduz-se na inoculação da urina em meio *CPS* ou *CLED* (meios diferenciais) que permitem a identificação presuntiva das colónias, além da sua quantificação. Após 24h de incubação, as placas são analisadas quanto ao crescimento bacteriano. São consideradas positivas as culturas com um ou dois microrganismos e com um crescimento igual ou superior a 10^5 UFC/mL. A presença de três ou mais microrganismos numa urocultura não tem significado, sendo interpretado como contaminação pela microbiota da uretra. A etapa seguinte é a identificação bacteriana. De acordo com as características

morfológicas das colónias procede-se, se necessário, às provas que orientam para a identificação presuntiva ou realiza-se identificação automática usando o sistema *Vitek 2 Compact*. O TSA é realizado no *Vitek 2 Compact* e dá-nos a informação das resistências e sensibilidades das bactérias aos antibióticos.

Fezes

A coprocultura é realizada para pesquisa de *Salmonella* e *Shigella* e a inoculação é feita em meio SS, *Saboraud* e caldo selenito (meio de enriquecimento). Para o exame parasitológico é feito um tratamento prévio das fezes, recorrendo a um método concentração por sedimentação, com posterior observação a fresco ao microscópio ótico de parasitas e estruturas associadas.

Outros produtos biológicos

Os exsudados vaginais são inoculados em gelose de sangue, gelose de chocolate, *McConkey*, *Saboraud* e *ChromID Strep*. O exame direto consiste em esfregaços em lâmina com coloração de Gram. A pesquisa de *Trichomonas vaginalis* deve ser realizada quando a amostra chega ao laboratório, para facilitação da sua identificação, dada a sua mobilidade característica. No caso de grávidas perto do parto, a pesquisa do *Streptococcus beta-haemolyticus* do grupo B é requerida, sendo a amostra inoculada em gelose de sangue e *ChromID Strep* (meio seletivo e diferencial).

A expetoração é inoculada em gelose de sangue, gelose de chocolate, *McConkey* e *Saboraud*, seguida de realização de lâminas com posterior coloração de Gram para observação ao microscópio ótico.

No caso de a amostra ser unha, a análise micológica é feita em meio *Saboraud* e é necessário esperar pelo menos 20 dias para conclusão de presença ou ausência de fungo. Se houver crescimento, o aspeto da colónia é valorizado e, em conjunto com a visualização ao microscópio ótico das estruturas fúngicas, é feita a identificação do fungo.

HEMATOLOGIA

A Hematologia é a ciência que se dedica ao estudo dos elementos do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e plasma), dos seus precursores e das patologias associadas.

Os eritrócitos são as células mais abundantes do sangue, sendo necessárias para o suprimento de oxigénio aos tecidos. O eritrócito transporta a hemoglobina, cuja função é o

transporte do oxigênio e do dióxido de carbono. Os leucócitos são as células fundamentais para a proteção do organismo contra infecções, processos cancerígenos e qualquer outro evento estranho ao organismo. As plaquetas participam ativamente na coagulação, impedindo hemorragias. O plasma, além de ser o meio de transporte destas células sanguíneas, tem função de transporte de inúmeros nutrientes e proteínas para os tecidos alvo, e a recolha de produtos tóxicos resultantes do metabolismo celular para posterior eliminação.

O processo de formação das células sanguíneas designa-se hematopoiese. No adulto, a hematopoiese ocorre principalmente na medula óssea, mas em situações de maior necessidade hematológica ou mediante a presença de determinadas patologias, outros órgãos podem desempenhar esta função com grande relevância clínica, como o fígado e o baço, sendo designado este processo por hematopoiese extramedular (2).

Na medula óssea, existem populações de células estaminais com capacidade para autorrenovarem, proliferarem e diferenciarem em qualquer uma das linhagens celulares sanguíneas e imunitárias. Estas células estão envolvidas num microambiente importante para a sua sobrevivência e diferenciação, sendo constituído por células estromais (células estaminais mesenquimais, adipócitos, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e macrófagos), matriz extracelular, fatores de transcrição e de crescimento (2,3).

Consoante os fatores de crescimento a que as células estaminais hematopoiéticas estão sujeitas, a sua diferenciação segue linhagens diferentes. A Figura I é um esquema representativo de toda a diferenciação hematopoiética.

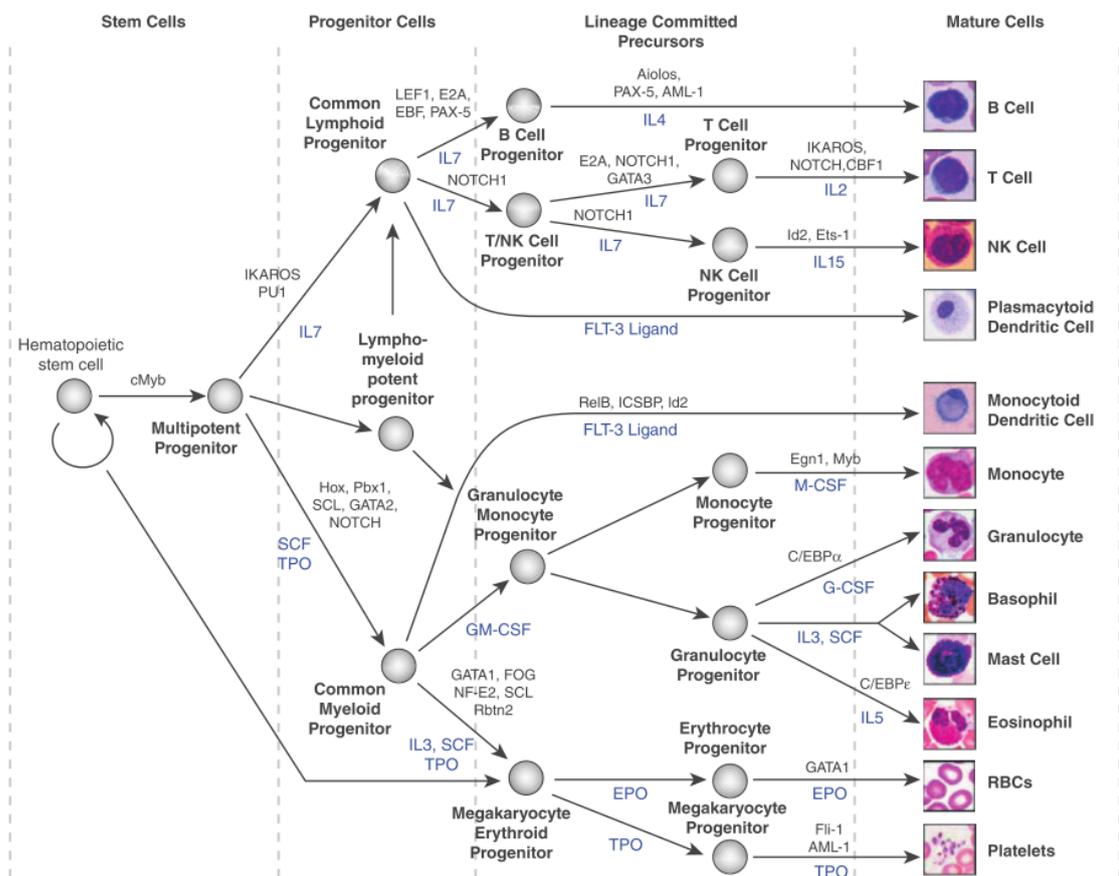


Figura 1 - Hierarquia de diferenciação hematopoiética. A presença de determinados estímulos específicos nas células progenitoras condicionam a sua maturação em cada linhagem celular sanguínea e imunitária. (Retirado de: Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L. I., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2018) Harrison's Principles of Internal Medicine. 20th Editions. McGraw-Hill education).

As células estaminais podem seguir duas linhagens: a mielóide e a linfóide. A linhagem mielóide por sua vez dá origem à linhagem eritróide, megacariocítica, granulocítica e monocítica. A linhagem linfóide origina os linfócitos.

A eritropoiese é regulada pela eritropoetina e tem como objetivo a formação de eritrócitos. A megacariopoiese tem como objetivo a formação de plaquetas e é regulada pela trombopoietina. A linhagem granulocítica origina os diferentes granulócitos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. A linhagem monocítica é responsável pela síntese de monócitos. A linfopoiese origina os linfócitos B e T que são maturados na medula óssea e no timo, respetivamente. Todas estas linhagens apresentam um conjunto de estadios celulares bem definidos que permite o estudo de todo o desenvolvimento celular. A visualização de um esfregaço de medula óssea permite a observação da sequência de desenvolvimentos destas células, enquanto que o esfregaço de sangue periférico apresenta as células maduras. A observação de células imaturas no sangue periférico tem relevância laboratorial, pois pode indicar alguma condição patológica sanguínea.

O tempo de vida das células sanguíneas é limitado, sendo de 120 dias para os eritrócitos, 10 dias para as plaquetas, algumas horas para os neutrófilos e monócitos, alguns dias para os eosinófilos e basófilos e algumas semanas a anos para os linfócitos (3).

A nível laboratorial, a análise mais realizada no LAC-Gaia é o hemograma, complementado ou não por observação de um esfregaço sanguíneo, seguido dos estudos de coagulação, velocidade de sedimentação e tipagem sanguínea. A contagem de reticulócitos é uma análise pedida esporadicamente. A observação de esfregaços da medula óssea não é uma análise realizada neste laboratório.

a) Hemograma

O hemograma permite uma avaliação qualitativa e quantitativa dos constituintes do sangue. Além de ser fundamental nos exames de rotina, é o ponto de partida para a deteção de inúmeras doenças do sistema hematopoiético, bem como do sistema imunológico e para a monitorização destas situações clínicas.

O tubo de colheita usado para esta análise é o tubo com anticoagulante EDTA que, além de impedir a coagulação por ser um quelante de Ca^{2+} , ajuda na preservação das células sanguíneas (4).

Os parâmetros avaliados no hemograma são a contagem das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), hemoglobina, hematócrito, índices eritrocitários e leucograma. A explicação de cada parâmetro avaliado encontra-se de seguida e o intervalo de referência de cada parâmetro usado no LAC-Gaia encontra-se no Anexo I.

i. Eritrograma

Análise quantitativa e qualitativa da série vermelha do sangue. Tem particular interesse para diagnóstico de anemias.

➤ Eritrócitos (RBC)

Corresponde ao número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, sendo expressa em número de células por litro ou microlitro de sangue (células/L ou células/ μL).

➤ Hemoglobina (Hb)

Corresponde à quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue e é expressa, normalmente, em gramas por decilitro (g/dl). Valores de hemoglobina inferiores ao intervalo de referência indicam presença de anemia.

➤ Hematócrito (Ht)

O hematócrito corresponde à proporção do volume da amostra de sangue que é ocupado pelos glóbulos vermelhos e é expresso em percentagem (%).

➤ Volume Corpuscular Médio (VCM)

O volume corpuscular médio é uma medida do tamanho médio dos glóbulos vermelhos, sendo expresso em fentolítros (fl). É um parâmetro importante para distinguir anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas (5).

➤ Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

A hemoglobina corpuscular média representa o conteúdo médio de hemoglobina existente em cada eritrócito e é expressa em picogramas (pg). É também útil na classificação de anemias, indicando presença de hipocromia, normalmente associada a microcitose.

➤ CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)

Corresponde à concentração média de hemoglobina por eritrócito e é expressa em grama por decilitro (g/dl).

➤ RDW (Distribuição do diâmetro dos eritrócitos)

É um índice de anisocitose eritrocitária, fornecendo indicação acerca da variação de tamanho dos glóbulos vermelhos e é expresso em percentagem (%). É particularmente útil no diagnóstico diferencial entre anemias (5).

ii. Leucograma

➤ Leucócitos (WBC)

Corresponde ao número total de leucócitos por unidade de volume de sangue total, sendo expressa em número de células por litro ou microlitro de sangue (células/L ou células/ μ L). A diminuição ou aumento dos leucócitos pode ter vários significados, como infecções ou leucemias, respetivamente.

➤ Populações de leucócitos

Contagem absoluta (células/L ou células/ μ L) e relativa (%) dos leucócitos totais, bem como das diferentes células existentes na série branca: Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos.

iii. Plaquetas

Corresponde ao número total de plaquetas por unidade de volume de sangue total, sendo expressa em número de células por litro ou microlitro de sangue (células/L ou células/ μ L).

O aparelho usado para a realização do hemograma no LAC-Gaia é o *Sysmex XT-1800i*. Este analisador automático hematológico recorre a três métodos de deteção diferentes: citometria de fluxo, focagem hidrodinâmica e SLS-Hemoglobina.

O método de deteção por citometria de fluxo é usado para a contagem e diferenciação dos leucócitos. Cada célula passa individualmente por um laser e a interação das células com a luz gera um sinal capturado por detetores. É esta dispersão da luz provocada pela presença da célula que se converte em impulsos elétricos e permite a conclusão a que tipo celular pertence. A luz dispersada frontalmente (*Forward Scatter*) indica o número e tamanho celular e a luz dispersada lateralmente (*Side Scatter*) dá informação sobre o conteúdo celular. Ao juntar estas duas informações, o aparelho consegue deduzir de que tipo de célula se trata. O resultado é apresentado sobre a forma de um histograma em que os eixos dizem respeito ao tamanho e complexidade celular e a distribuição das células ocorre de acordo com estas características.

O método de deteção por focagem hidrodinâmica permite contar e determinar o tamanho dos eritrócitos e plaquetas. As células sanguíneas passam, uma após a outra, pela abertura de impedância em foco hidrodinâmico e geram pulsos elétricos que refletem o volume celular.

O método de deteção da Hemoglobina é pelo Lauril Sulfato de Sódio (SLS-Hemoglobina). Os eritrócitos são sujeitos a lise celular para haver a libertação da hemoglobina que é alterada pelo grupo hidrofílico alquilo do Lauril Sulfato de Sódio, presente num reagente da reação. Esta interação induz a conversão do ferro ferroso (Fe^{2+}) a ferro férrico (Fe^{3+}), passando a molécula de hemoglobina a metahemoglobina. A metahemoglobina liga-se ao Lauril Sulfato de Sódio transformando-se em SLS-Hb (molécula colorida) que é posteriormente medida por espectrofotometria.

O controlo de qualidade interno é realizado todos os dias, variando entre os 3 controlos existentes: controlo normal, controlo patológico baixo e controlo patológico alto.

b) Esfregaço sanguíneo

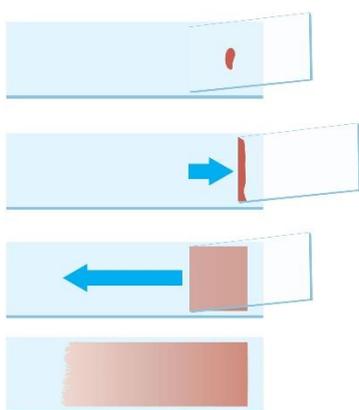


Figura 4 - Procedimento para preparação de um esfregaço sanguíneo. (Retirado de: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>)

O esfregaço sanguíneo é um meio complementar de observação de alterações hematológicas. É realizado quando os valores do hemograma não estão concordantes com os de referência ou quando solicitado pelo clínico. Tem como objetivo a contagem e a identificação de anormalidades das células sanguíneas.

O procedimento para a sua preparação consiste na extensão de uma gota de sangue obtida do tubo de colheita com EDTA devidamente homogeneizado, de forma a que uma fina camada de sangue se estenda sobre a lâmina que após respectiva coloração é analisada ao microscópio ótico. Na Figura 2 está ilustrada a técnica para realização do esfregaço sanguíneo.

A coloração realizada para observação do esfregaço sanguíneo é a Coloração de Wright. O corante Wright é uma mistura de corante ácido (eosina) e corante alcalino (azul de metileno) que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células, facilitando assim a diferenciação dos tipos celulares.

Após secagem da coloração, o esfregaço pode ser observado ao microscópio ótico. A observação inicia-se na ampliação 40x para avaliação da qualidade do esfregaço, escolha de um campo adequado à visualização, presença ou ausência de agregação plaquetária e eritrócitos em *rouleaux*. O campo escolhido para observação deve conter uma densidade celular média, com os eritrócitos ligeiramente afastados e com ausência da sua sobreposição. Num esfregaço bem preparado, a zona de visualização corresponde à zona intermédia (representada com o número 2 na Figura 3).

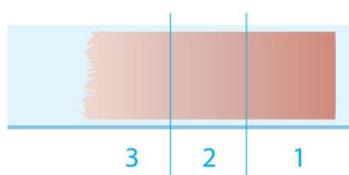


Figura 5 - Esfregaço sanguíneo dividido em três diferentes zonas com diferentes densidades celulares. A zona 2 é a zona ideal para avaliação do esfregaço. (Retirado de: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>)

Com a ampliação de 100x é realizada a contagem diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e a observação da morfologia das células sanguíneas. A contagem diferencial é feita contando 100 leucócitos e registrando a que classe pertencem, convertendo seguidamente

em percentagem. A observação da morfologia permite interpretar diferentes alterações das células que devem ser posteriormente reportadas. Na Figura 4 estão representadas diferentes observações de esfregaços sanguíneos realizadas no LAC-Gaia.

