



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Lydia Marchã Portela

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Armanda Castro Santos e pela Dra. Helena Cunha Leal e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020





UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

Lydia Marchã Portela

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Armanda Castro Santos e pela Dra. Helena Cunha Leal e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020



## **Agradecimentos**

Chega ao fim mais uma etapa, e resta-me agora agradecer a todos aqueles que acreditaram em mim e sempre me apoiaram.

A toda a equipa do Coimbralab, em especial à Dra. Helena Cunha Leal, ao Dr. Marco Póvoa, à Dra. Cristina Bernardo, à Dra. Paula Prata e ao Fábio Silva pela forma como me receberam e por todos os conhecimentos que me transmitiram ao longo do estágio curricular.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Ana Miguel por me ter dado a oportunidade de concluir o meu estágio curricular no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, por todo o apoio e ajuda sempre que precisei.

À equipa B do LACUC, Daniela, Beatriz, Rita e Frederico, por serem excelentes colegas de equipa e por sempre me ajudarem e apoiarem.

À minha orientadora Professora Doutora Armanda Santos pela orientação na escrita deste relatório e por estar sempre disponível para me ajudar.

Aos amigos de Coimbra e de Campo Maior, obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu namorado, por todo o amor, por ser o meu grande suporte, por me apoiar e aconselhar quando mais precisei.

A toda a minha família, por todo o carinho, por todos os conselhos e palavras de apoio.

Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida e que sempre me apoiaram incondicionalmente, porque mesmo estando longe estiveram sempre perto para me confortar e dar todo o amor, nunca serei capaz de agradecer tudo o que sempre fizeram por mim.

A todos o meu muito obrigada,

*Lydia Marchã Portela*



# Índice

Lista de Abreviaturas.....	9
Lista de Símbolos.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	15
PARTE I – Coimbralab.....	18
1. Caracterização do Local de Estágio.....	18
2. Procedimento Pré-analítico.....	18
3. Controlo de Qualidade Interno e Externo.....	18
4. Amostras.....	19
5. Bioquímica.....	19
5.1. Amostras e Equipamentos.....	19
5.2. Controlo de Qualidade Interno.....	19
5.3. Avaliação Externa da Qualidade.....	20
6. Microbiologia.....	20
6.1. Amostras e Equipamentos.....	20
6.2. Controlo de Qualidade Interno.....	21
6.3. Avaliação Externa da Qualidade.....	21
7. Hematologia.....	21
7.1. Hematopoiese.....	21
7.2. Análises e Equipamentos.....	23
7.2.1. Hemograma.....	23
7.2.1.1. Eritrograma.....	23
7.2.1.1.1. Eritrócitos, Hematócrito, VCM e RDW.....	23
7.2.1.1.2. Hemoglobina, HCM e CHCM.....	24
7.2.1.2. Leucograma.....	25
7.2.1.3. Plaquetas.....	27
7.2.2. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária.....	27
7.2.3. Hemostase.....	27
7.2.3.1. Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada e Razão Normalizada Internacional.....	28
7.2.4. Grupo Sanguíneo.....	29
7.2.5. Teste de Coombs Indireto.....	31
7.3. Controlo de Qualidade Interno.....	31
7.4. Avaliação Externa da Qualidade.....	31
8. Imunologia.....	32
8.1. Sistema Imunológico.....	32
8.2. Amostras e Equipamento.....	33
8.3. Controlo de Qualidade Interno.....	34
8.4. Avaliação Externa da Qualidade.....	35
8.5. Parâmetros analisados pelo <i>Architect i2000 SR</i> .....	35
8.5.1. Marcadores Tumorais.....	35
8.5.1.1. Antígeno cancerígeno 15.3.....	35
8.5.1.2. Antígeno Cancerígeno 19.9.....	36
8.5.1.3. Antígeno Cancerígeno 125.....	36

8.5.1.4.	Antigénio Carcinoembrionário .....	37
8.5.1.5.	Alfa-Fetoproteína.....	37
8.5.1.6.	Antigénio Específico da Próstata .....	38
8.5.2.	Painel Toxoplasma/Rubéola/Citomegalovírus (TORC).....	38
8.5.2.1.	<i>Toxoplasma gondii</i> IgG e <i>Toxoplasma gondii</i> IgM .....	38
8.5.2.2.	Rubéola IgG e Rubéola IgM.....	39
8.5.2.3.	Citomegalovírus IgG e Citomegalovírus IgM .....	40
8.5.3.	Marcadores Virais .....	41
8.5.3.1.	Vírus da Imunodeficiência Humana .....	41
8.5.3.2.	Vírus da Hepatite A IgG e Vírus da Hepatite A IgM .....	42
8.5.3.3.	Marcadores da Hepatite B.....	43
8.5.3.4.	Vírus da Hepatite C.....	44
8.5.4.	Endocrinologia .....	44
8.5.4.1.	Hormona Folículo-estimulante e Hormona Luteinizante .....	44
8.5.4.2.	Gonadotrofina Coriónica Humana.....	45
8.6.	Técnicas Manuais .....	45
8.6.1.	Teste Imunológico de Gravidez .....	45
8.6.2.	Reação de Paul-Bunnell .....	46
8.6.3.	Reação de Weil-Felix.....	46
8.6.4.	Reação de Widal.....	47
8.6.5.	Reação de Wright.....	48
8.6.6.	Teste da Reagina Plasmática Rápida .....	48
9.	Procedimento Pós-analítico.....	49
PARTE II – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra.....		50
1.	Caracterização do Local de Estágio .....	50
2.	Procedimento Pré-analítico .....	50
3.	Amostras .....	51
4.	Avaliação Externa da Qualidade.....	51
5.	Vírus SARS-CoV-2.....	51
6.	Procedimento Analítico.....	53
6.1.	Diagnóstico da COVID-19 por qRT-PCR.....	53
6.1.1.	Colheita e Inativação das Amostras .....	53
6.1.2.	Extração e Preparação das Amostras .....	53
6.1.3.	Amplificação e Detecção do RNA .....	54
6.2.	Pesquisa de Anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV-2.....	55
6.3.	Pesquisa do Antigénio do Vírus SARS-CoV-2.....	56
7.	Procedimento Pós-analítico.....	57
Conclusão .....		59
Bibliografia .....		6



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo do processo de hematopoiese.....	22
<b>Figura 2</b> – Populações de Leucócitos.....	26
<b>Figura 3</b> - Teste da Reagina Plasmática Rápida .....	49
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2 .....	52

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classificação dos grupos sanguíneos do Sistema AB0/Rh .....	30
---	----



## Lista de Abreviaturas

- AcHBc IgM** – Anticorpo IgM contra o Antígeno nuclear do Vírus da Hepatite B
- AcHBc Total** – Anticorpo Total contra o Antígeno nuclear do Vírus da Hepatite B
- AcHBs** – Anticorpo contra o Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
- AcHCV** – Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C
- AFP** – Alfa-Fetoproteína
- AgHBs** – Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
- Anti-D** – Anticorpo contra o Antígeno D
- Anti-IgG** – Anticorpos contra as Imunoglobulinas tipo G
- Anti-TH** – Anticorpo contra o Antígeno Flagelar H
- Anti-TO** – Anticorpo contra o Antígeno Somático O
- Anti-VCA** – Anticorpo contra a Cápside Viral
- ATG** – Anticorpo Anti-tiroglobulina
- ATPO** – Anticorpo Anti-tiroperoxidase
- CA** – Antígeno Cancerígeno
- cDNA** – Ácido Desoxirribonucleico complementar
- CEA** – Antígeno Carcinoembrionário
- CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CHUC** – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
- CI** – Controlo Interno
- CMIA** – Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência
- CMV** – Citomegalovírus
- CMV IgG** – Anticorpo IgG contra Citomegalovírus
- CMV IgM** – Anticorpo IgM contra Citomegalovírus
- COVID-19** – *Coronavirus Disease 2019*
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EBV** – Vírus Epstein-Barr
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA** – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
- Fab** – Fração do anticorpo ligante de antígeno
- Fc** – Fração constante do anticorpo

**Fe<sup>2+</sup>** – Ferro no estado ferroso

**FSH** – Hormona Folículo-Estimulante

**FT** – Fator Tecidual

**FVW** – Fator von Willebrand

**HAV** – Vírus da Hepatite A

**HAV IgG** – Anticorpo IgG contra o Vírus da Hepatite A

**HAV IgM** – Anticorpo IgM contra o Vírus da Hepatite A

**HbA1c** – Hemoglobina Glicada

**HBV** – Vírus da Hepatite B

**HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média

**HCV** – Vírus da Hepatite C

**HDL** – Lipoproteína de Alta Densidade

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

**IgG** – Imunoglobulina tipo G

**IgM** – Imunoglobulina tipo M

**INR** – Razão Normalizada Internacional

**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

**IPO** – Instituto Português de Oncologia

**ISI** – Índice de Sensibilidade Internacional

**LACUC** – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra

**LDL** – Lipoproteína de Baixa Densidade

**LH** – Hormona Luteinizante

**NK** – Células *Natural Killer*

**PAMP** – Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos

**PDW** – Índice de Dispersão das Plaquetas

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

**PRR** – Recetores de Reconhecimento de Padrões

**qRT-PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa

**RDW** – Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos

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

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RPR** – Teste da Reagina Plasmática Rápida

**Rub IgG** – Anticorpo IgG contra o Vírus da Rubéola

**Rub IgM** – Anticorpo IgM contra o Vírus da Rubéola

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

**SEQC<sup>ML</sup>** – Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratório

**SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**T3** – Hormona Triiodotironina

**TASO** – Título de Antiestreptolisina O

**TIG** – Teste Imunológico de Gravidez

**TORC** – Painel Toxoplasma/Rubéola/Citomegalovírus

**Toxo IgG** – Anticorpo IgG contra *Toxoplasma gondii*

**Toxo IgM** – Anticorpo IgM contra *Toxoplasma gondii*

**TP** – Tempo de Protrombina

**TSA** – Testes de Sensibilidade aos Antibióticos

**TSH** – Hormona Estimulante da Tireoide

**TTPa** – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

**TXA2** – Tromboxano A2

**UI** – Unidades Internacionais

**VCM** – Volume Corpuscular Médio

**VES** – Velocidade de Sedimentação Eritrocitária

**VPM** – Volume Plaquetário Médio

**β-hCG** – Subunidade β da Gonadotrofina Coriônica Humana

## Lista de Símbolos

**%** – por cento/ percentagem

**µg** – micrograma

**µm** – micrómetro

**dL** – decilitro

**fL** – fentolitro

**g** – grama

**h** – hora

**L** – litro

**mL** – mililitro

**mm** – milímetro

**ng** – nanograma

**pg** – picograma

## **Resumo**

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas no estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio no Coimbralab entre janeiro e março de 2020 abrangeu as quatro grandes valências das Análises Clínicas – Imunologia, Hematologia, Bioquímica e Microbiologia – sendo as valências de Imunologia e Hematologia descritas com maior detalhe neste relatório.

Nos meses de agosto e setembro de 2020 o estágio decorreu no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, onde as atividades desenvolvidas foram inteiramente dedicadas às técnicas utilizadas no diagnóstico da COVID-19.

Neste relatório é feita uma breve apresentação dos laboratórios onde o estágio decorreu, assim como toda a descrição dos procedimentos pré-analítico, analítico e pós-analítico e ainda a área do controlo de qualidade.

**Palavras-chave:** Análises Clínicas, Imunologia, Hematologia, COVID-19, Controlo de Qualidade.





## **Abstract**

The purpose of this report is to describe the activities developed in the curricular internship as part of the Master's Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. The internship in Coimbralab took place between January and March 2020 and included the four Clinical Analysis areas – Immunology, Haematology, Biochemistry and Microbiology – with the Immunology and Haematology areas being described with more detail.

In August and September 2020, the internship took place in the Clinical Analysis Laboratory of the University of Coimbra, entirely dedicated to the techniques used in the diagnosis of the COVID-19.

In this report there is a brief presentation of both laboratories as well as a description of the pre-analytical, analytical and post-analytical procedures and the quality control area.

**Keywords:** Clinical Analysis, Immunology, Haematology, COVID-19, Quality Control.



## Introdução

As Análises Clínicas desempenham um papel de grande destaque na área da saúde, uma vez que constituem uma ferramenta importante no diagnóstico clínico e no controlo e monitorização de diversas patologias. A área das Análises Clínicas está em constante evolução e cada vez se torna mais importante a atualização dos conhecimentos por parte dos profissionais que trabalham nesta área, de forma a poder prestar o melhor serviço ao utente, sendo sempre esta a principal prioridade do laboratório clínico. A automatização de cada vez mais procedimentos no laboratório tem vindo a contribuir para a minimização dos erros nas diversas fases do processamento da amostra, levando assim a resultados mais fidedignos.

O estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação da Professora Doutora Armanda Castro Santos, foi realizado no Coimbralab com a orientação da Dra. Helena Cunha Leal e no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC), sob a orientação da Professora Doutora Ana Miguel Matos.

No Coimbralab o estágio permitiu colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos durante os dois anos do mestrado, tendo sido fundamental para consolidar esses conhecimentos e conhecer a realidade daquilo que é a rotina de trabalho num laboratório de Análises Clínicas.

Com a situação de pandemia da COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*) vivida no ano de 2020 surgiu a oportunidade de realizar o estágio no LACUC, entre os meses de agosto e setembro de 2020, o que me permitiu ter contacto com as técnicas utilizadas no diagnóstico da COVID-19, doença infecciosa provocada por um coronavírus descoberto recentemente, Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2).

Este relatório encontra-se dividido em duas partes, a primeira respeitante às atividades desenvolvidas no Coimbralab e na qual vão ser abordadas as quatro valências das Análises Clínicas – Imunologia, Hematologia, Bioquímica e Microbiologia – descrevendo com maior detalhe as atividades desenvolvidas nas áreas de Hematologia e Imunologia. Na segunda parte estão descritas as várias técnicas utilizadas no LACUC para o diagnóstico da COVID-19.

## **PARTE I – Coimbralab**

### **I. Caracterização do Local de Estágio**

O Coimbralab iniciou a sua atividade a 16 de maio de 1984, sob a direção técnica da Dra. Helena Cunha Leal, Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana. O laboratório central situa-se no vale das flores, havendo também vários postos de colheita localizados em Coimbra e arredores. O Coimbralab dispõe ainda de colheitas ao domicílio e acordos com algumas entidades.