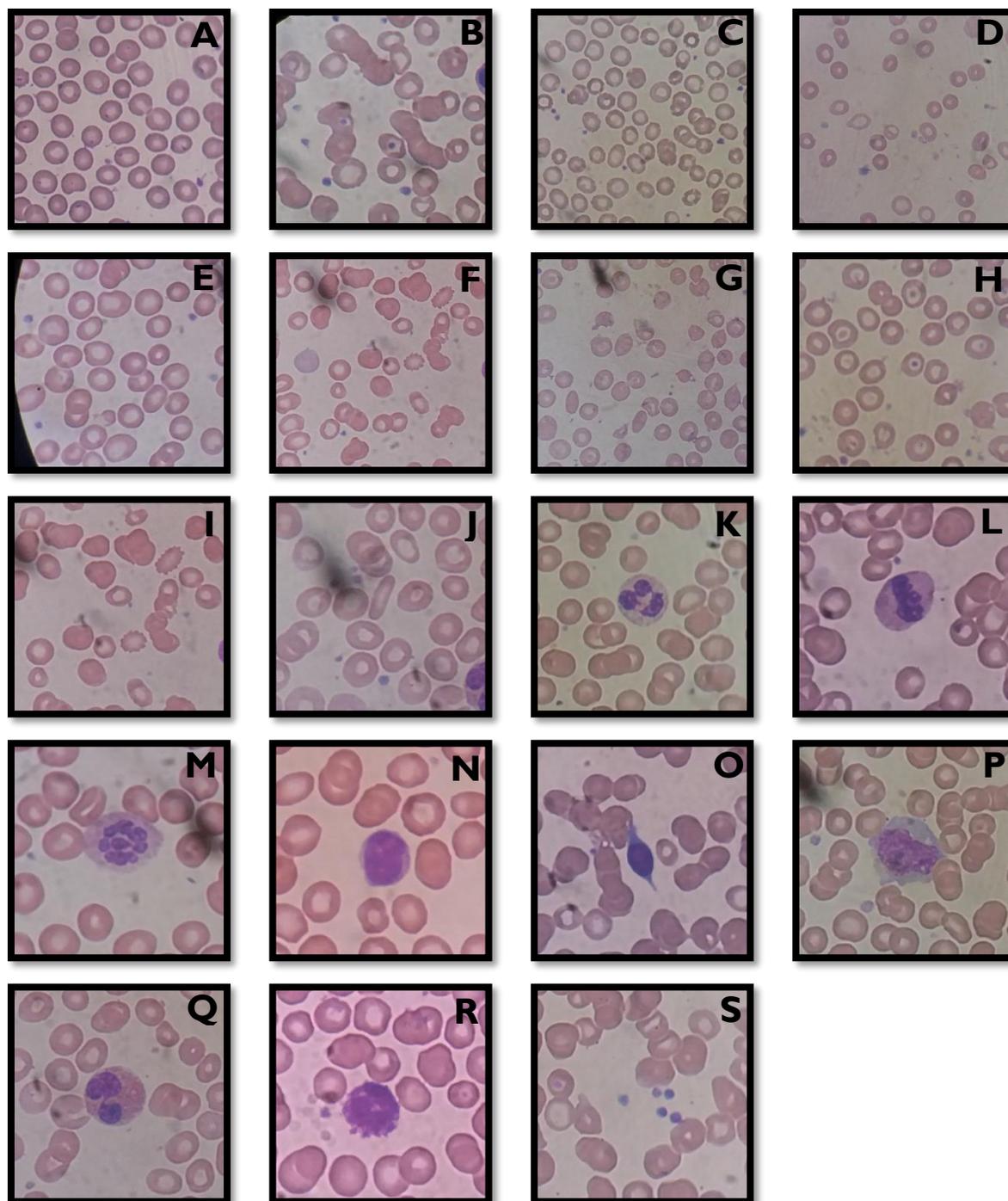


Figura 7 - Observações realizadas ao microscópio ótico (100x) em esfregaços sanguíneos no LAC-Gaia. **A**- Eritrócitos normais; **B**- Fenômeno rouleaux (aglutinação dos eritrócitos em “pilha de moedas”; indica elevada presença de proteínas no plasma (5)); **C**- Hipocromia; **D**- Microcitose; **E**- Macrocitose; **F**- Anisocitose; **G**-Poiquilocitose; **H**- Células em alvo (típicas de déficit de ferro, hepatopatia e hemoglobinopatia (3)); **I**- Equinócitos (típicos de hepatopatia, alcoolismo crônico, déficit de piruvato cinase (8)); **J**- Célula em forma de lápis (típicas de anemia ferropênica (5)); **K**- Neutrófilo; **L**- Neutrófilo em banda (fase de desenvolvimento celular anterior ao neutrófilo maduro; acompanha estados de neutrofilia (75)); **M**- Neutrófilo hipersegmentado (típico de anemia megaloblástica, alcoolismo ou hepatopatia (5)); **N**- Linfócito; **O**- Linfócito atípico (típico de infecções virais (8)); **P**- Monócito; **Q**- Eosinófilo; **R**- Basófilo; **S**- Plaquetas.

c) Contagem de reticulócitos

A contagem de reticulócitos é uma análise realizada quando requisitada pelo clínico e consiste na observação e contagem de reticulócitos que são os precursores imediatos dos eritrócitos maduros. Os valores normais de circulação destas células no sangue periférico em situação fisiológica normal encontram-se entre 0,5-1,5%, representando este valor a percentagem de reticulócitos entre o total de eritrócitos no sangue periférico (6). Os reticulócitos são células anucleadas, de maior tamanho que os eritrócitos e apresentam no seu citoplasma fragmentos de RNA ribossomal (3). O esfregaço para observação de reticulócitos é realizado com a mesma técnica que o esfregaço de sangue periférico anteriormente explicado. A coloração recorre ao uso do corante Azul Brilhante de Cresil, em que os fragmentos de RNA adquirem a cor azul e permite assim a sua identificação (Figura 5).

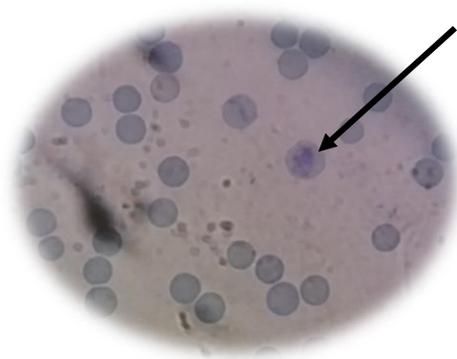


Figura 8 - Esfregaço para observação de reticulócitos (100x). A seta indica um reticulócito. (Foto registada no LAC-Gaia).

A contagem é realizada ao microscópio ótico e traduz-se pela contagem de 1000 eritrócitos e quantos deles são reticulócitos. A percentagem de reticulócitos é obtida pela razão do número de reticulócitos encontrados sobre o número de eritrócitos contados a multiplicar por 100.

O estudo dos reticulócitos fornece informação sobre a eficiência da eritropoiese (5). Constitui um importante fator no diagnóstico, classificação e monitorização das anemias. A presença de reticulócitos no sangue periférico é um sinal inequívoco de produção de eritrócitos, sendo assim possível através da sua avaliação perceber se uma anemia é hiperregenerativa ou hiporregenerativa. Em casos de anemia em que a contagem de reticulócitos é $>1,5\%$, significa que a eritropoiese está a funcionar eficazmente e estamos perante uma anemia hiperregenerativa, como são exemplos a anemia hemolítica e hemorragias. Em situações anémicas, sem resposta da medula óssea, a anemia é classificada como hiporregenerativa e temos o caso das anemias ferropénicas e megaloblásticas.

Anemias

A anemia significa uma diminuição da concentração de Hb no sangue, em que o valor se encontra abaixo do intervalo de referência. A Hb é uma molécula constituída por quatro cadeias de globina, cada uma ligada covalentemente a um grupo heme. O grupo heme é composto por uma molécula inorgânica (Fe^{2+}) e uma molécula orgânica (protoporfirina IX) (3). Qualquer alteração num destes constituintes vai comprometer a síntese de hemoglobina e originar eritrócitos microcíticos e hipocrómicos.

A anemia pode ter causas etiológicas diferentes, podendo ser originada por um défice na eritropoiese, hemólise ou hemorragia (7). Na Tabela 3 é apresentada a classificação morfológica das anemias.

Tabela 3 - Classificação morfológica dos diferentes tipos de anemia (3).

Anemia		
Microcítica (VCM < 80fl)	Normocítica (VCM = 80-97 fl)	Macrocítica (VCM > 97fl)
<ul style="list-style-type: none">▪ Anemia ferropénica▪ Anemia sideroblástica▪ Talassémias▪ Anemia da doença crónica▪ Intoxicação por chumbo	<ul style="list-style-type: none">▪ Anemia da doença crónica▪ Anemia hemolítica▪ Hemorragias	<ul style="list-style-type: none">▪ Anemia megaloblástica:<ul style="list-style-type: none">- anemia por défice de vitamina B12- anemia por défice de folato- anemia perniciosa▪ Anemia não megaloblástica:<ul style="list-style-type: none">- hepatopatia- alcoolismo

O estudo de um doente com anemia passa pela história clínica, realização do hemograma, esfregaço sanguíneo e contagem de reticulócitos. Estas avaliações permitem a realização de diagnósticos diferenciais entre anemias por defeito na síntese de Hb (anemias microcíticas) ou por defeito na maturação nuclear (anemias macrocíticas) e entre anemias por defeito na produção (anemia hiporregenerativa) ou por elevada destruição/perda (anemia hiperregenerativa). A execução de estudos complementares, como determinações serológicas ajudam na classificação da anemia. Na Tabela 4 está representado um esquema geral e simplificado de cada tipo de anemia e os seus respetivos parâmetros de diagnóstico. De notar que as conclusões apresentadas refletem condições laboratoriais perfeitas de cada tipo de anemia. Na prática, a história clínica e a existência de diversas patologias associadas fazem com que nem todos os requisitos sejam cumpridos na íntegra para a classificação de uma anemia num dado grupo.

Tabela 4 - Diagnóstico laboratorial dos diferentes tipos de anemia (3,8,9).

Anemia	Exame	Parâmetros
Anemia ferropénica (Tipo de anemia microcítica mais prevalente; déficit de ferro).	<i>Hemograma</i>	VCM, HCM e CHCM - ↓ RDW - ↑
	<i>Esfregaço SP</i>	Hipocromia, microcitose, anisocitose, poiquilocitose, células em alvo e células em forma de lápis
	<i>Reticulócitos</i>	Hiporregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	Ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina - ↓ TIBC - ↑
Anemia sideroblástica (Defeito na síntese das protoporfirinas que constituem o grupo heme).	<i>Hemograma</i>	VCM, HCM e CHCM - ↓ RDW - ↑
	<i>Esfregaço SP</i>	Hipocromia, microcitose e anisocitose
	<i>Reticulócitos</i>	Hiporregenerativa
	<i>Esfregaço MO</i>	Sideroblastos em anel (>15%)
	<i>Bioquímica</i>	Ferro sérico e ferritina - ↑
Anemia da doença crónica (Grau da anemia associado à gravidade da doença subjacente).	<i>Hemograma</i>	Hb raramente <9 g/dL VCM, HCM e CHCM – N ou ↓
	<i>Esfregaço SP</i>	Normocromia/ ligeira hipocromia, normocitose/ligeira microcitose
	<i>Reticulócitos</i>	Hiporregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	CRP, ferritina e hepcidina - ↑ Ferro sérico e TIBC - ↓
Talassemias (Diminuição da síntese das cadeias de globina).	<i>Hemograma</i>	RBC – N ou ligeiramente ↑ VCM, HCM E CHCM – ↓ RDW - ↑
	<i>Esfregaço SP</i>	Hipocromia, microcitose, células em alvo
	<i>Reticulócitos</i>	Hiperregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	Ferro sérico, ferritina e TIBC - N
	<i>Eletroforese</i>	Eletroforese da Hb (Hb H – alfa talassemia; Hb F – beta talassemia major; >3,5% Hb A ₂ – beta talassemia minor)
Anemia megaloblástica (Por déficit de vitamina B12, folato ou por déficit do fator intrínseco que tem como função transportar a vitamina B12 até ao intestino).	<i>Hemograma</i>	VCM - ↑
	<i>Esfregaço SP</i>	Macrocitose, anisocitose, neutrófilos macrocíticos e hipersegmentados
	<i>Reticulócitos</i>	Hiporregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	LDH e bilirrubina não conjugada - ↑ Vitamina B12 ou folato - ↓ Transaminases N

<p>Anemia macrocítica não megaloblástica (Alcoolismo crônico, doença hepática, entre outras causas).</p>	<i>Hemograma</i>	VCM - ↑
	<i>Esfregaço SP</i>	Macrocitose, anisocitose, neutrófilos macrocíticos e hipersegmentados
	<i>Reticulócitos</i>	Hiporregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	LDH e bilirrubina não conjugada - ↑
	<i>História clínica</i>	Alcoolismo crônico ou Hepatopatia
<p>Anemia hemolítica (Resultam de uma destruição acentuada de eritrócitos; exemplos: anemia autoimune, anemia por anomalias de membrana ou alterações enzimáticas, entre outras).</p>	<i>Esfregaço SP</i>	Normocromia, normocitose Em certas anemias hemolíticas: esferócitos, eliptócitos, drepanócitos, fragmentos celulares, <i>bite cells</i> , <i>autoaglutinação</i>
	<i>Reticulócitos</i>	Hiperregenerativa
	<i>Bioquímica</i>	LDH, bilirrubina não conjugada, urubilinogénio e estercobilinogénio - ↑ Haptoglobina - ↓
	<i>Imunologia</i>	Teste de coombs positivo (se anemia autoimune)

Esfregaço SP – esfregaço de sangue periférico; Esfregaço MO – esfregaço de medula óssea; TIBC – capacidade total de ligação de ferro à transferrina; **N** – valor normal; ↑ – valor aumentado; ↓ – valor diminuído.

d) Provas de Coagulação

A hemostase é um processo biológico complexo que regula o equilíbrio das forças pro-coagulantes e anticoagulantes, de modo a preservar a fluidez do sangue quando os vasos sanguíneos estão intactos, ou a desencadear a formação de um coágulo quando há o seu ferimento e assim evitar perda excessiva de sangue (10).

Este processo fisiológico apresenta três etapas após uma lesão vascular. Primeiramente há a hemostase primária, em que há formação de um trombo plaquetar por meio da interação das plaquetas com o colagénio das células endoteliais do vaso sanguíneo. Seguidamente dá-se a coagulação com o envolvimento dos fatores de coagulação e a formação de um coágulo de fibrina solúvel. Por fim acontece a lise do coágulo, o qual se dá o nome de fibrinólise (11). Existem três componentes essenciais ao seu bom funcionamento, são eles as plaquetas, as células endoteliais e as proteínas plasmáticas (fatores de coagulação, inibidores de coagulação e o sistema fibrinolítico) (3).

Quando o sistema hemostático não se encontra em equilíbrio, pode acontecer um fenómeno hemorrágico ou trombótico.

Hemostase primária

A hemostase primaria é desencadeada pela lesão vascular e resulta de uma interação entre as células endoteliais, as plaquetas e as proteínas de adesão com o objetivo de formação

de um trombo plaquetar. A lesão vascular liberta vários sinalizadores celulares, tais como o tromboxano A2 e ADP, que além de serem vasoconstritores, estimulam a ativação plaquetária (3).

O endotélio vascular tem um papel crucial na manutenção da hemostase, pois segrega substâncias pro-coagulantes e substâncias anticoagulantes, apresentadas seguidamente na Tabela 5, sendo fácil concluir que a sua função é essencialmente anticoagulante (12).

Tabela 5 - Moléculas segregadas pelo endotélio vascular com importância na hemostase (12).

Moléculas segregadas pelo endotélio vascular com importância na hemostase	
Pro-coagulantes	Anticoagulantes
<ul style="list-style-type: none">○ Fator tecidual (FT)○ Fator de <i>von Willebrand</i> (FvW)	<ul style="list-style-type: none">○ Prostaciclina○ Óxido nítrico○ Antitrombina○ Proteína C, S○ Ativador tecidual do plaminogénio (t-PA)○ inibidor da via do fator tecidual (TFPI)

As plaquetas são estruturas exclusivamente pro-coagulantes e as glicoproteínas que revestem a sua superfície são de extrema importância para a sua adesão e agregação, permitindo a formação do tampão plaquetário. A glicoproteína Ib liga-se ao FvW que vai permitir a ligação da plaqueta ao colagénio e assim permitir a adesão das plaquetas ao endotélio (13). As glicoproteínas IIb e IIIa servem como recetores para a ligação do fibrinogénio que vai funcionar como uma ponte entre as plaquetas, para se dar a sua agregação. Para além disto, as plaqueta ativas ainda segregam mais tromboxano A2 e ADP, continuando assim a ativação plaquetária e a vasoconstrição (13). Após adesão e agregação plaquetária, os fosfolípidos plaquetares ficam expostos e funcionam como ativadores da cascata de coagulação pela via intrínseca e estimulam a libertação de prostaglandinas que atuam nos vasos continuando a promover a sua vasoconstrição (3). Quanto ao fator de *von Willebrand*, além deste ser produzido nas células endoteliais, também é segregado pelos megacariócitos e permite a adesão das plaquetas ao colagénio do endotélio vascular. Este fator também transporta e estabiliza o FXIII na cascata de coagulação (14).

Coagulação

A coagulação é um mecanismo fisiológico pelo qual diversos fatores de coagulação são ativados em série com o objetivo final de formação de um coágulo estável de fibrina (4). A maioria destes fatores de coagulação são sintetizados no fígado e alguns deles precisam da vitamina K para serem ativados (protrombina, FVII, FIX e FX)(15).

A literatura divide a cascata de coagulação em duas vias, sendo elas a via intrínseca e a via extrínseca, que culminam numa via comum final. A representação esquemática da cascata de coagulação segue na Figura 6.

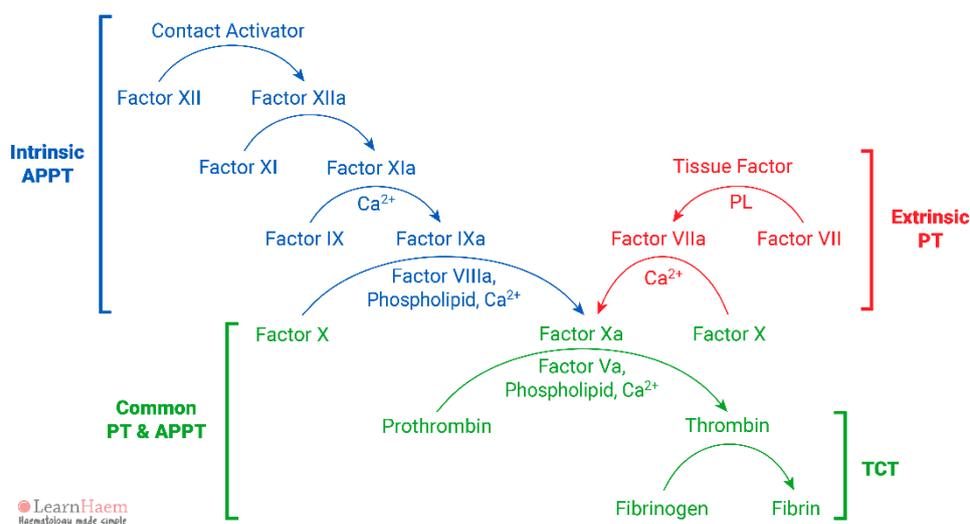


Figura 9 - Cascata da Coagulação

(Retirado de: <https://learnhaem.com/courses/coagulation/lessons/normal-haemostasis/topic/the-revised-coagulation-cascade/>)

As duas vias acontecem simultaneamente, mas são ativadas por diferentes elementos. A via extrínseca ativa através do fator tecidual que é libertado após a lesão vascular, e que se liga posteriormente ao FVII. A via intrínseca pelos fosfolípidos plaquetares expostos durante a ativação plaquetar que ativam o FXII. A cascata inicia-se pela via extrínseca, mas é a via intrínseca que gera maior quantidade de trombina (3). A ação conjunta dos fatores de coagulação culmina na formação de trombina e esta por sua vez converte o fibrinogênio em fibrina. Esta fibrina infiltra-se no trombo plaquetar, transformando-o num tampão hemostático firme. Depois da formação da rede de fibrina, esta ainda sofre ação do FXIII que a estabiliza, resultando assim no coágulo de fibrina (3).

A existência de substâncias anticoagulantes é de elevada importância, pois estas permitem restringir a ação trombótica ao local de lesão vascular, tais como a antitrombina, proteína C e S e o TFPI (12). O fluxo sanguíneo também funciona como um mecanismo antitrombótico.

Fibrinólise

A fibrinólise consiste na remoção do excesso de fibrina, de modo a não comprometer o fluxo sanguíneo normal. O t-PA ativa o plasminogénio que se converte em plasmina e é esta protease que digere as fibras de fibrina transformando-a em fragmentos solúveis (13). A formação da plasmina nos locais afetados também restringe a extensão do coágulo (3).

Alterações na Hemostase

Diversas patologias podem estar relacionadas com alterações no mecanismo de hemostase, originando processos hemorrágicos ou eventos trombóticos. Na Tabela 6 estão enumeradas algumas das causas possíveis destas alterações hemostáticas.

Tabela 6 - Algumas causas possíveis que causam hemorragia e trombose (2,3).

<i>Hemorragia</i>	<i>Trombose</i>
Anomalias vasculares Trombocitopenia Défice na função plaquetar Coagulopatias Hepatopatias Défice de vitamina K Coagulação Vascular Disseminada Anticoagulantes	Trombose venosa Tromboembolismo Anticoagulante Lúpico Hiperhomocisteinémia Défice sistema fibrinolítico Défice anticoagulantes naturais Síndrome antifosfolipídico

Componente Laboratorial

A avaliação laboratorial da hemostase no LAC-Gaia consiste no estudo das plaquetas e nas provas de coagulação.

A avaliação plaquetar quantitativa é feita através do hemograma e a qualitativa aquando a observação do esfregaço de sangue periférico. Se o hemograma demonstrar trombocitopenia, procede-se a uma observação do esfregaço de sangue periférico para confirmação da morfologia plaquetar. Falsas trombocitopenias acontecem e são causadas por agregados plaquetares e satelitismo. Quando isto acontece, deve ser feita a colheita de sangue em tubo com anticoagulante citrato, pois o anticoagulante EDTA favorece a agregação plaquetar (16,17).

Relativamente às provas de coagulação, são realizadas duas análises sendo elas o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A análises destes tempos tem particular interesse para medir a eficácia das vias de coagulação e para monitorizar

a terapêutica com anticoagulantes. A requisição deste tipo de testes deve sempre ser acompanhado de uma avaliação clínica prévia e ter a noção que alguns processos hemorrágicos e trombóticos poderão não ter tradução nestas provas. Uma série de análises bioquímicas também podem ser pedidas juntamente com estes testes, como o estudo da função hepática.

A amostra biológica usada nas provas de coagulação é o plasma, colhido num tubo com citrato de sódio (1:9) e posteriormente centrifugado a 3200 rpm durante 15 minutos. O citrato é um quelante de cálcio reversível que inativa a coagulação. Aquando a realização dos testes de coagulação é administrado cálcio que permite o desenrolar da coagulação e assim a medição do TP e TTPa.

O aparelho usado no LAC-Gaia para avaliação da coagulação é o *STA-Satellite*. Este equipamento tem tecnologia de deteção mecânica, em que o movimento de uma bola de aço na solução é monitorizado por um sensor magnético. Durante a formação do coágulo, os filamentos de fibrina formados alteram o movimento da bola que é detetado pelo sensor. Uma vantagem deste tipo de deteção é que a turvação do plasma tem menor probabilidade de afetar o resultado (18). O controlo deste equipamento é feito diariamente, recorrendo a um controlo normal e outro patológico.

➤ *Tempo de Protrombina (TP)*

O TP mede a atividade dos fatores VII, X, V, protrombina e fibrinogénio, avaliando assim a eficácia da ativação da cascata pela via extrínseca. O intervalo de referência usado no laboratório é 13,5s +/- 1,8s e se estes forem ultrapassados consegue-se concluir que existe uma deficiência congénita ou adquirida nestes fatores. As causas que mais originam aumento deste tempo são doenças hepáticas, défice nutricional ou problemas na absorção de vitamina K e tratamento com antagonistas da vitamina K (anticoagulantes orais usualmente prescritos) (3).

A nível prático, no início da avaliação do TP é adicionada ao plasma tromboplastina tecidual liofilizada, que vai funcionar como fator tecidual e assim ativar o FVII e um solvente com cálcio que vai desencadear a ativação da coagulação sanguínea.

O resultado além de ser apresentado em segundos, é dado como uma Razão Normalizada Internacional (INR). O INR é um sistema estabelecido pela Organização Mundial de Saúde para padronizar o resultado do TP em todo o mundo e é usado para controlo da terapêutica com anticoagulantes orais (15). Os resultados do TP são normalizados recorrendo a um Índice Internacional de Sensibilidade (ISI). O ISI é determinado comparando cada lote de

reagente com a tromboplastina padrão (19). Isto permite uniformizar os resultados do TP a nível global e assim possibilitar que os doentes possam realizar o controlo da terapêutica em diferentes laboratórios, independentemente do reagente usado, não ficando assim o ajuste terapêutico comprometido. O INR é calculado pela fórmula seguinte:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP da amostra}}{\text{TP de controlo}} \right)^{\text{ISI}} \quad (15)$$

O valor de referência para indivíduos sem exposição a terapêutica anticoagulante situa-se entre 0,9-1,1, mas a principal razão para a realização desta prova é o controlo e monitorização de doentes sujeitos a tratamento com anticoagulantes orais derivados cumarínicos, sendo o mais utilizado a varfarina (20). Esta fármaco é um antagonista da vitamina K e inibe os fatores vitamina K-dependentes, sendo prescrito para controlo da formação de coágulos sanguíneos (20). Pacientes com fibrilação auricular e sujeitos a esta terapêutica têm de apresentar valores de INR entre 2-3 (21). Valores inferiores a 2 significam que o sangue está mais espesso e assim existe possibilidade de formação de coágulos; valores superiores a 3 indica fluidez do sangue e pode acarretar hemorragias espontâneas. O valor de INR permite o ajuste terapêutico da dose de varfarina a tomar e é ajustado a nível individual. Este controlo não é simples, pois existem vários fatores que comprometem a dose necessária de anticoagulante, como fatores clínicos, dieta, medicação concomitante e genética (4). Os ajustes na dosagem são efetuados progressivamente, sendo aumentada em casos de $\text{INR} < 2$ e diminuída quando o $\text{INR} > 3$. Consoante o valor apresentado de INR, a frequência de análise pode variar, sendo mais curta em casos que se situem fora dos valores de referência e mais longos em pessoas com resultado dentro dos valores de referência.

➤ *Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)*

O TTPa mede a atividade dos fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, protrombina e fibrinogénio, avaliando assim a eficácia da via intrínseca. O intervalo de referência utilizado no LAC-Gaia é 29,2s +/- 2,8s e se estes forem ultrapassados consegue-se concluir que existe uma deficiência congénita ou adquirida nestes fatores.

A nível prático, no início da avaliação da TTPa são adicionados um substituto de fosfolípidos plaquetares, a cefalina, um ativador do FXII e cálcio.

Esta avaliação é comumente usada para deteção da hemofilia A (défice FVIII) e B (défice FIX), monitorização da terapêutica com heparina e para pesquisa de anticorpo lúpico (22). A heparina é um anticoagulante que aumenta a atividade da antitrombina e o anticorpo lúpico tem como alvos antigénicos anticoagulantes naturais (2).

e) Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação é uma análise não específica e pouco sensível e pesquisa um processo inflamatório, associado a uma ou mais causas, como infecções, doenças autoimunes ou tumores (23).

Os eritrócitos exibem entre si forças de repulsão, devido às suas cargas negativas e por isso têm uma agregação e deposição lenta. Em contrapartida, em estados inflamatórios, a sua agregação e deposição acontece mais rapidamente, sendo este fenómeno explicado pelo aumento das proteínas positivas de fase aguda, como a CRP e a ferritina. Estas proteínas como aumentam a carga positiva entre os glóbulos vermelhos, alteram a constante elétrica, levando a uma neutralização da carga negativa típica da superfície dos eritrócitos (24). Um conjunto de outros fatores também alteram a VS dos glóbulos vermelhos. No caso de anemia, gravidez e com o aumento da idade, a VS tem tendência a aumentar e em situações de policitemia vera, drepanocitose e esferocitose, a VS diminui (25). Problemas hepáticos também podem diminuir a sedimentação dos eritrócitos, devido ao comprometimento na síntese de proteínas de fase aguda (25).

Atualmente, este teste tem sido cada vez menos requisitado, pois o doseamento da CRP tem a mesma finalidade e embora inespecífico também, é muito mais sensível (26). A VS é útil para monitorização de condições inflamatórias crónicas, sendo principalmente utilizada para o diagnóstico e seguimento de doenças reumatológicas (24). Por outro lado, a CRP caracteriza melhor estados inflamatórios agudos (27). Assim, o uso destes dois marcadores de inflamação, juntamente com uma boa história clínica podem ser usados para diagnóstico e monitorização de processos inflamatórios.

No LAC-Gaia o aparelho que realiza esta análise é o *Ves matic 30*, que recorre ao método de *Westergren* modificado. O aparelho tem um sensor digital que faz a leitura do nível de sedimentação globular. A amostra utilizada é o sangue total colhido num tubo com anticoagulante citrato de sódio (proporção 1:4). O controlo é realizado manualmente pelo método de *Westergren*, num tubo de Hematócrito, que tem diâmetro e altura definida, e consiste na leitura do plasma livre de eritrócitos em mm após 1h da colocação do sangue no tubo. A diferença entre o valor emitido pelo aparelho e o lido manualmente não pode ter uma diferença maior que 20mm, para se poder validar a análise.

f) Tipagem Sanguínea

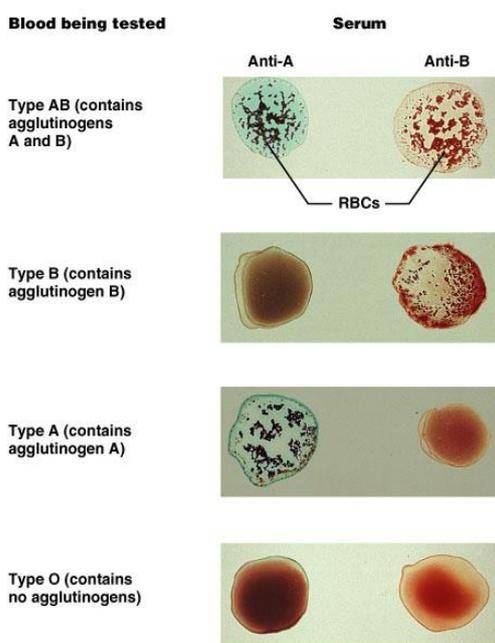
A tipagem sanguínea consiste na determinação do sistema AB0 e Rh. Estes sistemas são baseados na caracterização antigénica da superfície dos glóbulos vermelhos e o seu estudo tem elevado interesse para aplicação nas transfusões, transplantes e gravidez.

O sistema AB0 baseia-se na presença ou ausência dos antígenos A e B, de forma isolada ou simultânea, nos glóbulos vermelhos. A presença ou ausência de anticorpos anti-A e anti-B, tem uma relação de reciprocidade inversa face aos antígenos. Este sistema tem 4 grupos sanguíneos possíveis, os quais estão representados na Figura 7.

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type				
Antibodies in plasma			None	
Antigens in red blood cell	A antigen	B antigen	A and B antigens	None

Figura 10 - Grupos sanguíneos do sistema AB0.

(Retirado de: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1088507>)



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figura 11 - Avaliação laboratorial do grupo sanguíneo (Retirado de: https://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_1/CH17_Blood_Typing.htm)

A determinação do grupo sanguíneo é feita manualmente numa lâmina de vidro e a sua deteção é feita por reações de aglutinação. O teste consiste na exposição do sangue da amostra a reagentes com o anticorpo anti-A e o anticorpo anti-B. Em caso de aglutinação com o anticorpo anti-A, significa que a amostra testada é do grupo A, pois apresenta na superfície dos glóbulos vermelhos o antígeno A. No caso de aglutinação com o anticorpo anti-B, o indivíduo tem grupo sanguíneo B. Se não houver aglutinação com ambos os anticorpos, é uma amostra do grupo 0 e no caso de aglutinar com os dois anticorpos estamos perante um tipo de sangue AB. Na Figura 8 estão apresentados os diferentes resultados laboratoriais.

O sistema Rhesus (Rh) é definido pela presença ou ausência do antígeno D à superfície dos eritrócitos. Os anticorpos anti-D não existem naturalmente no sangue de uma pessoa, sendo produzidos apenas por indivíduos Rh-, quando em contacto com sangue Rh+ (3). Esta sensibilização prévia pode derivar de uma incorreta transfusão sanguínea ou de uma gravidez de um feto Rh+. A doença hemolítica do recém-nascido é uma situação clínica responsável por uma mortalidade e morbidade perinatal significativa e acontece pela sensibilização prévia da gestante ao antígeno D (28). Isto pode acontecer em grávidas Rh-, em que tiveram uma gravidez anterior de um feto Rh+ ou sujeitas a uma transfusão sanguínea com sangue Rh+, e assim, desenvolveram anticorpos-anti D (detetado pelo teste de coombs indireto). Numa segunda gravidez, se o feto for Rh+, os anticorpos anti-D irão atravessar a placenta e reagir com os antígenos do feto, resultando numa anemia hemolítica severa (29). Por isso, durante a gestação, as mulheres têm de realizar os teste de tipagem sanguínea e o teste de coombs indireto (30). Na Figura 9 está representado esquematicamente o desenvolvimento da doença hemolítica do recém-nascido.

Atualmente, a profilaxia de grávidas Rh- passa pela administração de Ig anti-D às 28 semanas de gravidez. Após o parto, até às 72h, se o bebé for Rh+, administra-se novamente uma certa quantidade de Ig anti-D (28). Esta terapêutica vai destruir os eritrócitos com o antígeno D que passaram do bebé para a mãe, evitando a resposta imune com desenvolvimento de memória imunológica e assim problemas em gestações futuras (28).

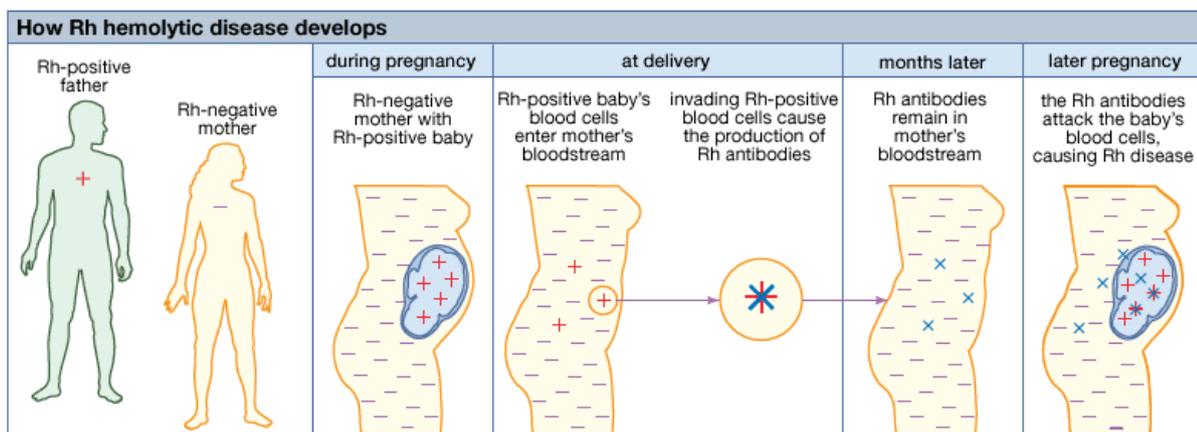


Figura 12 - Desenvolvimento da Doença Hemolítica do Recém-Nascido.

(Retirado de: https://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_1/CH17_Blood_Typing.htm)

Quanto à análise laboratorial do fator Rh, esta consiste num teste de aglutinação que recorre a um reagente com o anticorpo anti-D. A interpretação é feita de igual modo que o sistema AB0: nas situações em que há aglutinação, significa que na membrana do eritrócito está presente o antígeno D, logo é do tipo sanguíneo Rh+ e quando não há aglutinação, não tem o antígeno D, correspondendo assim ao tipo Rh-.