O Coimbralab é um laboratório clínico com Dupla Certificação para as Normas NP EN ISO 9001 e Norma para Laboratório Clínico. Em julho de 2018 o Coimbralab passou a integrar-se no Grupo Unilabs.

### **2. Procedimento Pré-analítico**

Todo o processo tem início na receção, onde é feita a inscrição do utente. Aqui inscrevem-se no sistema informático todas as análises que o utente vai realizar, assim como informações adicionais que possam ser importantes na interpretação dos resultados laboratoriais, como a toma de medicamentos ou algum problema de saúde.

Ao ser feita a inscrição são emitidas etiquetas com um código de barras, o nome do utente e o número do processo, ao qual é acrescentado um código de terminação consoante as análises a realizar (tubos com a terminação H0 seguem para a Hematologia, C0 para o estudo da Coagulação, I0 para a Imunologia, entre outros). No momento da inscrição é importante explicar ao utente as condições e a preparação que é necessária para realizar a colheita das amostras.

Uma vez feita a inscrição é realizada a colheita das amostras e estas dão entrada no laboratório já com as etiquetas para ser feita a sua triagem e seguirem todo o processo de análise.

### **3. Controlo de Qualidade Interno e Externo**

O controlo de qualidade interno pretende avaliar a precisão dos resultados obtidos. Este pode ser realizado diariamente ou semanalmente, consoante o equipamento e a análise de que se trata.

A avaliação externa da qualidade é realizada para avaliar a exatidão dos resultados obtidos pelos equipamentos, resultados que são depois comparados com os de outros laboratórios pertencentes ao mesmo programa de avaliação externa da qualidade. O controlo de qualidade interno e externo de cada área e equipamento é descrito em cada valência abordada no relatório.

#### **4. Amostras**

No Coimbralab recebem-se vários tipos de amostras, sendo as mais comuns: sangue total, soro, urina, fezes, exsudados (uretral, vaginal, nasofaríngeo, etc.) e expetoração.

#### **5. Bioquímica**

##### **5.1. Amostras e Equipamentos**

No setor da Bioquímica são analisadas amostras de soro, sangue e urina. O equipamento *Olympus AU680* executa a maior parte das análises bioquímicas de rotina requisitadas no laboratório e as amostras analisadas neste equipamento são o soro e a urina.

A determinação da Hemoglobina Glicada (HbA1c) é feita pelo equipamento *Hb9210 PREMIER*, pelo método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a amostra utilizada é o sangue total colhido num tubo com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), o anticoagulante normalmente utilizado na rotina do laboratório. A eletroforese das proteínas séricas é executada pelo equipamento *Minicap*, que utiliza a técnica de eletroforese capilar, e a amostra utilizada é o soro.

Para a análise Urina Tipo II é utilizado o equipamento *Aution Max 4280* que através da utilização de uma tira de teste permite a avaliação de parâmetros como a cor, aspeto, pH, densidade e ainda a quantificação de elementos como proteínas, glicose, nitritos, entre outros. Para a análise do sedimento urinário é utilizada a microscopia ótica.

##### **5.2. Controlo de Qualidade Interno**

No *Olympus AU680*, a maior parte dos parâmetros analisados no soro são controlados diariamente utilizando um *kit* de controlo multiparamétrico que controla dois níveis (alto e baixo), com exceção das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL)

que têm um *kit* de controlo específico. Para as análises da Proteína C Reativa, Título de Antiestreptolisina O (TASO), Ferritina, Transferrina e Fator Reumatóide o controlo é realizado semanalmente, assim como a Microalbuminúria e os restantes parâmetros urinários. A calibração de todos os parâmetros é feita sempre que há uma mudança de lote ou sempre que necessário, excetuando a creatinina, cuja calibração no soro é feita diariamente e na urina é feita semanalmente.

No aparelho *Minicap* o controlo de qualidade é feito uma vez por semana com o nível normal do soro controlo. No *Hb9210 PREMIER* é efetuado o controlo diariamente em simultâneo com a calibração do equipamento, utilizando-se dois níveis de controlo e dois níveis de calibradores. Para o equipamento *Aution Max 4280* são realizados diariamente dois níveis de controlo e a calibração é realizada uma vez por semana.

### **5.3.Avaliação Externa da Qualidade**

A avaliação externa da qualidade na Bioquímica é realizada mensalmente. As amostras para a avaliação dos parâmetros bioquímicos são enviadas pela Sociedade Espanhola de Medicina de Laboratório (SEQC<sup>ML</sup>), com exceção das amostras para a avaliação da HbA1c que são enviadas pelo *Randox International Quality Assessment Scheme (RIQAS)*.

## **6. Microbiologia**

### **6.1.Amostras e Equipamentos**

Na Microbiologia são analisadas amostras de urina, fezes, pus, expetoração e exsudados vaginais, uretrais, nasais e faríngeos.

O equipamento utilizado para a identificação das bactérias e realização dos Testes de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA) é o *Vitek 2 Compact*. Na Bacteriologia são também executadas diversas técnicas manuais, entre elas: a Coloração de Gram, que permite distinguir as bactérias com base nas características morfológicas da parede celular (bactérias Gram positivas coram de roxo e bactérias Gram negativas coram de rosa), a pesquisa de *Streptococcus pyogenes* através do teste diagnóstico antigénico rápido, e o espermograma, que avalia as características dos espermatozoides como a mobilidade e a vitalidade.

Na Parasitologia é feito o Exame Parasitológico de Fezes utilizando o método de concentração, ideal para a pesquisa de ovos e quistos de parasitas.

## 6.2. Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno da Microbiologia é realizado semanalmente para avaliar a esterilidade da solução salina utilizada no equipamento *Vitek 2 Compact*. Semanalmente também é realizada a limpeza do sistema ótico do mesmo.

## 6.3. Avaliação Externa da Qualidade

A avaliação externa da qualidade da Bacteriologia é realizada trimestralmente pela SEQC<sup>ML</sup> e são enviadas duas amostras, uma para a Coloração de Gram e outra para ser feita a identificação do microrganismo e o Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA).

A avaliação da Parasitologia é feita pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e é realizada de forma quadrimestral.