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

II.1 - VIROLOGIA

A Virologia é a ciência que se dedica ao estudo dos vírus, das suas interações com os organismos vivos e das patologias associadas.

Os vírus são estruturas infecciosas de tamanho muito pequeno (entre 18 a 600 nm), sendo parasitas intracelulares obrigatórios pois necessitam da maquinaria celular para a sua replicação, reproduzindo-se apenas a partir do seu material genético (31).

Os vírus são constituídos pelo ácido nucleico (DNA ou RNA) e por uma cápside proteica que envolve o genoma. Ao conjunto do genoma com a cápside designa-se nucleocápside. Alguns vírus ainda apresentam outra estrutura exterior à cápside, o envelope/invólucro, designando-se estas partículas por vírus envelopados. Esta estrutura é formada a partir de uma membrana celular da célula hospedeira, modificada pela introdução de proteínas codificadas pelo vírus e remoção das proteínas típicas dessa membrana (32). Os vírus envelopados são mais sensíveis às condições ambientais do que os vírus nus/não envelopados, pois a fração lipídica e as glicoproteínas são mais suscetíveis a pH ácido, elevada temperatura, detergentes, álcool e desidratação (31). Os vírus nus são mais resistentes aos agentes físicos e químicos, uma vez que a cápside é uma estrutura mais resistente do que o envelope viral (33). Quanto ao tipo de disseminação ele difere entre os dois tipos de vírus. Os vírus nus conseguem permanecer no ambiente longos períodos e a sua disseminação acontece mais facilmente, podendo ser transmitidos pela água, pelos alimentos e por fómites (31).

Tanto as proteínas da cápside como as do envelope, no caso dos vírus nus e envelopados, respetivamente, são as responsáveis pela interação do vírus com os recetores das células hospedeiras. Estas moléculas funcionam como VAP (proteínas de adsorção viral) e têm carácter antigénico importante (31).

O meu estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19) foi dedicado exclusivamente ao diagnóstico do SARS-CoV-2, incidindo assim o meu relatório no estudo deste vírus.

SARS-CoV-2

O surgimento e globalização do SARS-CoV-2 trouxe uma necessidade urgente do seu estudo, diagnóstico e tratamento. Cientistas de todo o mundo juntaram-se com o objetivo de conseguir perceber que vírus é este; qual a sua origem; qual o seu modo de transmissão; qual o seu mecanismo de patogenicidade; qual o melhor método de detecção; qual o tratamento; qual a profilaxia; como o evitar. A rápida distribuição deste vírus pelo globo, tornou a ciência o foco de pressão mundial e foram pedidas respostas e certezas num muito curto espaço de tempo.

Segundo a OMS, a gestão da pandemia passa pela prevenção da infeção, detecção, isolamento e monitorização de pessoas infetadas e tratamento de sintomas associados (34).

i. Introdução

O *Severe Acute Syndrome Respiratory Coronavirus 2* é um vírus que pertence à família *Coronaviridae*. A família *Coronaviridae* divide-se em quatro géneros: alfa-coronavírus, beta-coronavírus, gama-coronavírus e delta-coronavírus, pertencendo o SARS-CoV-2 ao género beta-coronavírus (35).

Os coronavírus são vírus envelopados, esféricos, com nucleocápside helicoidal, com RNA de cadeia simples polaridade positiva ((+)ssRNA) e têm um diâmetro de aproximadamente 120nm (31,33). Cada partícula viral contém quatro tipos de proteínas estruturais principais: proteína transmembranar (M), proteína do envelope (E), espícula (S) e proteína da nucleocápside (N) (36). O aspeto coroado apresentado pelo vírus quando visualizado por microscopia eletrónica é devido à presença das glicoproteínas S (espículas) (Figura 10).

A proteína N é a proteína que forma a nucleocápside e tem como função ligar-se ao genoma viral e participar na replicação do RNA (37). A proteína M é que define a estrutura do envelope viral e a proteína E participa na montagem das novas partículas virais e na sua posterior libertação (38). A proteína S é a proteína viral responsável pela ligação aos recetores celulares, definindo assim o tropismo viral (33). Também permite a fusão e entrada do vírus na célula hospedeira e funciona como alvo antigénico do sistema imune (37). A representação esquemática da constituição de um coronavírus está presente na Figura 11.

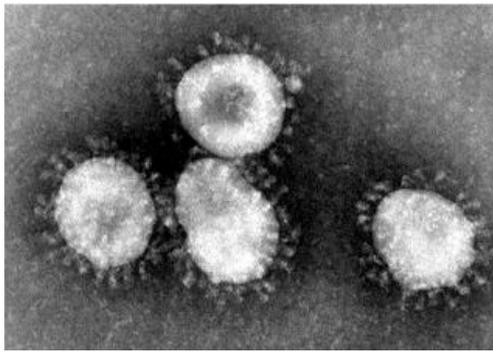


Figura 10 - Imagem de microscopia eletrônica de coronavírus (33).

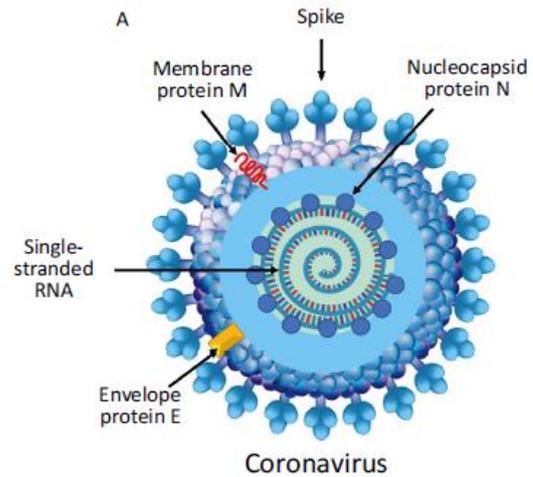


Figura 11 - Esquema da constituição de um coronavírus (36).

Previamente ao surgimento do coronavírus SARS-CoV-2, esta família tinha seis vírus capazes de causar doença respiratória em humanos (39). Quatro deles (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HKU1) com baixa virulência capazes de causar infecção no trato respiratório superior com raros casos de infecções severas ocorridas em bebês, crianças e pessoas idosas, e dois deles (SARS-CoV e MERS-CoV) capazes de infetar o trato respiratório inferior e causar doença respiratória severa (síndrome respiratória aguda severa) principalmente em pessoas imunocomprometidas (35,37). A origem dos coronavírus é essencialmente animal, mas os surtos acontecem porque os vírus adquirem a capacidade de ultrapassar a barreira de espécie e infetam humanos.

O SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) emergiu na China em 2003 e foram reportados 8422 casos, dos quais 916 fatais (taxa de letalidade: 10,8%) em 29 países dos seis continentes (37). Os morcegos são o reservatório deste vírus e a transmissão para os humanos ocorreu num mercado de animais vivos (33,37). Acredita-se que o SARS-CoV presente nos morcegos sofreu mutações no gene que codifica a proteína que reconhece e se liga à célula hospedeira (Enzima conversora da angiotensina II – ACE2), dando-lhe assim a capacidade de infetar células humanas (33).

O surto do MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) surgiu no Médio Oriente em 2012 e foi responsável por 2506 casos, com 862 mortes, possuindo uma taxa de letalidade de 35%, tornando-o num dos mais devastadores vírus humanos conhecidos (35,37). A literatura evidencia o aparecimento do MERS-CoV na espécie humana através da transmissão por dromedários (40). Uma vantagem para o eficaz controlo sanitário deste surto foi devido à fraca transmissão humano-humano (40). Foi a partir do surgimento destes dois vírus que a família *Coronaviridae* foi considerada relevante clinicamente (33).

ii. Epidemiologia do SARS-CoV-2

O aparecimento de pessoas infetadas com o novo coronavírus surgiu, pela primeira vez, em Wuhan, na China, em dezembro de 2019 e a doença despoletada pelo SARS-CoV-2 foi denominada *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) e é caracterizada por um síndrome respiratório agudo severo (41).

A origem do surto ainda não está esclarecida, mas parece estar relacionada com um mercado de animais vivos em Wuhan, pois os primeiros casos de pneumonia aconteceram em pessoas que frequentaram esse mercado (42). Através da sequenciação do genoma viral, conclui-se que o reservatório do vírus são os morcegos, mas acredita-se que a transmissão para os humanos foi através de um hospedeiro intermediário, ainda não totalmente definido (43).

Rapidamente o vírus se alastrou a todo o mundo, tendo sido decretada pandemia a 11 de março de 2020 (41). Este novo coronavírus apesar de ter uma virulência e taxa de mortalidade menor que o SARS-CoV, tornou-se numa pandemia muito mais severa, devido ao elevado nível de contágio (36).

As complicações clínicas provocadas por este vírus são, por norma, mais severas em pessoas com mais de 65 anos e pessoas com outras patologias associadas, como hipertensão, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crónica e doença cardiovascular (44).

A 27 de outubro de 2020 pelas 15h11, a nível mundial, o número de casos reportados encontrava-se nos 43 341 451, casos fatais de 1 157 509, tendo uma taxa de letalidade de 2,67%. Portugal apresentava 121 133 casos, dos quais 2 343 óbitos, sendo a taxa de letalidade de 1,93% (45,46).

iii. Mecanismo de infeção do SARS-CoV-2

O genoma do SARS-CoV-2 partilha 79,5% de similaridade com o SARS-CoV, estando a principal diferença associada à glicoproteína S e explicando assim as diferenças epidemiológicas e clínicas entre as doenças que provocam (36). O recetor celular deste vírus é a enzima conversora da angiotensina II (ACE2) (47). A localização da ACE2 explica o tropismo viral, estando esta molécula mais presente no aparelho respiratório, mas também em outros locais do organismo, como no intestino, rins, sistema nervoso central e coração (48,49). Além da existência deste recetor nas células, o vírus também precisa de uma protease celular para a sua clivagem e posterior entrada na célula (47).

A eficiência de infecção do SARS-CoV-2 pode ser explicada pela maior afinidade para a ACE2, pela menor exposição da proteína S à superfície do vírus (e assim melhor capacidade de escape ao sistema imune) e por fim, pela presença de um local de clivagem furina que diminui a necessidade de uma protease celular para a clivagem do vírus e sua entrada na célula (47). A furina é uma protease presente no organismo humano que realiza a clivagem necessária ao vírus para conseguir entrar na célula hospedeira, mesmo antes da sua ligação, levando a que o processo ocorra mais facilmente (50).

Durante a replicação deste vírus é formada uma poliproteína diretamente da cadeia (+)ssRNA onde estão presentes proteínas precoces e essenciais para a replicação viral, como a RNA polimerase RNA dependente (RdRp) (38). Os passos seguintes consistem na replicação do genoma e na produção de proteínas estruturais para constituição de novas partículas virais (38).

iv. Manifestações clínicas do SARS-CoV-2

As principais manifestações clínicas da COVID-19 são febre, tosse seca, dispneia, fadiga, dores musculares e sintomas menos comuns incluem dor de garganta, rinorreia, expetoração e diarreia (43). Em estados graves da doença, o desenvolvimento de pneumonia com agravamento da capacidade respiratória e disfunção de múltiplos órgãos pode mesmo culminar num desfecho fatal (43). Os sintomas não sendo muito específicos, principalmente no início da doença, fazem com que a transmissão pessoa-a-pessoa aconteça rapidamente (35). Apesar de toda esta possibilidade de sintomas, existem infecções assintomáticas que, juntamente com a falta de sintomas durante o período de incubação da doença, são os principais fatores responsáveis pelo descontrolo e velocidade da propagação deste vírus (43,51). O período de incubação do vírus varia entre 1 a 14 dias, sendo a média de 3 a 7 dias (52). O período que uma pessoa infetada, sendo sintomática ou assintomática, excreta o vírus é em média de 20 dias (52).

A nível laboratorial, uma série de marcadores inflamatórios estão aumentados, como a CRP, ferritina, velocidade de sedimentação e citocinas pró-inflamatórias e em casos mais graves da doença, pode observar-se linfopenia devido à compartimentação dos linfócitos nos locais afetados (51,53).

v. Transmissão do SARS-CoV-2

O conhecimento da forma de transmissão deste vírus foi desde cedo a principal preocupação, devido à urgente necessidade do controlo da disseminação.

O vírus além de detetado em produtos biológicos do trato respiratório, também já foi detetado nas fezes, sangue e urina, mas formas de transmissão, como fecal-oral, vertical ou sexual ainda estão em estudo (49).

A forma de transmissão do vírus é maioritariamente por contacto direto pessoa-a-pessoa, através de gotículas respiratórias e saliva, mas também ocorre por contacto com superfícies infetadas e por formação de aerossóis (51). Como já referido anteriormente, a excreção do vírus por pessoas assintomáticas é um fator preponderante na rápida e “silenciosa” disseminação deste vírus (52). Além disto, fatores que contribuem para a maior transmissão deste vírus são a doença prolongada e níveis baixos de anticorpos (47). A transmissão em ambiente hospitalar tem sido, ainda, associada à formação de aerossóis aquando a execução de procedimentos médicos respiratórios, sendo este um importante momento de contágio (49).

Dado o conhecimento atual, a melhor forma de evitar a transmissão, além de permanecer em casa o maior tempo possível, é respeitar as regras de segurança definidas pelas autoridades de saúde, tais como: manter distância de segurança, não reunir com pessoas fora do núcleo familiar, uso de máscara, desinfeção de mãos regularmente e evitar levar as mãos ao nariz e boca. Quanto às pessoas infetadas, o seu isolamento é obrigatório, sendo sintomáticas ou assintomáticas.

vi. Métodos de diagnóstico laboratorial

O método de deteção de referência do genoma viral é o qRT-PCR (*Real-Time Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), em que há pesquisa de pelo menos dois genes específicos do SARS-CoV-2 (54), sendo um método sensível, específico e rápido (53). Os genes alvo que podem ser utilizados para a deteção do vírus são o gene N (codifica a nucleoproteína), o gene E (codifica a proteína E do invólucro), o gene S (codifica a espícula) ou o gene RdRp (codifica a RNA dependente RNA polimerase) (54).

Um caso de COVID-19 considera-se laboratorialmente confirmado, quando o resultado do qRT-PCR é positivo para pelo menos dois alvos distintos do genoma, dos quais pelo menos um é específico do novo coronavírus (54).

A recuperação da infeção é dada pela existência de um teste negativo, realizado após 14 dias de vigilância sem qualquer sintoma (55).

Os testes indiretos, utilizados na pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 não estão recomendados para o diagnóstico da COVID-19 e devem ser utilizados com precaução, uma vez que ainda não é conhecida o tipo e duração dos anticorpos formados durante a infeção e não é possível inferir sobre a sua capacidade neutralizante e/ou capacidade de induzir imunidade (54). A realização destes testes serve para estudos epidemiológicos populacionais, de investigação e para monitorizar a imunidade da população (56).

II.2 - CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

i. Considerações Gerais

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19) resultou de uma adaptação do Laboratório de Análises Clínicas da FFUC face à situação pandémica na qual todos nos encontramos. O laboratório preparou-se e equipou-se de forma a dar resposta às exigências impostas pela circulação do novo coronavírus. Em abril de 2020 o laboratório começou a prestar serviço à comunidade, através da solidariedade de voluntários experientes na área, e assim assegurar a testagem da zona centro de Portugal. Atualmente o laboratório funciona por turnos de equipas de pessoas contratadas, os sete dias da semana.

A direção técnica do laboratório é assegurada pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pela Dra. Patrícia Madaleno, que têm como principal função a chefia do laboratório e a validação biopatológica dos resultados. A nível da prática laboratorial, a multidisciplinariedade dos colaboradores é evidente, tendo biólogos e bioquímicos investigadores, bem como técnicos superiores em Análises Clínicas. A parte burocrática do laboratório e a disponibilização dos materiais laboratoriais são asseguradas pelas assistentes administrativas.

O horário de funcionamento laboratorial é de segunda a sábado das 8h às 00h e domingo das 13h às 22h. As colheitas realizam-se durante as manhãs ou tardes, sendo feitas por enfermeiras ou técnicas de Análises Clínicas.

ii. Organização Laboratorial

O laboratório é dividido em zona de receção, secretaria, antecâmara para colocação de equipamento de proteção individual, antecâmara da sala de inativação, sala de inativação, área de extração, sala de amplificação, zona de validação de resultados, sala com frigoríficos para armazenamento de amostras, espaço administrativo, vestiários e armazém de materiais.

As amostras que chegam todos os dias ao laboratório têm proveniência de diversos locais da zona Centro de Portugal, sendo eles o CHUC (Centro Hospital da Universidade de Coimbra), IPO (Instituto Português de Oncologia de Coimbra), Rovisco Pais (Centro de Medicina de Reabilitação da Região Centro), Dão-Lafões (Agrupamento de centros de saúde do Dão-Lafões), ARSC (Administração de Saúde Regional da Zona Centro) e Medicina Legal. Outro tipo de amostragem com carácter menos urgente é designado como “Genérico” que abrange pessoas que são testadas com finalidade de viagem para a Madeira ou Açores, associações desportivas, federações portuguesas e pessoas a título particular. A média de amostras diárias recebidas no laboratório está entre 400 a 500.

Os principais aparelhos usados neste laboratório são os extratores automáticos *Abbott m2000sp* que efetuam a extração de RNA e preparam a mistura para a realização do qRT-PCR e os termocicladores *Abbott m2000rt* responsáveis pela amplificação e deteção do RNA viral.

As análises serológicas são realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da FFUC e o aparelho utilizado é o imunoanalisador *VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)*, da *Biomérieux*.

iii. Gestão Laboratorial

Os cuidados com a prevenção e controlo de infeção por SARS-CoV-2 neste tipo de laboratório são redobrados e extremamente necessários. O lema pelo qual todos os trabalhadores se regem, como deve ser qualquer lema num laboratório de microbiologia, é: não ser contaminado e não contaminar. Este laboratório é um laboratório de nível de biossegurança 3 (BSL-3), o que permite trabalhar com microrganismos altamente patogénicos, ou seja, que causam doença grave ao ser humano e são facilmente transmitidos de pessoa para pessoa (57). As amostras com o vírus ativo são trabalhadas numa câmara de fluxo laminar classe II, que permite o trabalho com amostras biológicas potencialmente perigosas, assegurando a proteção necessária do operador, do produto e do ambiente (58). O uso

adequado de desinfetantes é um ponto importantíssimo neste tipo de laboratório sendo o etanol e a lixívia os produtos de eleição (59).

Relativamente à secção da inativação do vírus, realizada numa sala com pressão negativa, o uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual) é essencial, consistindo num fato de proteção integral, duas proteções de calçado em cada pé, máscara FFP2, óculos de proteção, bata impermeável e descartável, touca e 2 pares de luvas. Este tipo de equipamento tem uma sequência de colocação específica e é essencial para assegurar a proteção e segurança individual.

A gestão dos lixos é feita diariamente e o laboratório tem resíduos sólidos dos 4 grupos de resíduos. Os lixos do Grupo I e II são resíduos equiparados a urbanos (60) e por isso são descartados para os contentores normais. O lixo de Grupo III são resíduos de risco biológico, devido à sua potencial contaminação (60) e por isso são acondicionados em contentores pretos com tampa amarela ou vermelha. O lixo de Grupo IV são resíduos específicos, como os materiais cortantes (60), e por isso são colocados em pequenos contentores amarelos com tampa vermelha e com o símbolo de risco biológico bem evidente. Os resíduos de Grupo III e IV são recolhidos e transportados por uma empresa própria e seguem para incineração (60). No que diz respeito aos resíduos líquidos perigosos, estes são colocados em recipientes próprios com a respetiva identificação do produto químico e do laboratório e também são recolhidos e transportados por uma empresa especializada. O local de armazenamento dos lixos situa-se numa área específica e diferenciada do laboratório.

II.3 - FASE PRÉ-ANALÍTICA

Em casos particulares e agendados previamente, as colheitas podem ser feitas no laboratório.

Para a deteção do genoma viral, a colheita consiste na recolha do exsudado nasofaríngeo por zaragatoa nasal. A correta colheita, correto manuseamento e acondicionamento são variáveis muito importantes para a obtenção de uma amostra com qualidade para um correto diagnóstico. O fluxo de trabalho após chegada das amostras ao laboratório é igual, independentemente do local de colheita (excetuando apenas amostras vindas do CHUC, pois estas já se encontram inativadas e seguem logo para extração). As amostras chegam agrupadas em potes, cada amostra vem num tubo devidamente identificado e fechado, e os potes são imediatamente desinfetados por etanol a 70%. Cada tubo contém o

líquido onde a zaragatoa é colocada após colheita que consiste em 1,2ml de tiocianato de guanidina num tampão Tris. O tiocianato de guanidina é um detergente caotrópico utilizado para isolamento de RNA, pois é desnaturante proteico e inibidor de RNAses (61). A vantagem deste tipo de meio é um começo da inativação viral aquando a colocação do vírus no meio de transporte. O kit de colheita para a realização da colheita nasofaríngea usado encontra-se na Figura 12.



Figura 13 - Kit de colheita (Zaragatoa + tubo com meio de transporte).
(Foto registada no laboratório).

As amostras são registadas no programa informático *Apollo* e é-lhes atribuído um número de tubo pelo qual a amostra é identificada ao longo do seu percurso pelo laboratório. Os tubos seguem para a antecâmara da sala de inativação, onde a pessoa responsável por esta zona tem como função a preparação de tubos com o líquido de inativação (750µl), enviando-os para a câmara de inativação, juntamente com as amostras. Além disto, o técnico responsável pela antecâmara da sala de inativação tem função essencial de suporte aos técnicos que se encontram na sala de inativação, fazendo-lhes chegar qualquer material em falta.

Para a deteção dos anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 a amostra necessária é o soro, sendo por isso colhida uma amostra de sangue por punção venosa para um tubo sem anticoagulante. As amostras sofrem centrifugação e o soro segue para posterior análise.

II.4 - CONTROLO DA QUALIDADE

A necessidade de controlos neste tipo de laboratório também é fundamental. Os controlos permitem emitir resultados com confiança e neste tipo de diagnóstico a sua importância ainda é acrescida. Um falso positivo pode condicionar a vida de uma pessoa e das que lhe são próximas. Um falso negativo pode comprometer a saúde do doente e de todas as pessoas do seu círculo de convivência. Para isso a realização de CQI e AEQ são cruciais.

A. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O controlo interno é fornecido pela empresa detentora dos equipamentos usados no laboratório para a realização do diagnóstico do genoma viral, a *Abbott*. O controlo interno é uma sequência de um gene da abóbora (*Cucurbita pepo*) em plasma humano negativo. Este gene em nada está relacionado com as sequências detetadas do SARS-CoV-2 e é adicionado aos reagentes durante a sua preparação para realização da extração do RNA viral. Durante o qRT-PCR, este gene é amplificado simultaneamente com os genes específicos do vírus e assim permite demonstrar que a análise ocorreu corretamente em cada amostra. Se não houver uma correta amplificação deste gene, o resultado não pode ser aceite e é necessário repetir a análise dessa amostra.

Para os testes de deteção de IgM e IgG os controlos são realizados de 28 em 28 dias, recorrendo a um controlo positivo e negativo.

B. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

O programa de AEQ permite fazer uma avaliação da exatidão dos resultados emitidos pelo laboratório. Os controlos são enviados pela entidade externa *LabQuality* e tratados como uma amostra comum, desde a sua inativação até à interpretação do resultado do RT-PCR em tempo real. Após isto, o resultado obtido é enviado ao *LabQuality* e passado algum tempo o laboratório é notificado sobre o resultado esperado da amostra enviada. Com isto, o laboratório pode conferir se o resultado que obteve é concordante e perceber se está a emitir resultados corretos.

Esta AEQ permite também comparar laboratórios diferentes que usam metodologias diferentes e perceber qual será a melhor técnica de diagnóstico a usar para a pesquisa do SARS-CoV-2. Atualmente esta averiguação ainda está sob estudo, explicada pela necessidade recente de se diagnosticar este vírus.

II.5 - FASE ANALÍTICA

a) Deteção do genoma viral

O sistema usado para o diagnóstico do SARS-CoV-2 no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19) é o *Abbott m2000 System* que recorre ao método de biologia molecular qRT-PCR para deteção qualitativa do ácido nucleico do

SARS-CoV-2 em amostras colhidas por zaragatoa nasofaríngea. As amostras são, inicialmente, sujeitas a inativação, seguida de extração do genoma viral com posterior amplificação por RT-PCR em tempo real. Esta reação de amplificação e detecção do ácido nucleico é essencial para o diagnóstico do novo coronavírus, porque o RNA presente na amostra direta pode não ser suficiente para a sua detecção. Após saída de resultado, é feita uma validação analítica pelo técnico. Esta validação entra em conta com o correto desempenho da técnica, avaliando as curvas de amplificação, eventuais falhas de controlo interno ou possíveis contaminações.

i. Inativação do vírus

O processo de inativação do vírus é crucial para o seguimento da análise laboratorial, pois permite a perda da infecciosidade viral e com isso garantir a segurança no manuseamento das amostras.

A inativação viral ocorre numa sala com pressão negativa, para garantir que nada do que está dentro da sala consegue sair, sendo a câmara de fluxo laminar o único local onde os tubos com os exsudados nasofaríngeos podem ser abertos. Os técnicos que realizam este procedimento têm de estar equipados com o equipamento de proteção individual que foi especificado na secção “Caraterização do Laboratório – Gestão Laboratorial”. Após entrada dos técnicos na câmara de inativação, todas as superfícies são desinfetadas com álcool a 70%. A câmara de fluxo laminar também é desinfetada com álcool a 70%, assim como todo o material necessário ao procedimento de inativação.

A inativação do vírus baseia-se na passagem de 750 µl da amostra em meio de transporte para os tubos com o líquido de inativação, seguidos de uma correta homogeneização no *vortex* e um período de incubação de 10 minutos. O líquido de inativação tem composição semelhante ao meio de transporte, mas apresenta maior concentração do composto tiocianato de guanidina, para uma efetiva inativação viral. A sua composição está referida no Anexo II.

Durante todo este processo é essencial a presença de uma gaze embebida em álcool a 70% para sucessivas passagens de álcool nas mãos e superfícies de tubos. Tudo o que sai da câmara tem de estar bem desinfetado. Após este procedimento, as amostras inativadas podem sair da sala de inativação e seguem para extração de RNA.

Após inativação de todas as amostras, a câmara de fluxo laminar é desinfetada com álcool a 70%, bem como o material presente no seu interior e as lâmpadas UV são ligadas. As superfícies da sala são novamente desinfetadas, juntamente com o chão. A parte exterior do

EPI, nomeadamente touca, bata, segundo par de luvas e segundo par de proteção de calçado são descartados para o lixo de Grupo III ainda dentro da sala de inativação.

ii. Extração do RNA viral

A extração do genoma viral é feita pelo extrator automático *Abbott m2000sp*. O uso deste extrator tem como vantagem a eficiência, rapidez e facilidade de utilização. A extração incide sobre um conjunto de passos sequenciais com o objetivo final de extração e concentração do RNA viral e remoção de potenciais inibidores da amplificação das amostras.

O aparelho efetua análise por conjuntos de amostras e antes de cada corrida é necessário proceder à preparação do extrator, montando e repondo todo o material necessário. Os reagentes usados na extração são preparados antes de cada corrida, sendo eles o *Lysis*, *Wash 1*, *Wash 2*, *Micropartículas* e *Elution buffer* (Anexo I).

A existência de controlos é de elevada importância, pois são eles que permitem a validação da corrida. O controlo interno é adicionado aquando a preparação da solução de lise e, como já referido anteriormente, corresponde a um gene de abóbora que vai estar presente em cada amostra e assim permitir validar o seu resultado. O controlo negativo não contém os genes detetados do SARS-CoV-2 e é usado para controlo de contaminação. O controlo positivo contém os genes detetados do vírus e serve para certificar que a presença do SARS-CoV-2 está de facto a ser detetada. Além dos controlos, em cada corrida também se coloca uma água isenta de RNAses para aumentar o controlo de contaminação. Todos estes controlos são processados exatamente da mesma forma que uma amostra, para fornecer sustento à interpretação e validação da corrida. A composição dos controlos encontra-se no Anexo II.

O método de extração consiste na lise do vírus pelo tiocianato de guanidina que é um constituinte do reagente *Lysis*. Após a desintegração viral o RNA fica exposto e liga-se às micropartículas que sujeitas a um campo magnético capturam o RNA para o fundo do tubo de extração. Os inibidores e compostos não específicos são removidos pelas soluções *Wash*. Por fim, o RNA é eluído das micropartículas pelo *Elution buffer* e transferido para uma placa de 96 poços.

iii. Preparação para o qRT-PCR

A preparação para a reação de amplificação consiste na mistura do RNA extraído com os elementos essenciais à realização do qRT-PCR. O kit de reagentes de amplificação (Anexo II) contém uma rTth polimerase, dNTPs, reagente de ativação contendo manganês, seis *primers*

(quatro primers relativos aos genes alvos do vírus e dois complementares ao gene do controle interno), três sondas (duas sondas respectivas aos dois genes detetados do vírus e uma sonda para o gene do controle interno) e uma molécula fluorescente (ROX).

A rTth polimerase é uma enzima termoestável, derivada do *Thermus thermophilus* (62). Apresenta atividade polimerase 5' para 3', além de funcionar como transcriptase reversa e exonuclease 5' para 3', necessitando para isso do cofator manganês (62,63). Assim, esta enzima permite o RT-PCR numa única etapa, incluindo a transcrição reversa e as etapas de extensão do PCR.

iv. qRT-PCR

A amplificação é realizada no termociclador *Abbott m2000rt*. Este método baseia-se na detecção qualitativa de dois genes específicos e altamente conservados do SARS-CoV-2: o gene RdRp e o gene N.

O qRT-PCR inicia-se pela ação de transcriptase reversa da rTth polimerase, em que sintetiza uma cadeia complementar ao ssRNA viral, o cDNA. Este cDNA através da atividade polimerase 5' para 3' da rTth polimerase passa a dsDNA e as etapas comuns do PCR prosseguem. Os ciclos de amplificação consistem em três etapas, sendo elas a desnaturação das cadeias complementares, o emparelhamento dos primers com as sequências alvo e a extensão das cadeias complementares pela ação da atividade polimerase 5' para 3' da rTth polimerase. No fim de 37 ciclos, obtém-se uma amplificação exponencial, resultando em milhares de milhões de cópias do DNA inicial.

O método de detecção dos genes recorre ao uso de sondas fluorescentes (sondas *TaqMan*) em que há a emissão de fluorescência dependente da sua hidrólise e quando excitadas por um comprimento de onda específico. Estas sondas são oligonucleótidos sintéticos complementares a uma fração interna do gene alvo e apresentam, ligados covalentemente, na extremidade 5' um fluoróforo e na extremidade 3' um quencher. No caso da ausência do gene alvo, a sonda permanece intacta e a fluorescência emitida pelo fluoróforo é absorvida pelo quencher. Quando os genes alvos estão presentes, a sonda hibridiza com a sequência complementar. Na etapa de extensão do PCR, a rTth polimerase com atividade exonuclease 5' para 3' procede à hidrólise da sonda e com isso o fluoróforo e o quencher ficam separados fisicamente. Este afastamento permite a emissão de fluorescência pelo fluoróforo e a sua detecção por um espectralfluorómetro (33,64).

As duas sondas complementares às sequências pesquisadas do novo coronavírus têm o mesmo fluoróforo e a sonda que hibridiza com a sequência do controle interno apresenta um fluoróforo diferente. Isto permite uma detecção simultânea dos genes do vírus e do gene do controle interno.

v. Validação técnica

A validação técnica é feita após o término do qRT-PCR e baseia-se na interpretação das curvas da referência, dos controles e das amostras.

As curvas obtidas dizem respeito à fluorescência detectada pelo termociclador. Como são usados três fluoróforos diferentes, obtemos três fluorescências distintas: (a) fluorescência relativa às duas sondas complementares a genes do SARS-CoV-2; (b) fluorescência emitida pela sonda relativa ao gene da abóbora; (c) fluorescência intrínseca, sendo assegurada pela molécula fluorescente usada como referência.

Antes de se proceder à interpretação das curvas de amplificação resultantes do qRT-PCR é importante definir certos conceitos. Na Figura 13 estão evidenciados os dois parâmetros fundamentais para interpretação dos gráficos resultantes do processo de amplificação: *Threshold line (Th)* e *Cycle threshold (Ct)*. A *Th* que é uma linha que indica o nível basal a partir do qual se considera detecção de fluorescência e o *Ct* que corresponde ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência cruze a *Th* e haja assim detecção de fluorescência. Este valor pode indicar uma menor ou maior carga viral inicial. Quanto menor o *Ct*, significa que foram necessários menos ciclos de amplificação para a detecção de fluorescência, logo, a carga viral inicial era maior. Alguns estudos apontam para que um *Ct* menor possa estar associado a casos mais graves da COVID-19 (53). Esta conclusão pode nem sempre corresponder à verdade, pois a colheita, a presença de agentes inibitórios e a efetividade da extração podem influenciar este resultado.

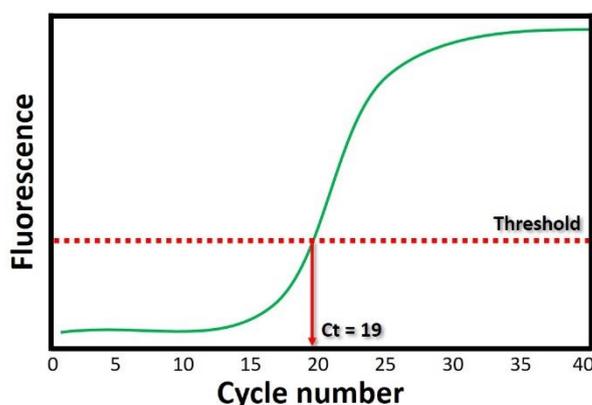


Figura 14 - Parâmetros de um gráfico simplificado de PCR em tempo real.
(Retirado de: <https://toptipbio.com/ct-value-qpcr/>)

Interpretação das curvas obtidas no fim do qRT-PCR:

➤ Referência

A curva de referência diz respeito à fluorescência intrínseca emitida pela molécula de referência ROX. Esta molécula não apresenta qualquer tipo de ligação aos componentes da reação. A sua análise permite verificar se o aparelho está calibrado e se a fluorescência está a ser detetada corretamente e de igual forma em todos os poços. Esta curva não é influenciada pela amostra, mas sim pelo correto funcionamento do aparelho e pela correta ou incorreta adição dos reagentes de amplificação.

➤ Controlo interno

A curva do controlo interno é analisada em simultâneo com a curva das amostras, e indica se houve ou não uma correta amplificação. A análise desta curva tem como função assegurar a qualidade do produto biológico (presença ou ausência de inibidores) e de todo o procedimento de diagnóstico molecular (processo de extração, adição dos reagentes de amplificação e deteção de fluorescência). Se a curva do controlo interno estiver dentro do esperado e não houver falha do controlo interno, a curva da amostra deve ser validada. Se houver alguma falha no controlo interno (Imagem 15 e 16 – Anexo III), a curva de amplificação da amostra não pode ser validada, sendo necessário proceder à sua repetição. A presença de inibidores na amostra pode ser detetada pela falha do controlo interno, dando assim a segurança do resultado obtido (62). Inibidores do PCR representam todos os compostos que possam interferir com o método e, principalmente neste caso, são exemplos o etanol e o grupo heme da hemoglobina. O etanol precipita os ácidos nucleicos e o grupo heme altera o equilíbrio iónico, interferindo assim com a atividade da polimerase e com a correta hibridização dos *primers* e sondas (65).