## 7. Hematologia

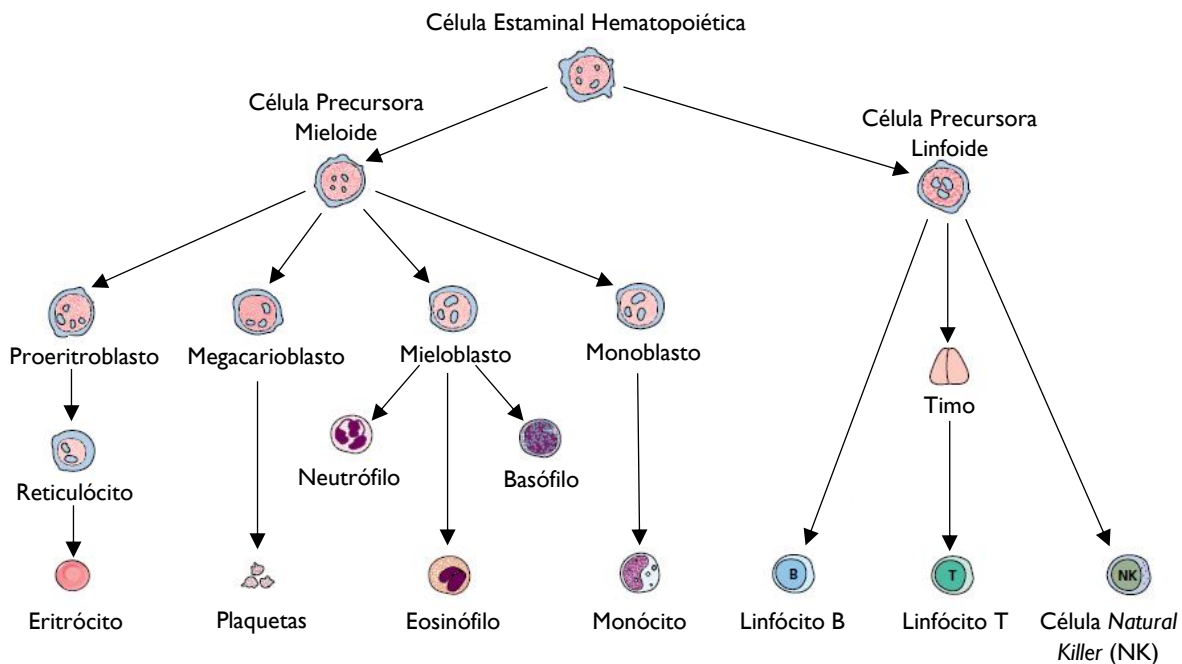
### 7.1. Hematopoiese

A Hematopoiese (**Figura 1**) é o processo a partir do qual são formadas as células sanguíneas. Nas primeiras semanas de gestação a hematopoiese ocorre no saco vitelino e a partir das 6 semanas e até aos 6 meses da gestação os principais órgãos onde ocorre este processo são o fígado e o baço. A partir dos 6 meses da vida fetal a medula óssea é o órgão principal responsável pela hematopoiese e a partir da segunda semana após o nascimento e durante toda a vida a medula óssea é o único local onde são formadas novas células sanguíneas.<sup>1</sup>

Todas as células sanguíneas têm origem nas células estaminais pluripotentes que através do processo de diferenciação celular dão origem a todas as linhagens celulares. Para regular a proliferação e diferenciação das células precursoras em células sanguíneas maduras existem os fatores de crescimento, que para além destas funções previnem também a morte celular por apoptose. A maioria dos fatores de crescimento são produzidos pelas células do estroma, com exceção da eritropoietina, maioritariamente produzida pelo rim, e da trombopoietina, produzida principalmente no fígado. Os fatores de crescimento são reconhecidos por recetores específicos presentes nas células estaminais. Consoante o fator de crescimento é

estimulada a diferenciação da célula estaminal hematopoiética numa célula precursora da linhagem mieloide ou numa célula precursora da linhagem linfoide.<sup>1</sup>

A linhagem mieloide tem início na célula precursora mieloide e todas as células formadas nesta linhagem passam por um processo de maturação na medula óssea. A célula precursora mieloide diferencia-se por ação dos vários fatores de crescimento em células precursoras de cada uma das células constituintes do sangue (proeritroblasto, megacarioblasto, mieloblasto e monoblasto), que posteriormente irão dar origem aos eritrócitos, plaquetas, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (**Figura I**). A linhagem linfoide tem origem na célula precursora linfoide que depois se diferencia em precursores das diferentes células constituintes desta linhagem: células B, células T e células *Natural Killer* (NK) (**Figura I**). As células B e as células NK maturam na medula óssea, enquanto os precursores das células T necessitam de migrar para o timo para sofrerem todo o processo de diferenciação e maturação.<sup>1</sup> Num indivíduo saudável apenas as células sanguíneas que sofreram todo o processo de diferenciação e maturação se encontram na corrente sanguínea.



**Figura I** – Esquema representativo do processo de hematopoiese. A célula estaminal hematopoiética é a célula precursora de todas as linhagens celulares que dão origem às células sanguíneas. Adaptado de: Hoffbrand, A.V.; Moss, P.A.H. – Essential Haematology (2011).



## **7.2. Análises e Equipamentos**

### **7.2.1. Hemograma**

O hemograma é uma das análises de rotina realizada com maior frequência no laboratório. Para a análise do hemograma é utilizada como amostra o sangue total colhido em tubo com EDTA e o equipamento que executa a análise é o *Pentra 80*. O método utilizado pelo equipamento é a citometria de fluxo, uma técnica que permite a análise e determinação de várias características das células quando estas passam por um feixe de luz uma a uma. Ao passarem pelo feixe, este incide nas células e ocorre a dispersão da luz em vários ângulos e a emissão de fluorescência. São utilizados como sondas fluorescentes anticorpos monoclonais contra as proteínas da superfície dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, permitindo assim a determinação da fluorescência e desta forma caracterizar e agrupar as células de acordo com o tamanho e a complexidade.<sup>2</sup> O *Pentra 80* utiliza também o método de impedância que se baseia na baixa condutividade elétrica das células sanguíneas e permite contar e medir as células a partir dos impulsos elétricos que estas geram quando imersas num líquido condutor. Cada célula que passa num orifício desloca um certo volume de líquido e provoca uma alteração na impedância, que é proporcional ao volume deslocado. Estes pulsos são detetados, amplificados e contados num volume de sangue predefinido.<sup>3,4</sup>

A determinação do hemograma permite avaliar a função hematopoiética através da análise do eritrograma, do leucograma e das plaquetas.

#### **7.2.1.1. Eritrograma**

No eritrograma, que corresponde à análise das células vermelhas, estão incluídos os seguintes parâmetros: Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e Distribuição do Diâmetro dos Eritrócitos (RDW).

##### **7.2.1.1.1. Eritrócitos, Hematócrito, VCM e RDW**

Os eritrócitos ou glóbulos vermelhos são as células sanguíneas mais abundantes na circulação e têm um tempo médio de vida de 120 dias. São células na forma de disco bicôncavo flexível, não apresentam núcleo e têm cerca de 8 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diâmetro. Os eritrócitos, que contêm a hemoglobina, passam repetidamente pela microcirculação, o que lhes é permitido graças à sua elasticidade. Estas células conseguem manter o ião ferro da

hemoglobina no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e têm mecanismos de regulação do equilíbrio osmótico, apesar da elevada concentração de hemoglobina.<sup>1</sup> O hematócrito indica a percentagem do volume total de sangue que é ocupada pelos eritrócitos e pode ser obtido multiplicando o número de eritrócitos pelo VCM.<sup>3,4</sup>

O VCM é expresso em femtolitros (fL) e é obtido pelo quociente entre o hematócrito e o número de eritrócitos:

$$VCM (fL) = \frac{\text{Hematócrito}}{n^{\circ} \text{ Eritrócitos}}$$

O VCM mede o tamanho dos eritrócitos e permite distinguir as anemias normocíticas (valor do VCM dentro dos valores de referência), microcíticas (VCM abaixo dos valores de referência) e macrocíticas (VCM acima dos valores de referência).<sup>5</sup>

O RDW (*Red Cell Distribution Width*) é expresso em percentagem e permite analisar a distribuição do diâmetro dos eritrócitos.<sup>4</sup> Um valor de RDW elevado indica a existência de anisocitose, ou seja, existe uma grande variação no diâmetro dos eritrócitos.<sup>5</sup>

### 7.2.1.1.2. Hemoglobina, HCM e CHCM

A hemoglobina é uma proteína que está presente nos glóbulos vermelhos e que permite o transporte de oxigénio para os tecidos. A maioria da hemoglobina existente no sangue é a hemoglobina A e é composta por quatro cadeias polipeptídicas de globina: duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ . Cada uma destas cadeias está ligada a um grupo heme, que contém um ião ferro no estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) no centro do grupo protoporfirina IX. As quatro cadeias de globina ligadas ao grupo heme formam um tetrâmero e constituem a hemoglobina, que transporta o oxigénio quando este se liga ao ião  $\text{Fe}^{2+}$  do grupo heme. A concentração de hemoglobina presente no sangue é expressa em gramas por decilitro (g/dL) e um valor abaixo dos valores de referência é indicativo de uma anemia.<sup>1</sup>

Os parâmetros HCM e CHCM, obtidos através de cálculo, permitem avaliar a coloração da hemoglobina e assim classificar os vários tipos de anemias (normocrómica ou hipocrómica). A HCM representa o peso médio da hemoglobina nos eritrócitos e é expressa em picogramas (pg).<sup>5</sup> Este parâmetro é obtido dividindo a concentração de hemoglobina pelo número de eritrócitos num determinado volume:

$$HCM (pg) = \frac{[\text{Hemoglobina}]}{n^{\circ} \text{ Eritrócitos}}$$

A CHCM, expressa em g/dL, corresponde à concentração média de hemoglobina no interior de um eritrócito. Este parâmetro é obtido através do quociente entre a concentração de hemoglobina e o hematócrito.<sup>4,5</sup>

$$CHCM (g/dL) = \frac{[Hemoglobina]}{Hematócrito}$$

### 7.2.1.2. Leucograma

O leucograma é a componente do hemograma que analisa os leucócitos e onde é determinada a fórmula leucocitária que engloba os parâmetros: Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos. A fórmula leucocitária é realizada pela técnica de citometria de fluxo já descrita, o que permite obter um gráfico com as várias populações de leucócitos agrupadas de acordo com as suas características: o tamanho, dado pela dispersão frontal da luz, e a complexidade, dada pela dispersão lateral.<sup>2</sup> A fórmula leucocitária pode ser apresentada em percentagem ou pela contagem de células de cada população.

Os leucócitos são células com núcleo e constituem as principais defesas do organismo contra agentes estranhos. Estas células podem ser divididas em dois grupos: os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos) que têm um núcleo com lóbulos e apresentam grânulos citoplasmáticos, e os agranulócitos (monócitos e linfócitos) que apresentam grânulos quase impercetíveis e o núcleo não se encontra dividido em lóbulos.<sup>1</sup>

Os neutrófilos (**Figura 2a**) são a população de leucócitos mais abundante. Têm um núcleo segmentado que contém entre 2 a 5 lobos e o seu tempo médio de vida na circulação é de 6 a 10 horas. Os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos são finos e com uma coloração rosa-azulada (grânulos azurófilos). Estas células têm a função de fagocitar microrganismos.<sup>1</sup>

Os eosinófilos (**Figura 2b**) têm entre 2 e 3 lóbulos, os seus grânulos são maiores que os grânulos dos neutrófilos e apresentam uma coloração vermelha. Estas células têm um papel importante na redução do processo inflamatório e na defesa contra parasitas, podendo também verificar-se o aumento de eosinófilos em reações alérgicas.<sup>1</sup>

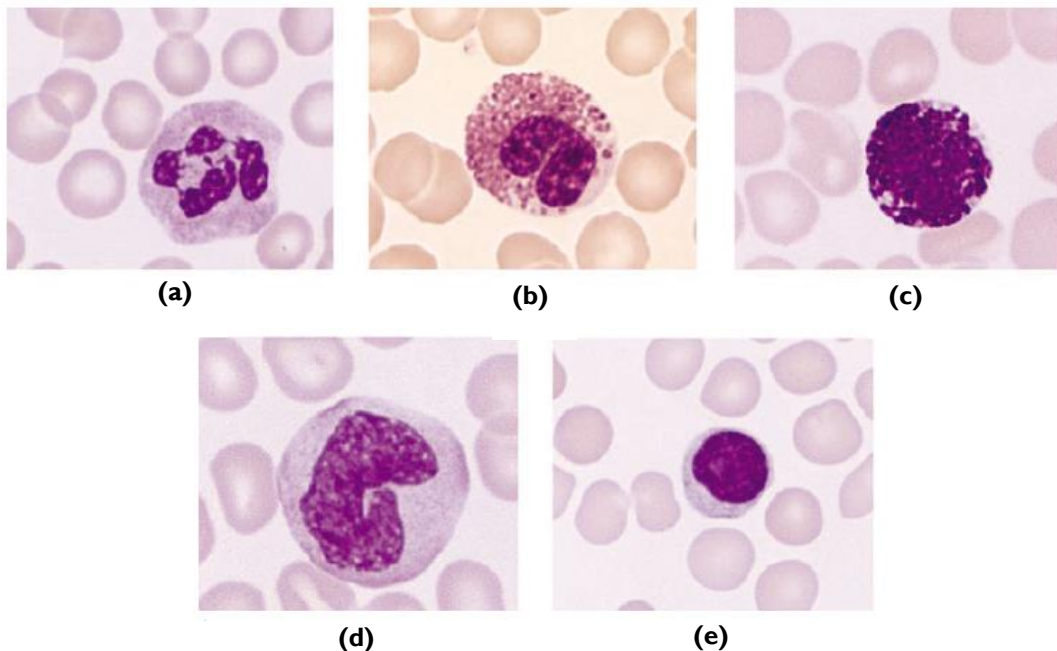
Os basófilos (**Figura 2c**) são a população de leucócitos que se encontra em menor quantidade na circulação. O seu núcleo é constituído por dois lóbulos e o seu citoplasma contém grânulos grandes e de coloração escura que se sobrepõem ao núcleo. Estes grânulos têm heparina, que atua como anticoagulante, e histamina que promove a inflamação. Os basófilos apresentam na sua superfície recetores para as imunoglobulinas tipo E (IgE) e são

ativados quando a IgE ligada ao recetor na superfície dos basófilos complexa com o antígeno, ocorrendo a libertação do conteúdo dos grânulos, nomeadamente da histamina que vai promover o processo inflamatório. Os mastócitos também são granulócitos e são funcionalmente semelhantes aos basófilos, no entanto são células distintas. Estas células raramente se encontram na circulação sanguínea e contêm grânulos de menor dimensão, mas em maior número que os basófilos.<sup>1,4</sup>

Os monócitos (**Figura 2d**) têm um núcleo grande em forma de rim e são os leucócitos com maior dimensão. Quando comparados com os linfócitos, os monócitos apresentam mais citoplasma e este contém vacúolos finos no seu interior. Os monócitos podem migrar para os tecidos e diferenciar-se aí em macrófagos que têm a função de fagocitar os microrganismos e corpos estranhos.<sup>1</sup>

Os linfócitos (**Figura 2e**) são células com núcleo redondo e com uma pequena porção de citoplasma em volta. Dentro desta população encontram-se os linfócitos B, os linfócitos T e as células NK. Estas células têm extrema importância no sistema imunitário pois produzem anticorpos e destroem agentes estranhos.<sup>1</sup>

Na **Figura 2** estão representadas as diferentes populações de leucócitos.