➤ Controlo positivo e negativo

A curva do controlo positivo e negativo servem para a validação da corrida. Se as curvas obtidas destes controlos não forem as esperadas, a corrida não pode ser validada e é necessário encontrar a fonte de erro. A curva do controlo positivo deve ter crescimento exponencial, comprovando assim a deteção dos genes virais (Imagem 17 e 18 – Anexo III). A curva do controlo negativo não deve apresentar qualquer tipo de crescimento, apresentando a curva sempre abaixo da linha *Th* (Imagem 19 e 20 – Anexo III). Através do estudo desta curva de controlo é permitido desconfiar de resultados falsos positivos que podem acontecer por uma amplificação inespecífica ou por contaminação. Devido à elevada sensibilidade deste

método de biologia molecular, este procedimento é mais vulnerável à existência de contaminação (66). A contaminação dos controlos e das amostras pode ocorrer a qualquer momento da fase analítica, sendo para isso crucial cumprir todas as regras de desinfeção dos locais de trabalho e equipamentos, e efetuar troca de luvas sempre que existir contacto com as amostras.

Além destas curvas que servem como controlo, também se analisa a curva de amplificação da água, que deve ter a mesma interpretação da curva do controlo negativo (Imagem 21 e 22 – Anexo III).

➤ Amostras

A curva de amplificação da amostra é analisada juntamente com a curva do controlo interno. Um resultado negativo apresenta o gráfico sempre abaixo da Th (Imagem 23 e 24 – Anexo III). Um resultado é considerado positivo quando há deteção de fluorescência na amostra, representado por um crescimento da curva que ultrapassa a Th (Imagem 25 e 26 – Anexo III). Quando o Ct é maior que 31,5, não é considerado um resultado positivo, mas a sua interpretação deve ser analisada, pois pode existir efetivamente carga viral. Se o crescimento da curva for acentuado, podemos estar perante um caso de infeção recente ou de infeção quase recuperada. A decisão passa pela repetição da análise da amostra. Se a segunda análise tiver o mesmo resultado, sugere-se nova colheita, pois se for um caso de infeção recente, quando for colher novamente já passaram alguns dias e a infeção já estará instalada. Se o caso for de infeção quase curada, a passagem de alguns dias pode fazer com que a infeção cure verdadeiramente e o vírus já não seja de todo detetado. Um resultado é dado como inconclusivo quando existe uma amplificação tardia ($Ct > 31,5$), falha do controlo interno ou curva com padrão atípico. Este tipo de curva atípica (Imagem 27 e 28 – Anexo III) pode acontecer por presença de inibidores, existência de contaminação ou ligação a algo inespecífico.

A sensibilidade do qRT-PCR é um fator muito importante e, apesar do limite de sensibilidade ser baixo, existem efetivamente valores de carga viral que podem não ser detetados. Neste caso estamos perante um falso negativo e isto pode acontecer em infeções iniciais ou em infeções quase recuperadas. Exemplos de outros fatores que podem originar falsos negativos são presença de agentes inibitórios, má qualidade da amostra e ineficácia da extração e do qRT-PCR. Relativamente aos falsos positivos, estes podem ser derivados de situações de contaminação ou de amplificação inespecífica.

b) Detecção serológica

O estudo da presença de anticorpos IgM e IgG para o SARS-CoV-2, em pessoas infetadas ou com infeção passada provocada pelo novo coronavírus, tem sido uma área de grande interesse e estudo porque o conhecimento do desenvolvimento de imunidade humoral ou celular ainda é pouco conhecido.

Os testes serológicos, apesar de automatizados e rápidos, não podem ser usados como método de diagnóstico, pois a resposta imunológica só é detetada a partir da segunda semana de infeção (56). Para além disto, não existem evidências que permitam concluir sobre a natureza e duração dos anticorpos formados e se estes conferem imunidade de longa duração (56).

A amostra para a realização deste teste é o soro e o equipamento utilizado no laboratório para a pesquisa destes anticorpos é o imunoanalisador VIDAS que se baseia num método imunoenzimático tipo *sandwich* com deteção final por fluorescência (*ELFA – Enzyme-Linked Fluorescent Assay*). No ensaio tipo *sandwich*, os anticorpos procurados ligam-se aos antígenos imobilizados na matriz sólida. A existência de um anticorpo secundário marcado com um substrato enzimático liga-se ao complexo antígeno-anticorpo anteriormente formado. A adição da enzima permite a alteração do substrato enzimático com emissão de fluorescência detetada pelo aparelho. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo na amostra (64).

A Figura 14 mostra os diferentes resultados possíveis obtidos por diferentes métodos de deteção de infeção pelo SARS-CoV-2 ao longo da evolução da doença.

Testes	Resultados				
RNA Viral (RT-PCR ou rRT-PCR)	+	+	+	+	-
Antigénio	- ^{a)}	+	+	+	- ^{a)}
Anticorpos IgM	-	-	+ ^{b)}	+ ^{b)}	-
Anticorpos IgG	-	-	-	+ ^{b)}	+ ^{b)}
	Pré-sintomas	Infeção instalada		Infeção passada	

Evolução da COVID-19 (tempo decorrido) →

- a) A sensibilidade diagnóstica do teste é muito importante para evitar resultados falsos negativos
 b) A especificidade diagnóstica do teste é muito importante para evitar resultados falsos positivos

Figura 15 - Métodos de deteção do SARS-CoV-2 ao longo da evolução da infeção. Tabela adaptada de (56).

A detecção por biologia molecular é a que permite o diagnóstico de infecção ativa e os testes serológicos permitem a detecção de anticorpos que aparecem já mais tarde durante a infecção e podem perdurar após a sua resolução. A associação da presença de RNA viral com IgM ou IgG pode indicar-nos se a infecção ativa é mais recente ou prolongada, respetivamente. Os anticorpos não servem para identificar uma fase recente de infecção porque a resposta imunológica ainda se está a formar, mas com o passar do tempo, títulos de IgM são detetados e mais tarde IgG.

Muitos estudos estão a ser feitos de modo a esclarecer a interação do SARS-CoV-2 com o sistema imune, apesar de ainda incidirem num pequeno número de doentes. Tem sido documentado que cada paciente pode apresentar uma cinética diferente de anticorpos (67), existindo mesmo pessoas sem desenvolvimento de resposta humoral (68). A formação de anticorpos varia de acordo com os sintomas e severidade da doença, sendo os casos de maior gravidade clínica que apresentam maior título de anticorpos, mas esta existência de maior quantidade de anticorpos nem sempre se correlacionam com melhoria clínica (68,69). Comparando pacientes sintomáticos com IgM e sem IgM, os que desenvolvem anticorpos têm um menor tempo de positividade do genoma viral no qRT-PCR, menor tempo de excreção do vírus e apresentam um menor agravamento clínico (69). Quanto à resposta imunológica celular, existem evidências que suportam o papel dos linfócitos T na memória imunológica após recuperação da COVID-19 (70).

Relativamente à eficácia da imunidade e à possibilidade de reinfeção, foi feito um estudo animal que sugere que a recuperação da COVID-19 pode conferir imunidade contra reinfeção, pelo menos temporariamente (68). Já foram documentados casos de pessoas que estiveram infetadas, recuperaram e passado algum tempo voltaram a testar positivo para o RNA do SARS-CoV-2 (71). A existência de uma reinfeção parece pouco provável, levando em consideração o que se sabe sobre a duração de neutralização viral de outras doenças respiratórias (72). Quem testa novamente positivo são geralmente jovens com doença ligeira, não apresentam progressão da doença e não são infecciosos (72,73). Segundo alguns autores, esta situação pode dever-se a situações de reinfeção, da presença latente do vírus no corpo, da presença residual de RNA viral de vírus já fragmentados ou por um resultado falso negativo aquando o resultado do teste que permitiu declarar a pessoa como recuperada (71,73,74).

Apesar disto, acredita-se que o estudo serológico será importante no futuro, pois vai permitir identificar pessoas que já estiveram expostas ao vírus, perceber se desenvolveram resposta imunológica humoral e se esta perdura.

II.6 - FASE PÓS-ANALÍTICA

A fase pós-analítica consiste na validação biopatológica dos resultados por um especialista em Análises Clínicas. O especialista valida e assina o boletim de resultados que sai para o utente, médico ou autoridades de saúde, de acordo com a prescrição inicial do teste. Todos os resultados obtidos são de notificação obrigatória ao Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE).

vi. Validação biopatológica

A validação biopatológica dos resultados obtidos por qRT-PCR é realizada no *Apollo* e consiste na validação dos resultados com integração de historial laboratorial e se possível, clínico. Os resultados possíveis são “detetado” (ou positivo), “não detetado” (ou negativo) ou “inconclusivo”. Em casos positivos, o especialista tenta perceber se é um caso novo ou um caso já conhecido. Este estudo é importante pois permite a noção do crescimento de novos casos ou do tempo que uma pessoa permanece infetada. Um resultado positivo não invalida uma infeção bacteriana ou coinfeção com outros vírus. No caso de resultados negativos, não significa que o vírus não esteja presente, simplesmente pode não ter sido detetado. Por isso, estes resultados devem sempre ser interpretados juntamente com observações clínicas, história clínica e informação epidemiológica. Nos casos de inconclusivo, o resultado é emitido como inconclusivo e é sugerida nova colheita.

Relativamente à validação dos testes serológicos, esta é feita como uma análise normal num laboratório de Análises Clínicas, podendo ser interpretada com alguma informação clínica disponível e/ou com algum resultado de outra análise requerida.

CONCLUSÃO

A realização deste estágio curricular no fim do ciclo de estudos do Mestrado em Análises Clínicas, além de proporcionar competências práticas, permitiu conhecer a realidade da gestão de um laboratório de Análises Clínicas e cimentar toda a importância da componente teórica apreendida ao longo do 1º ano. O saber fazer não chega, o saber porquê é essencial.

Esta experiência laboratorial trouxe-me melhorias significativas, tanto a nível profissional, pessoal, bem como intelectual. O meu sentido de organização, responsabilidade e trabalho em equipa foram extremamente fomentados.

A principal vantagem que vivenciei neste meu percurso de estágio foi o reforço da noção da interdisciplinaridade das Análises Clínicas, juntamente com a importância de um forte espírito crítico.

O principal problema que senti é a falta de comunicação entre médico e laboratório. A ausência de história clínica e a dificuldade de diálogo com os clínicos, torna, algumas vezes, a interpretação dos resultados dúbia e não esclarecedora. Esta comunicação só seria benéfica para ambos os lados, saindo o utente a ganhar.

A fase em que este estágio se realizou foi, com alguma certeza, o período mais atípico que viverei. O surgimento do SARS-CoV-2 na China, como qualquer notícia longínqua, não nos traz a noção da verdadeira gravidade. Começou longe, mas rapidamente se emancipou para perto e trouxe o medo, incerteza e principalmente, a responsabilidade social à vida de cada um de nós. Como que apanhados de surpresa por uma guerra invisível, fomos trancados em casa para o bem de todos. A pasta de saúde pública foi entregue a cada um de nós. Foi-nos dito que cada um podia ajudar nesta batalha. Ficando simplesmente em casa. Afastando-se de quem ama, privando-se do toque, beijo e abraço. Tempo estranho este.

Com o confinamento social ao qual fomos impostos, o meu estágio foi interrompido e cancelado. Passados quatro meses de confinamento e sem expectativas para o meu futuro académico, surgiu a oportunidade de estagiar no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19). Como que uma grande janela se abrisse, aceitei o desafio de poder estar na linha da frente em plena situação de pandemia. Dotado de aprendizagens, espírito de equipa e pessoas surpreendentes, o amor, orgulho e reconhecimento pela minha futura profissão renasceu.

A lição que levo desta fase da minha vida é, não muito diferente do que em que um lema de vida se deve basear, que os contratempos surgem, que os desafios assustam, que as

incertezas corroem, mas que as oportunidades chegam. Dar e fazer o melhor de mim, ter vontade de ir mais além e ter noção de evolução contínua foram, sem dúvida, os meus alicerces para concluir este ciclo da minha vida.

BIBLIOGRAFIA

1. Saurav Patra MD, Brijesh Mukherjee* AK Das. Pre-Analytical Errors in the Clinical Laboratory and How To Minimize Them. *Int J Bioassays*. (2013);2(3):551–3.
2. San Miguel JF, Sánchez-Guiko FM. *Hematología Manual básico razonado*. Elsevier; (2009). 300 p.
3. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand*. 7th ed. Artmed; (2018). 356 p.
4. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. 7th ed. Elsevier; (2016). 1726 p.
5. Hoffman R, Benz J. E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, et al. *Hematology Basic Principles and Practice*. 7th ed. Elsevier; (2018). 2650 p.
6. DGS. Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto. Norma nº 30 da DGS Portugal; (2015)p. 1–37.
7. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13th ed. Elsevier; (2016). 1046 p.
8. Bain BJ. *Blood Cells A Practical Guide*. 5th ed. Wiley Blackwell; (2015). 504 p.
9. Ciesla B. *Hematology in Practice*. F. A. Davis Company; (2007). 368 p.
10. Lippi G, Favaloro EJ. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. *Clin Chem Lab Med*. (2018);56(7):1035–45.
11. Hrachovinova I. Diagnostic strategies in disorders of hemostasis. *Vnitr Lek*. (2018);64(5):537–44.
12. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg*. (2006);61(5):213–9.
13. Lasne D, Jude B, Susen S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anesth*. (2006);53(2):2–11.
14. De Groot PG. The role of von Willebrand factor in platelet function. *Semin Thromb Hemost*. (2002);28(2):133–8.
15. Moffat KA, Lewis CW. Laboratory Monitoring of Oral Vitamin K Anticoagulation. *Semin Thromb Hemost*. (2017);43(3):245–52.

16. Ahn HL, Jo Y Il, Choi YS, Lee JY, Lee HW, Kim SR, *et al.* EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. Vol. 17, The Korean journal of internal medicine. (2002). p. 65–8.
17. Lin J, Luo Y, Yao S, Yan M, Li J, Ouyang W, *et al.* Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *J Clin Lab Anal.* (2015);29(5):419–26.
18. Aggarwal S, Nayak DM, Manohar C. Discrepancy in Optical & Mechanical Method in Coagulation Tests in a Turbid Sample. *Indian J Hematol Blood Transfus.* (2014);30(Sept):402–4.
19. Ng VL. Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay Considerations. *Clin Lab Med* (2009);29(2):253–63. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.05.002>
20. Klack K, de Carvalho JF. Vitamina K: Metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina. *Rev Bras Reumatol.* (2006);46(6):398–406.
21. Keeling DM, Baglin T, Tait C, Watson H, Perry D, Baglin C, *et al.* Guidelines on oral anticoagulation with warfarin - fourth edition. *Br J Haematol.* (2011);154(3):311–24.
22. Favaloro EJ, Lippi G. Hemostasis and Thrombosis Methods and Protocols. Humana Press; (2017). 550 p.
23. Tishkowski K, Gupta V. Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. (2020). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
24. Hashemi R, Majidi A, Motamed H, Amini A, Najari F, Tabatabaey A. Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement Using as a Rapid Alternative to the Westergren Method. *Emerg (Tehran, Iran)* (2015);3(2):50–3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26495381> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4614602>
25. Bain B, Bates I, Laffan M, Lewis S. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed. Churchill Livingstone; (2011). 668 p.
26. Crowson CS, Rahman MU, Matteson EL. Which measure of inflammation to use? A comparison of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements from randomized clinical trials of golimumab in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*

- (2009);36(8):1606–10.
27. Litaó MKS, Kamat D. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: How best to use them in clinical practice. *Pediatr Ann.* (2014);43(10):417–20.
 28. DGS. Profilaxia da Isomimunização Rh. Normativa Circular DGS Portugal; (2007).
 29. Ewald DR, Sumner SCJ. Blood type biochemistry and human disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* (2016);8(6):517–35.
 30. George F, Moura H. Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco. Norma da Direção-Geral da Saúde. (2013);37:1–4.
 31. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica.* 7th ed. Elsevier; (2014).
 32. Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM, Enquist LW. *Principles of Virology.* 4th ed. ASM Press; (2015). 1060 p.
 33. Ryu W-S. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses.* Elsevier, editor. Sara Tenney; (2017). 411 p.
 34. Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. www.thelancet.com/infection. (2020);20(April).
 35. Chen B, Tian EK, He B, Tian L, Han R, Wang S, *et al.* Overview of lethal human coronaviruses. *Signal Transduct Target Ther.* (2020);5(1).
 36. Rossi GA, Sacco O, Mancino E, Cristiani L, Midulla F. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. *Infection* [Internet]. (2020);1–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01486-5>
 37. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turkish J Med Sci.* (2020);50(SI-1):549–56.
 38. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* (2020);42(1):3–11.
 39. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* (2020);382(8):727–33.
 40. Omrani AS, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle east respiratory syndrome coronavirus (Mers-coV): Animal to human interaction. *Pathog Glob Health* (2015);109(8):354–62.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/20477724.2015.1122852>.

41. Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2; coronavirus disease-19). *Clin Exp Pediatr.* (2020);63(4):119–24.
42. Al-Qahtani AA. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Emergence, history, basic and clinical aspects. *Saudi J Biol Sci.* (2020).
43. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Le Infez Med.* (2020);2:174–84.
44. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res.* (2020);7(11).
45. (WHO) WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard (2020) [cited 2020 Sep 20]. Disponível em: <https://covid19.who.int/>
46. WHO. Estimating mortality from COVID-19. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Mortality-2020.1>. (2020).
47. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2020);117(21).
48. Mönkemüller K, Fry LC, Rickes S. COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. *Rev Esp Enfermedades Dig.* (2020);112(5):383–8.
49. Patel KP, Vunnam SR, Patel PA, Krill KL, Korbitz PM, Gallagher JP, *et al.* Transmission of SARS-CoV-2: an update of current literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2020);
50. Fakhry A, Ye J, Kamel A, Mishriky F. A multicenter consensus: A role of furin in the endothelial tropism in obese patients with COVID-19 infection. *Obes Med.* (2020);19(January).
51. Shi Y, Wang G, Cai X, Deng J, Zheng L, Zhu H, *et al.* An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ B (Biomedicine Biotechnol.* (2020);21(5):343–60.
52. Peng M. Outbreak of COVID-19: An emerging global pandemic threat. *Biomed Pharmacother.* (2020);129.
53. Silva SJR, Silva CTA da, Guarines KM, Mendes RPG, Pardee K, Kohl A, *et al.* Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *ACS Infect Dis.*

- (2020).
54. Direção-Geral da Saúde. COVID-19: Diagnóstico Laboratorial. Portugal; (2020) p. 1–7.
 55. Direção Geral de Saúde. Abordagem de Assintomático com Teste Laboratorial Positivo. (2020) p. 1–7.
 56. DGS. Testes laboratoriais para SARS-CoV-2; Testes rápidos. Portugal; (2020) p. 10. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Overview-rapid-test-situation-for-COVID-19-diagnosis-EU-EEA.pdf>
 57. Mourya D, Yadav P, Majumdar T, Chauhan D, Katoch V. Establishment of Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory: Important criteria to consider while designing, constructing, commissioning & operating the facility in Indian setting. *Indian J Med Res.* (2014);140(2):171–83.
 58. Galvão H. Classificação, selecção e instalação de câmaras de fluxo laminar. Portugal: Ministério da Saúde; (2005) p. 30.
 59. WHO. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). WHO. (2020). Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2
 60. DGS. Resíduos hospitalares (documento de orientação). Portugal; (2013) p. 45. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/residuos-hospitalares-pdf.aspx>
 61. Pei Y, Mamtimin T, Ji J, Khan A, Kakade A, Zhou T, et al. The guanidine thiocyanate-high EDTA method for total microbial RNA extraction from severely heavy metal-contaminated soils. *Microb Biotechnol.* (2020).
 62. Cai D, Behrmann O, Hufert F, Dame G, Urban G. Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. *PLoS One.* (2018);13(1).
 63. Auer T, Landre PA. Properties of the 5'→3' Exonuclease/Ribonuclease H Activity of *Thermus Thermophilus* DNA Polymerase. *Biochemistry.* (1995);34(15):4994–5002.
 64. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; (2010). 193–195 p.
 65. Hedman J, Radstrom P. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. In: Wilks M, editor. *Methods in Molecular Biology.* 2nd ed. (2013).

66. Aslanzadeh J. Brief review: Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci.* (2004);34(4):389–96.
67. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the Immune System. *Physiol Res.* (2020);69:379–88.
68. Kirkcaldy RD, King BA, Brooks JT. COVID-19 and Postinfection Immunity. *Am Med Assoc.* (2020);323(22):2245–6.
69. Lee Y-L, Liao C-Hu, Liu P-Y, Cheng C-Y, Chung M-Y, Liu C-E, *et al.* Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *J Infect.* (2020);81:55–8.
70. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol.* (2020);20(9):529–36. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>
71. Law SK, Leung AWN, Xu C. Is reinfection possible after recovery from COVID-19? *Hong Kong Med J.* (2020);26(3):264–5.
72. Roy S. COVID-19 Reinfection: Myth or Truth? *SN Compr Clin Med.* (2020);2(6):710–3. Disponible em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L2005110099%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/s42399-020-00335-8>
73. Kang H, Wang Y, Tong Z, Liu X. Retest positive for SARS-CoV-2 RNA of “recovered” patients with COVID-19: Persistence, sampling issues, or re-infection? *J Med Virol.* (2020);2:10–2.
74. Jabbari P, Rezaei N. With Risk of Reinfection, Is COVID-19 Here to Stay? *Disaster Med Public Health Prep.* (2020).
75. Cotter SM. *Hematology.* Teton NewMedia; (2001). 150 p.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela com os diferentes parâmetros avaliados no hemograma e seus respectivos intervalos de referência, para pessoas adultas, usados no LAC-Gaia.

Parâmetro	Sexo	Valor Referência
RBC (x 10¹²/L)	M	4,31 - 6,40
	F	3,85 - 5,20
HGB (g/dL)	M	13,6 - 18,0
	F	11,5 - 16,0
HTC (%)	M	39,8 - 52,0
	F	34,7 - 46,0
VCM (fL)	M/F	80,0 - 97,0
HCM (pg)	M/F	26,0 - 34,0
CHCM (g/dL)	M/F	32,0 - 36,0
RDW (%)	M/F	11,5 - 15,0
PLT (x 10⁹ /L)	M/F	140 - 440
WBC (x 10⁹ /L)	M/F	4,0 - 10,0
NEU (x 10⁹ /L) (%)	M/F	1,5 - 8,0
	M/F	37,5 - 80,0
LYM (x 10⁹ /L) (%)	M/F	0,8 - 4,0
	M/F	20,0 - 40,0
MONO (x 10⁹ /L) (%)	M/F	0,0 - 1,2
	M/F	0,0 - 12,0
EOS (x 10⁹ /L) (%)	M/F	0,0 - 0,3
	M/F	0,0 - 3,0
BASO (x 10⁹ /L) (%)	M/F	0,0 - 0,3
	M/F	0,0 - 3,0

ANEXO II

Composição do líquido de inativação:

- ✓ 4,7 M de tiocianato de guanidina
- ✓ 1 M Tris base
- ✓ 10% Tween20 (detergente)

Composição dos reagentes para extração:

- ✓ Lysis - 100mM de solução Tris contendo tiocianato de guanidina e detergente (70mL) + etanol absoluto (35ml) + controlo interno (1,2ml)
- ✓ Wash1 - 100mM de solução Tris contendo tiocianato de guanidina e detergente (46ml) + etanol absoluto (23ml)
- ✓ Micropartículas - 8% de micropartículas em hidrocloreto de guanidina (13ml)
- ✓ Wash2 - água isenta de nucleases (25ml) + etanol absoluto (70ml)
- ✓ Elution Buffer - água isenta de nucleases (25 ml)

Composição dos controlos:

- ✓ Controlo interno – 0,01% de RNA encapsulado com o gene da abóbora (*Cucurbita pepo*) em plasma humano negativo (1,2ml)
- ✓ Controlo negativo - solução tampão com 1,0% de sulfato de amónia e 7,9% de detergente (1,3ml)
- ✓ Controlo positivo - solução tampão com os genes específicos do SARS-CoV-2 inseridos num vírus Sindbis recombinante e não infeccioso; 1,0% de sulfato de amónia e 7,9% de detergente (1,3ml)

Composição do kit de amplificação:

- ✓ rTth polimerase – 2,9 a 3,5 unidades/uL em solução tampão (0,141mL)
- ✓ Oligonucleotídeos sintéticos (6 primers e 3 sondas) + dNTPs + molécula fluorescente numa solução tampão (1,0mL)
- ✓ Cloreto de manganês – 30mM (0,400mL)

ANEXO III

Fotografias tiradas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (setor COVID-19):

Algumas considerações: linha azul – curva do controlo interno; curva vermelha – curva da amostra.

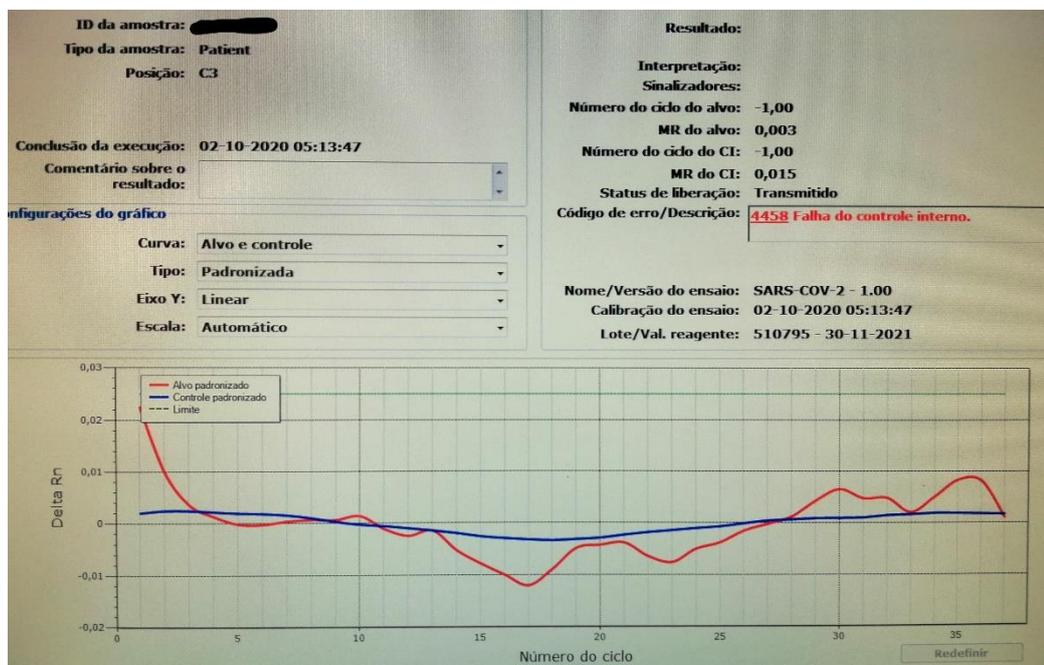


Figura 16 - Falha do controlo interno (curva de amplificação fora da distribuição normal).
Procede-se à repetição da análise da amostra.

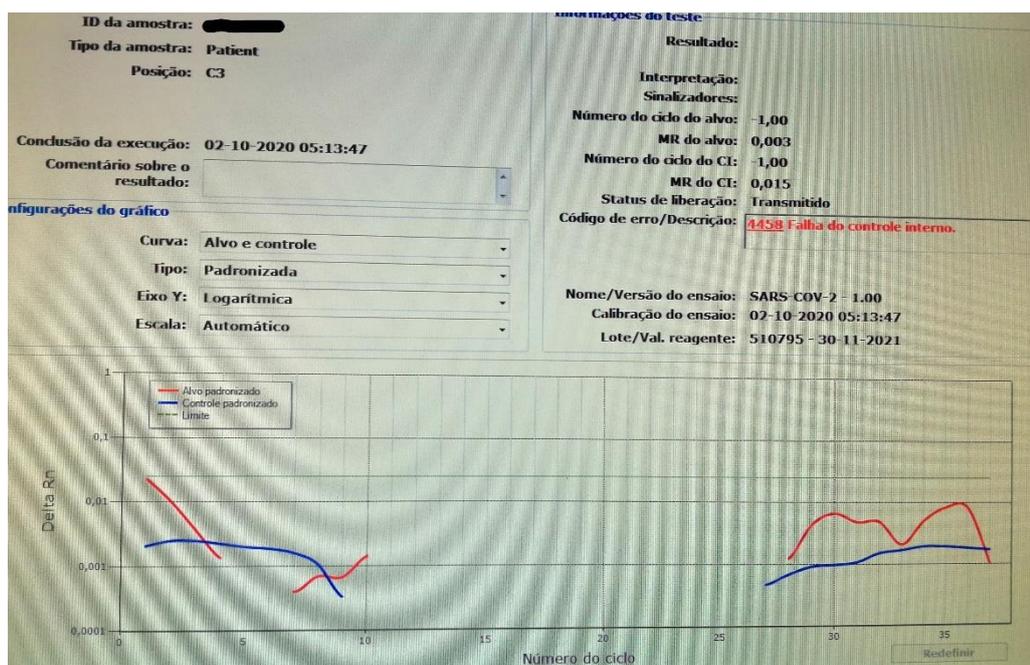


Figura 17 - Falha do controlo interno - gráfico com escala logarítmica.

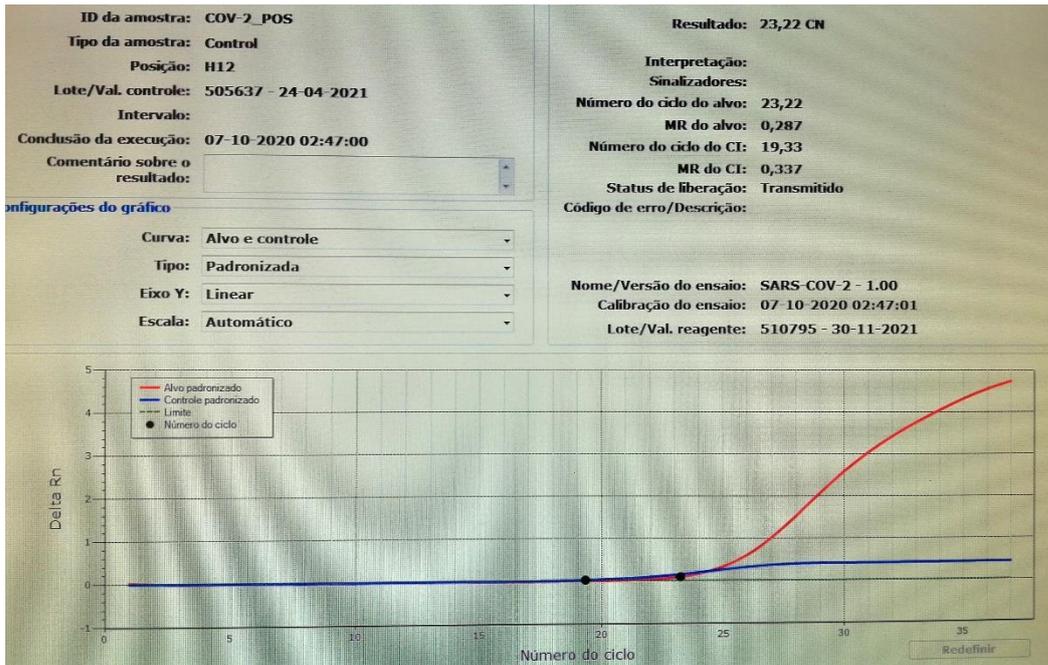


Figura 18 - Controlo positivo.

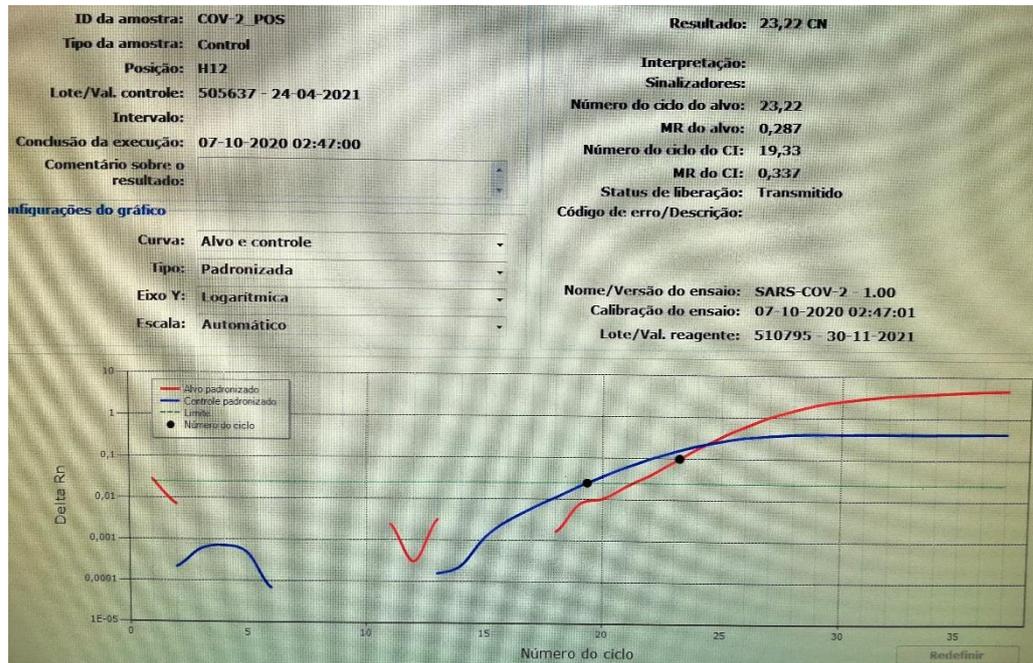


Figura 19 - Controlo positivo - gráfico com escala logarítmica.

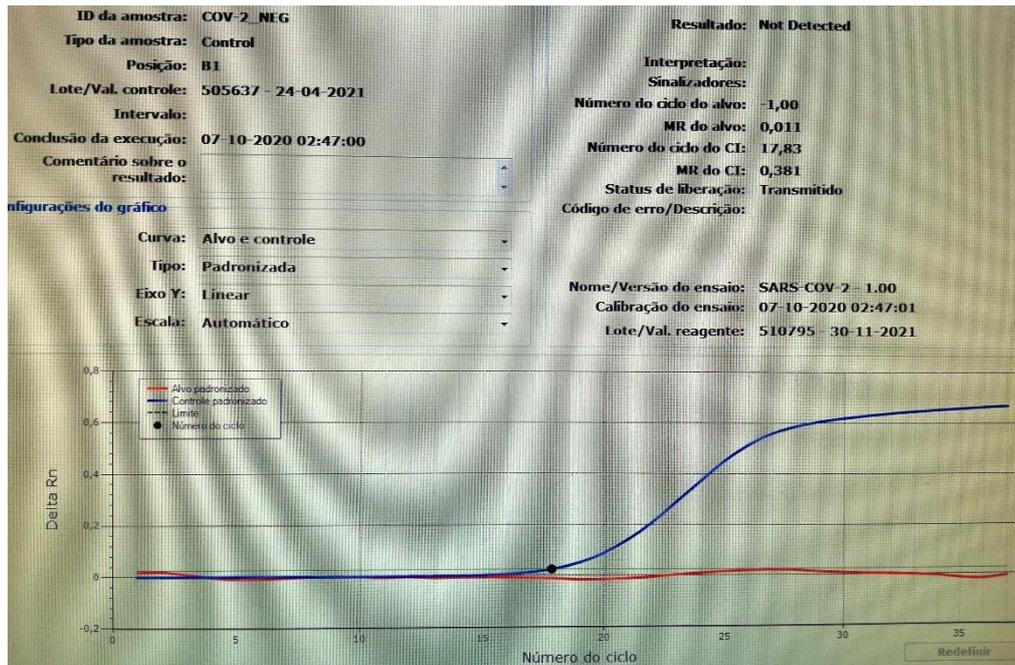


Figura 20 - Controlo negativo.