**Figura 2** – Populações de Leucócitos. (a) neutrófilo; (b) eosinófilo; (c) basófilo; (d) monócito; (e) linfócito. Adaptado de: Hoffbrand, A.V.; Moss, P.A.H. – Essential Haematology (2011).

### **7.2.1.3. Plaquetas**

A análise do hemograma inclui ainda a análise das plaquetas. As plaquetas são produzidas na medula óssea como resultado da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos e são importantes no processo de hemostase através da formação de agregados plaquetários.<sup>1</sup>

Ainda em relação às plaquetas são determinados os índices plaquetários: o Volume Plaquetário Médio (VPM), o Índice de Dispersão das Plaquetas (PDW) e o Plaquetócrito. Estes parâmetros são obtidos por cálculo.

### **7.2.2. Velocidade de Sedimentação Eritrocitária**

A Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VES) é a velocidade com que os eritrócitos se depositam numa amostra de sangue anticoagulado durante 60 minutos. Este parâmetro é medido em milímetros por hora (mm/h).<sup>6</sup>

Para a determinação da VES é utilizado sangue total e esta análise é realizada pelo aparelho *Ves-Matic Cube 80*. Quando inseridas no aparelho, as amostras são primeiramente homogeneizadas e seguem depois para o primeiro ponto de leitura, que é feita por um sistema ótico-eletrónico que inclui um sensor analógico e que determina a quantidade de sangue do tubo. De seguida as amostras percorrem um trajeto durante 20 minutos, período durante o qual os eritrócitos se depositam. Após estes 20 minutos as amostras são sujeitas a uma segunda leitura para verificar a altura da coluna de plasma, que termina onde se encontram os eritrócitos sedimentados e que corresponde à VES.<sup>7</sup>

### **7.2.3. Hemostase**

A hemostase é um processo fisiológico que protege o sistema vascular de uma lesão, reparando os tecidos. Trata-se de um conjunto de mecanismos que, de modo integrado, contribuem para a paragem da hemorragia e atuam de modo autolimitado de forma a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Os principais componentes envolvidos no processo de hemostase são as células endoteliais da parede do vaso sanguíneo, as plaquetas, os fatores da coagulação, os inibidores da coagulação e o sistema fibrinolítico.<sup>1</sup>

O processo de hemostase tem início com a exposição do colagénio como resultado de uma lesão vascular. A exposição do colagénio promove a adesão das plaquetas através da glicoproteína GPIb ao fator von Willebrand (FVW), que funciona como uma ponte entre as

plaquetas e o colagénio. A adesão das plaquetas leva à sua ativação, levando posteriormente à libertação de Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e à ativação das glicoproteínas GPIIb e GPIIIa que promovem a agregação plaquetária. O TXA<sub>2</sub>, para além de promover a agregação plaquetária, tem uma ação vasoconstritora que permite reduzir o fluxo sanguíneo e parar a hemorragia. A este processo é chamado hemostase primária.<sup>1</sup>

A hemostase secundária diz respeito à cascata de coagulação, que é iniciada pela exposição do fator tecidual (FT) quando ocorre a lesão vascular. O FT liga-se ao fator VII ativado (VIIa) formando o complexo FT-fator VIIa que vai depois ativar o fator IX e o fator X. O fator X ativado (Xa) na ausência do seu cofator forma pequenas quantidades de trombina a partir da protrombina, o que por si só não é suficiente para formar um coágulo de fibrina, sendo necessária a formação de uma maior quantidade de trombina. A pequena quantidade de trombina formada anteriormente vai ativar o fator VIII (VIIIa) e o fator V (Va) e é o complexo formado pelo fator VIIIa e o fator IX ativado (IXa) que vai ativar o fator X. O fator Xa, por sua vez, vai formar um complexo com o fator Va (chamado complexo protrombinase) culminando na formação de trombina. A trombina vai atuar no fibrinogénio e formar monómeros de fibrina que se unem depois num polímero de fibrina (coágulo), sendo este polímero estabilizado pela ação do fator XIII ativado (XIIIa).<sup>1</sup>

A última fase do processo de hemostase é a fibrinólise, que consiste na dissolução do coágulo de fibrina de modo a não comprometer o normal fluxo sanguíneo. Este processo é realizado pela plasmina, que é capaz de digerir a fibrina e levar à sua degradação, ou seja, à dissolução do coágulo.<sup>1</sup>

### **7.2.3.1. Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada e Razão Normalizada Internacional**

No Coimbralab a hemostase é avaliada através da determinação do Tempo de Protrombina (TP), do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) e da Razão Normalizada Internacional (INR).

O TP mede o tempo de coagulação do plasma após a adição de uma concentração ótima de tromboplastina. Este parâmetro avalia os fatores V, VII, X, protrombina e fibrinogénio e pode ser expresso em segundos ou em percentagem.<sup>1</sup> O INR é uma outra forma de expressar o TP e obtém-se através do quociente entre o TP do utente e um valor padrão de TP elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI) da tromboplastina utilizada:

$$INR = \left( \frac{TP \text{ do utente}}{TP \text{ padrão}} \right)^{ISI}$$

Este parâmetro é normalmente utilizado na monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais como por exemplo a varfarina.<sup>8</sup> O valor de referência do INR situa-se entre 0,9 e 1,1, no entanto para pessoas sujeitas a terapêutica com anticoagulante oral este valor deve estar entre 2 e 3.<sup>1</sup>

O TTPa avalia os fatores VIII, IX, XI, XII e também os fatores V, X, protrombina e fibrinogénio. O TTPa é expresso em segundos e mede o tempo de coagulação do plasma após a adição de três substâncias: fosfolípido, um ativador dos fatores de coagulação e cálcio.<sup>1</sup>

Um TP prolongado sem alteração do valor de TTPa sugere a deficiência de um dos fatores avaliados apenas pelo TP, ou seja, deficiência de fator VII. Por outro lado, um aumento isolado do TTPa é sugestivo de uma deficiência de fator VIII, IX, XI ou XII. Se ambos os parâmetros estiverem aumentados significa que há deficiência de um dos fatores avaliados pelos dois parâmetros, ou seja, uma deficiência de fator V, X, protrombina ou fibrinogénio.<sup>9</sup>

A amostra utilizada para as determinações do TP e TTPa é o plasma colhido num tubo com o anticoagulante citrato de sódio e o equipamento utilizado é o *Trombolyzer XR*. Este equipamento dispõe de uma estação magnetizada onde são colocados os reagentes e controlos para estarem em constante homogeneização. A reação ocorre numa barrete que contém uma esfera que gira continuamente. Quando ocorre a formação do coágulo de fibrina, este não permite o movimento da esfera e é detetado através da impedância. Para a determinação do TP o reagente utilizado contém cálcio, que serve como ativador da reação, e tromboplastina liofilizada. Para a medição do TTPa o reagente contém cálcio para o mesmo efeito e contém ainda fosfolípidos, necessários para a ativação de alguns fatores da coagulação.

#### **7.2.4. Grupo Sanguíneo**

Os grupos sanguíneos são determinados com base na presença ou ausência de antigénios na superfície dos eritrócitos. Existem dois sistemas que determinam o grupo sanguíneo, são eles o Sistema AB0 e o Sistema Rh.

O Sistema AB0 classifica o grupo sanguíneo de acordo com a ausência ou presença dos antigénios A e/ou B na superfície dos eritrócitos. Desta forma, o sangue do grupo A apresentará na superfície dos eritrócitos os antigénios do tipo A, o sangue do grupo B terá

antigénios do tipo B e o grupo AB terá antigénios A e B na superfície dos eritrócitos. Por sua vez, o sangue do grupo 0 é aquele cujos eritrócitos não apresentam antigénios.<sup>10</sup>

O Sistema Rh engloba mais de 50 antigénios, no entanto na rotina laboratorial faz-se a pesquisa do antigénio D para a determinação do grupo sanguíneo. Estima-se que cerca de 85% da população caucasiana é Rh positivo, referindo-se esta designação à presença do antigénio D nos eritrócitos. Indivíduos Rh negativo apenas produzem o anticorpo contra o antigénio D (Anti-D) se existir um estímulo imunológico como a gestação de um feto Rh positivo. Os anticorpos Anti-D atravessam a placenta e são responsáveis pela anemia hemolítica do recém-nascido, em que os anticorpos da mãe reagem contra os antigénios do feto Rh positivo.<sup>10</sup>

No Coimbralab a determinação do grupo sanguíneo baseia-se na deteção do complexo antigénio-anticorpo e realiza-se recorrendo às cartas *DiaClon AB0/D*. Estas cartas têm microtubos que por sua vez contêm no seu interior um gel de acrilamida com anticorpos específicos para o antigénio a pesquisar. A este gel é adicionada uma suspensão de eritrócitos preparada com *ID-Diluent 2* e centrifuga-se o cartão na centrífuga *ID-Centrifuge 12 SII*. Após a centrifugação o resultado positivo é dado pelos eritrócitos aglutinados que formando uma linha vermelha na superfície do gel ou aglutinados dispersos no gel. Se os eritrócitos se encontrarem compactados no fundo do microtubo o resultado é negativo.<sup>11</sup>

Na **Tabela I** estão representados os vários grupos sanguíneos do Sistema AB0/Rh.

**Tabela I - Classificação dos grupos sanguíneos do Sistema AB0/Rh**

Grupo Sanguíneo (Sistema AB0/Rh)	Antigénio A	Antigénio B	Antigénio D	Anti-A	Anti-B
A <sup>+</sup>	+	-	+	-	+
B <sup>+</sup>	-	+	+	+	-
AB <sup>+</sup>	+	+	+	-	-
0 <sup>+</sup>	-	-	+	+	+
A <sup>-</sup>	+	-	-	-	+
B <sup>-</sup>	-	+	-	+	-
AB <sup>-</sup>	+	+	-	-	-
0 <sup>-</sup>	-	-	-	+	+

Resultado positivo (+) indica a presença de antigénio/anticorpo;  
Resultado negativo (-) indica ausência de antigénio/anticorpo.



### **7.2.5. Teste de Coombs Indireto**

O Teste de Coombs Indireto pesquisa no soro do utente a existência de imunoglobulinas tipo G (IgG) contra o antigénio D (Anti-D) do Sistema Rh. O teste é feito em cartas de microtubos que contêm gel e anticorpos contra as imunoglobulinas tipo G (Anti-IgG). Aos microtubos são adicionados os eritrócitos-teste que na sua superfície contém o antigénio D e de seguida é adicionado o soro do utente. Se no soro estiverem presentes os anticorpos Anti-D estes vão ligar-se, através da fração do anticorpo ligante de antigénio (Fab), aos eritrócitos e originar uma reação de aglutinação. Os anticorpos Anti-IgG presentes no gel vão depois ligar-se à fração constante do anticorpo (Fc) Anti-D.<sup>12</sup>

Os eritrócitos aglutinados formam uma linha vermelha na superfície do gel ou aglutinados dispersos no gel, indicando um resultado positivo para a presença de anticorpos no soro. O resultado negativo (ausência de anticorpos no soro) é indicado pelos eritrócitos compactados no fundo do microtubo.

### **7.3. Controlo de Qualidade Interno**

O controlo de qualidade interno do equipamento *Pentra 80* é realizado diariamente utilizando dois de três níveis de controlo (baixo, normal e alto). Os níveis de controlo a utilizar alternam a cada duas semanas e têm de ser agitados durante 15 minutos antes da sua utilização.

No equipamento *Ves-Matic Cube 80* o controlo interno é feito diariamente utilizando dois níveis de controlo e no *Trombolyzer XR* também se realiza o controlo diariamente com dois níveis: baixo e alto.

### **7.4. Avaliação Externa da Qualidade**

A avaliação externa da qualidade no setor da Hematologia é realizada pela SEQC<sup>ML</sup> e de forma mensal. As amostras para a hematimetria chegam ao laboratório já preparadas, apenas sendo necessário deixá-las à temperatura ambiente e homogeneizá-las antes de as processar. Para a avaliação dos parâmetros da coagulação é necessário a reconstituição das amostras.

## 8. Imunologia

### 8.1. Sistema Imunológico

O sistema imunológico tem um papel fundamental na defesa do organismo e é composto por um conjunto de células e moléculas que de forma coordenada combatem os agentes reconhecidos como estranhos, sejam eles externos (como por exemplo microrganismos, toxinas, fármacos, entre outros) ou internos, como é o caso das células cancerígenas.<sup>13</sup>

A primeira barreira contra um agente potencialmente patogénico são as células epiteliais da pele e das mucosas. No entanto, quando estas barreiras são ultrapassadas ocorre de imediato o reconhecimento do agente patogénico por moléculas recetoras, que podem ser expressas pelas células do sistema imunológico, como os fagócitos, ou podem fazer parte de moléculas ou complexos moleculares solúveis como é o caso do sistema do complemento ou dos peptídeos antimicrobianos produzidos para defender o organismo. O reconhecimento do agente patogénico pelas moléculas recetoras provoca uma resposta imunológica rápida desencadeada pelas células fagocíticas, que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP) através de um conjunto de recetores conhecido como recetores de reconhecimento de padrões (PRR). Esta resposta faz parte da imunidade inata e é a primeira defesa do organismo à entrada de agentes estranhos. Os elementos que fazem parte da resposta imunológica inata estão presentes no organismo do hospedeiro mesmo antes de ocorrer infeção, pelo que os mecanismos desta resposta imunológica atuam de imediato quando em contacto com o agente estranho. Este tipo de imunidade engloba, para além das células epiteliais presentes nas barreiras anatómicas e das células fagocíticas, mecanismos físicos e químicos de defesa das mucosas (como por exemplo o pH gástrico, os movimentos peristálticos do intestino, o suor, o muco ou as lágrimas), os peptídeos antimicrobianos produzidos contra os agentes patogénicos, as células dendríticas, o sistema do complemento e as células NK. Esta primeira linha de defesa é eficaz na destruição de muitos agentes invasores, no entanto não apresenta o nível de especificidade da resposta imunológica adaptativa especificidade, sendo incapaz de reconhecer pequenas diferenças entre agentes patogénicos distintos.<sup>14</sup>

Quando o sistema imune inato não é capaz de resolver a infeção e há a persistência do agente patogénico no organismo é ativada a imunidade adquirida, que é mediada pelos linfócitos T e pelos linfócitos B. Quando esta imunidade é ativada ocorre o reconhecimento do antigénio pelos linfócitos B *naive* sem ser necessária a intervenção das células

apresentadoras de antígeno. Depois de digerido o antígeno, os epítomos antigénicos são expressos pelas células apresentadoras de antígeno. Estas células, que podem ser os próprios linfócitos B, as células dendríticas ou as células fagocíticas, apresentam os epítomos antigénicos aos linfócitos T auxiliares. Quando ocorre a apresentação do antígeno e a ativação dos linfócitos inicia-se o processo de expansão clonal que resulta na produção de linfócitos específicos para o antígeno em causa. A imunidade adquirida é uma resposta específica contra o antígeno e possibilita o desenvolvimento de linfócitos B e T de memória, o que resulta numa resposta mais rápida e eficaz contra o mesmo antígeno numa segunda infeção.<sup>14</sup>

## 8.2. Amostras e Equipamento

O equipamento utilizado no setor da Imunologia é o *Architect i2000 SR* e a amostra mais analisada é o soro. Para além do *Architect i2000 SR*, que realiza a maior parte das análises da Imunologia, realizam-se ainda diversas técnicas manuais neste setor.