Figura 21 - Controlo negativo - gráfico com escala logarítmica.

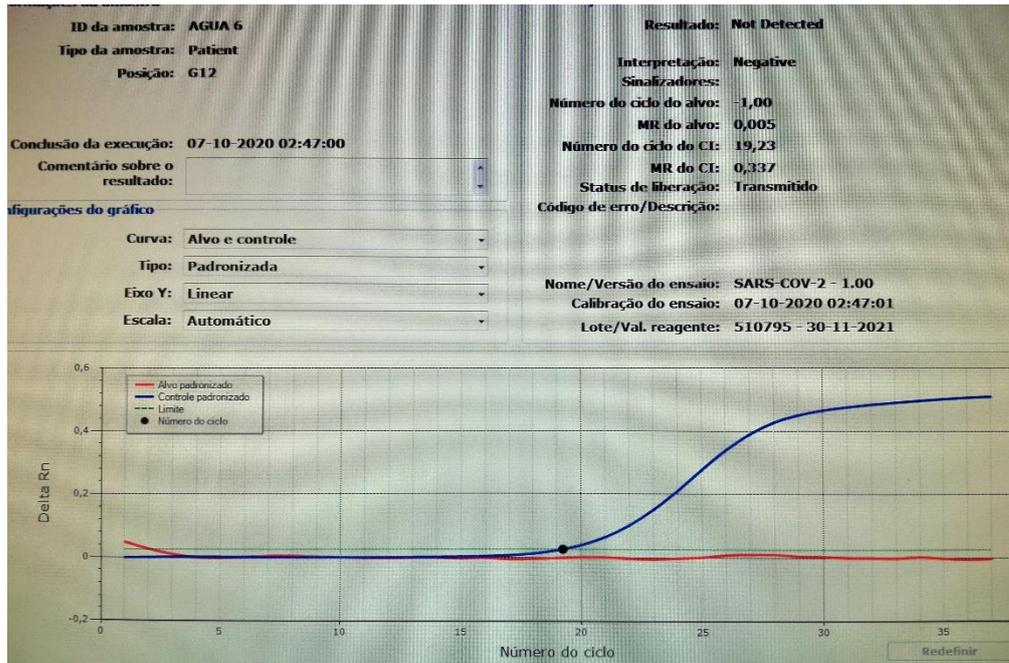


Figura 22 - Curva esperada da água.

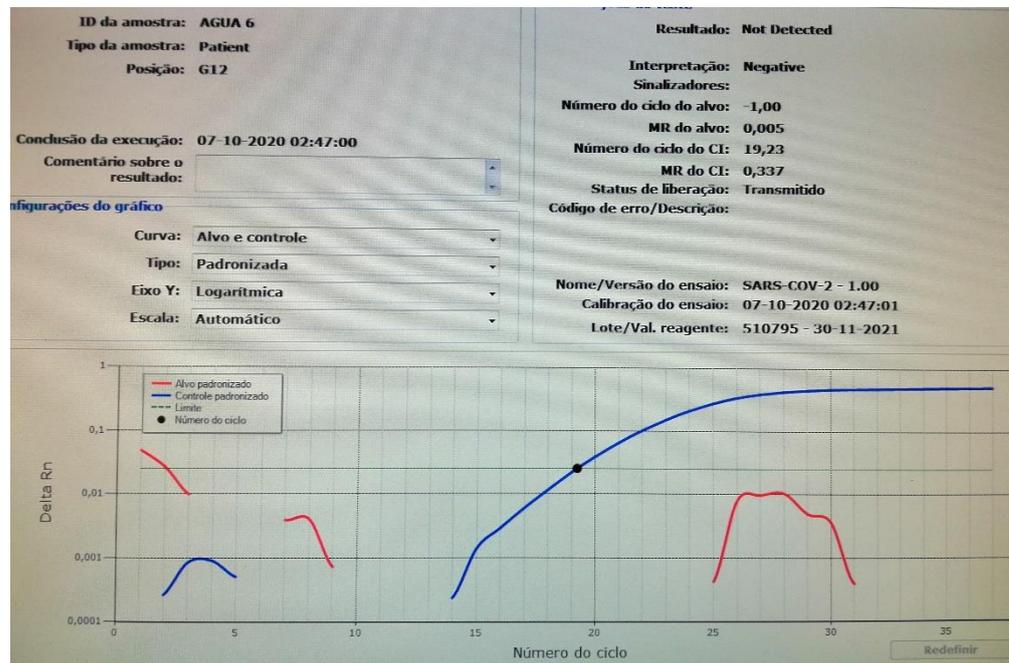


Figura 23 - Curva esperada da água - gráfico com escala logarítmica.

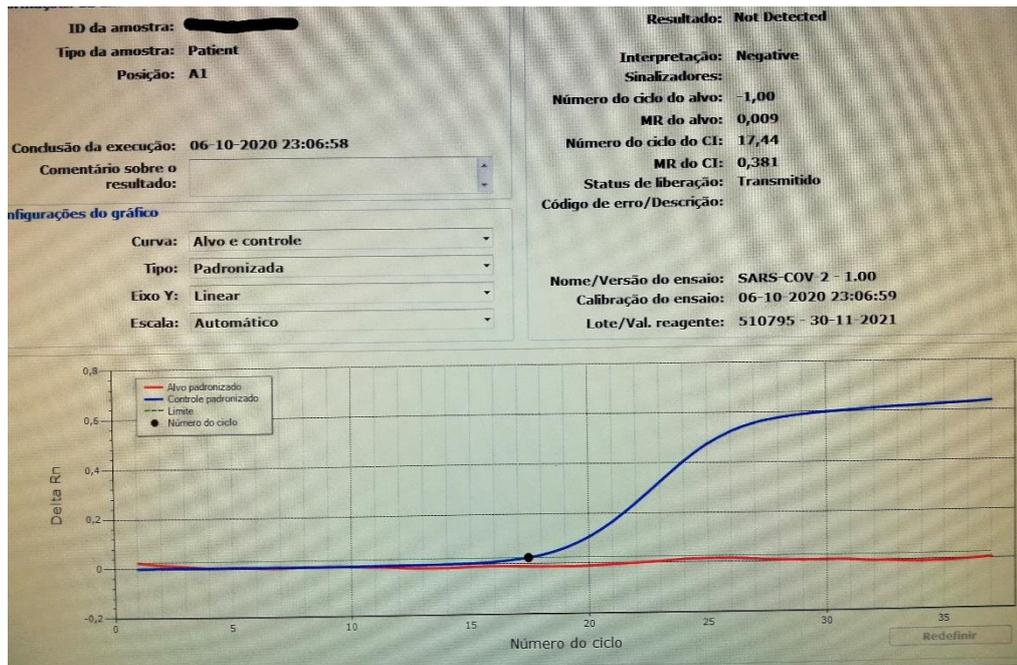


Figura 24 - Resultado negativo.

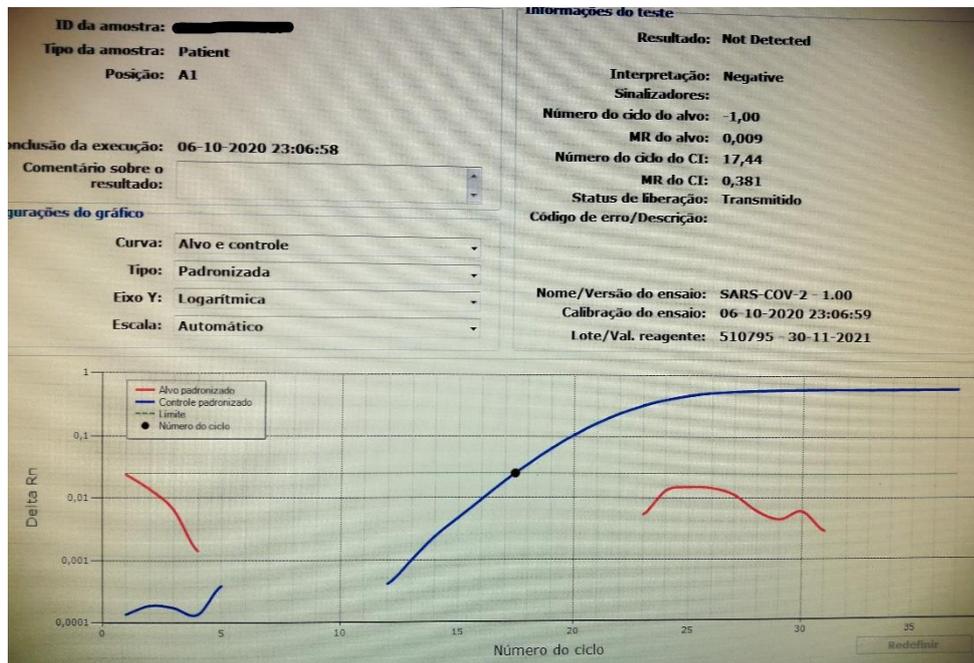


Figura 25 - Resultado negativo - gráfico com escala logarítmica.

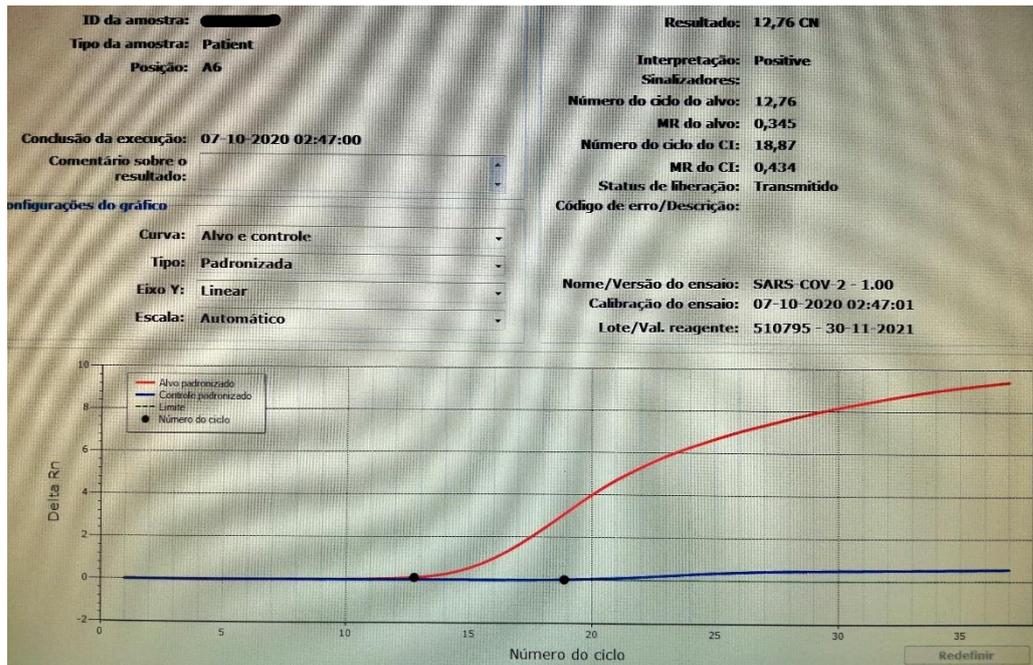


Figura 26 - Resultado positivo com Ct=12,76.

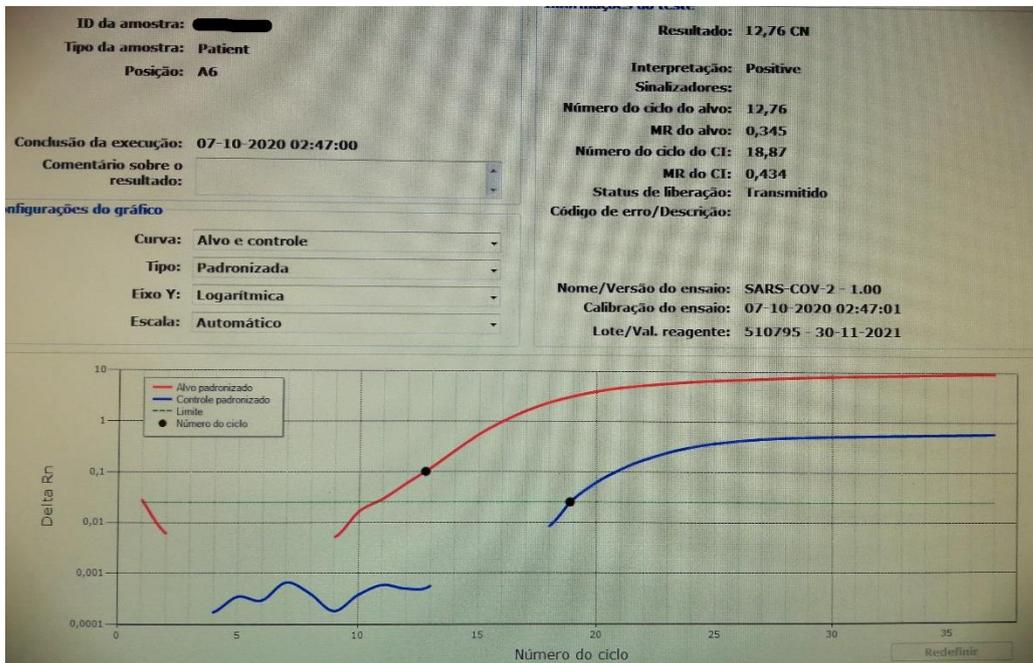


Figura 27 - Resultado positivo com Ct=12,76 - gráfico com escala logarítmica.

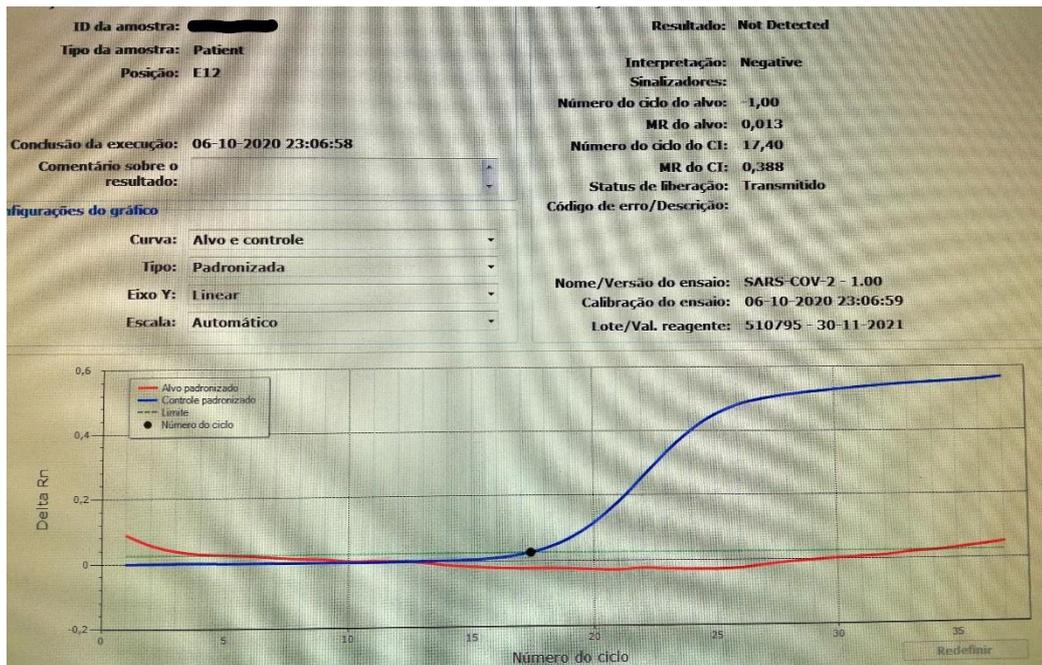


Figura 28 - Resultado inconclusivo devido a curva com padrão atípico.

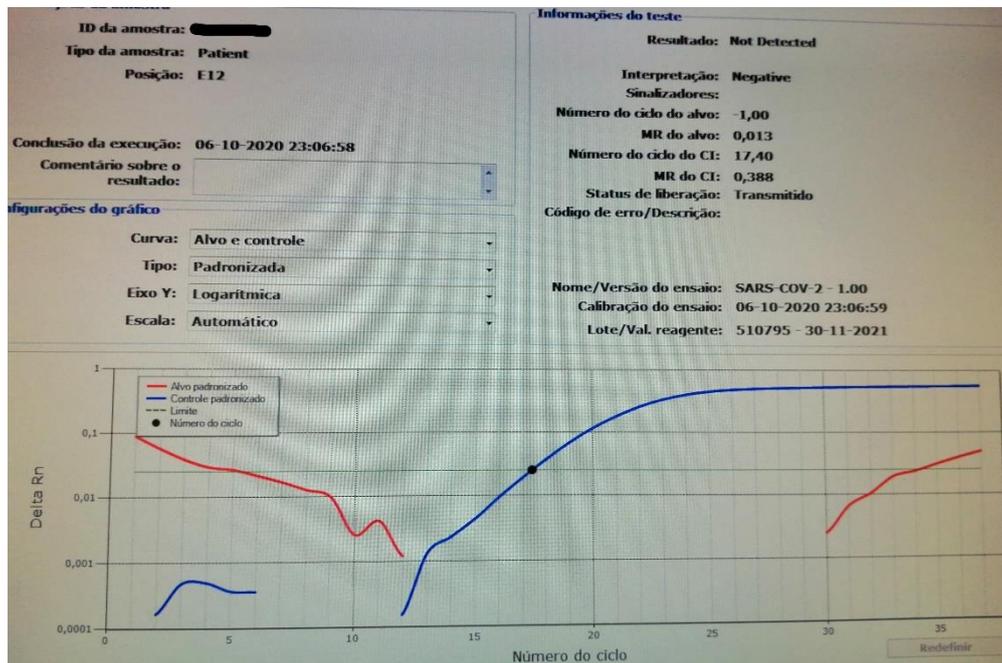


Figura 29 - Resultado inconclusivo devido a curva com padrão atípico - gráfico com escala logarítmica.