O *Architect i2000 SR* utiliza o método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para a execução das análises. Neste método é utilizada uma molécula quimioluminescente como indicador da reação imunológica. Os reagentes necessários a esta reação são as micropartículas paramagnéticas revestidas com um antígeno/anticorpo/partícula viral específicos do analito a detetar na amostra, um antígeno/anticorpo/partícula viral conjugado(a) com acridínio (molécula quimioluminescente utilizada no Coimbralab), uma solução pré-ativadora e uma solução ativadora.<sup>15</sup>

A reação começa com a adição das micropartículas à cuvete onde se encontra a amostra e o antígeno/anticorpo/partícula viral que reveste as micropartículas liga-se ao analito que se pretende detetar ou quantificar na amostra. De seguida as micropartículas são atraídas por um íman para as paredes da cuvete e ocorre a lavagem da cuvete para remover todos os componentes da amostra que não se ligaram às micropartículas. Após este processo, o conjugado marcado com acridínio é adicionado à cuvete de reação e liga-se ao antígeno, anticorpo ou partícula viral que se pretende detetar na amostra. De seguida é adicionada a solução pré-ativadora que contém peróxido de hidrogénio e que providencia um ambiente ácido para prevenir a emissão prematura de luz. Além desta função, o peróxido de hidrogénio também impede a aglomeração das micropartículas e separa o acridínio conjugado das micropartículas que continuam atraídas nas paredes da cuvete por ação do íman. Desta forma, na solução fica a molécula de acridínio conjugada com o antígeno/anticorpo/partícula viral a pesquisar. A adição de hidróxido de sódio (solução ativadora) provoca uma alcalinização do

meio, o que leva à oxidação do acridínio e à consequente emissão de luz. Por fim ocorre a medição da emissão de luz pelo sistema ótico do equipamento durante um intervalo de tempo predefinido, permitindo assim a quantificação do analito na amostra.<sup>15</sup>

### 8.3. Controlo de Qualidade Interno

Para o controlo de qualidade interno é usado um *kit* de controlo multiparamétrico e *kits* de controlo específicos de cada analito. A calibração dos vários parâmetros é feita sempre que se altera o lote do reagente ou sempre que os valores obtidos no controlo estão fora dos limites  $\pm 2DP$  (média mais ou menos dois desvios padrão) de acordo com as regras de Westgard.<sup>16</sup>

O *kit* de controlo multiparamétrico controla os seguintes parâmetros: Hormona Triiodotironina (T3) total, Hormona Estimulante da Tireoide (TSH), Anticorpo Anti-tiroglobulina (ATG), Anticorpo Anti-tiroperoxidase (ATPO), Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), Estradiol, Hormona Folículo-Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Prolactina, Testosterona, Antígeno Específico da Próstata (PSA) Livre, Antígeno Carcinoembrionário (CEA), Antígeno Cancerígeno (CA) 125, Alfa-Fetoproteína (AFP), Cortisol e Vitamina B12.

O controlo de qualidade específico de cada analito é usado nas seguintes análises: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Anticorpo contra o Vírus da Hepatite C (AchCV), Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B (AgHBs), Anticorpo contra o Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B (AchBs) Anticorpo IgM contra o Antígeno nuclear do Vírus da Hepatite B (AchBc IgM), Anticorpo total contra o Antígeno nuclear do Vírus da Hepatite B (AchBc Total), Anticorpo IgG contra o Vírus da Hepatite A (HAV IgG), Anticorpo IgM contra o Vírus da Hepatite A (HAV IgM), Anticorpo IgG contra *Toxoplasma gondii* (Toxo IgG), Anticorpo IgM contra *Toxoplasma gondii* (Toxo IgM), Anticorpo IgG contra o Vírus da Rubéola (Rub IgG), Anticorpo IgM contra o Vírus da Rubéola (Rub IgM), Anticorpo IgG contra Citomegalovírus (CMV IgG), Anticorpo IgM contra Citomegalovírus (CMV IgM), Folato, Vitamina D, Insulina, Hormona Paratiroide (PTH), Hormona Triiodotironina Livre (FT3), Hormona Tiroxina (T4) Total, Hormona Tiroxina Livre (FT4), CA 15.3, CA 19.9, Progesterona e PSA.

A maioria dos controlos de qualidade específicos de cada analito são feitos semanalmente e de forma alternada tal como o controlo multiparamétrico, com exceção dos

controles do HIV, HCV, AgHBs e AchBs, que são feitos diariamente e alternando entre os vários níveis, tendo sempre o cuidado de utilizar o nível I (Controlo Negativo).

#### **8.4. Avaliação Externa da Qualidade**

A avaliação externa da qualidade é realizada mensalmente, com exceção dos parâmetros HIV, AgHBs, AchBc, AchCV, Rub IgG e Toxo IgG, que são controlados trimestralmente. As amostras utilizadas no controlo de qualidade externo são enviadas pela SEQC<sup>ML</sup>. Os resultados obtidos são depois comparados com os resultados de outros laboratórios participantes.

#### **8.5. Parâmetros analisados pelo Architect i2000 SR**

##### **8.5.1. Marcadores Tumorais**

Idealmente os marcadores tumorais são moléculas produzidas pelas células neoplásicas e que podem ser encontradas na forma de antigénio na superfície do tumor ou na forma circulante no sangue, urina ou outros fluidos. Os marcadores tumorais são importantes na medida em que permitem avaliar a existência, evolução ou resposta à terapêutica de um tumor maligno.<sup>17</sup>

Apesar de serem determinados na prática clínica, os marcadores tumorais não conseguem, por si só, fornecer um diagnóstico, uma vez que a maior parte não são específicos de uma neoplasia em particular, sendo sempre necessário associar as determinações destes marcadores a outros resultados clínicos como biópsias ou exames imagiológicos.<sup>17</sup>

##### **8.5.1.1. Antigénio cancerígeno 15.3**

O CA 15.3 é uma glicoproteína cuja determinação é feita em casos de cancro da mama com metástases. Para a deteção do CA 15.3 são utilizados dois anticorpos monoclonais: DF3 e I15D8. O anticorpo DF3 reage com um antigénio expresso nas zonas apicais das células epiteliais mamárias secretoras, no entanto este antigénio também pode ser expresso no citosol de células malignas. O anticorpo I15D8 é produzido contra o antigénio da membrana dos glóbulos de gordura do leite humano, que também se encontra na membrana e no citoplasma da maioria das células de carcinoma.<sup>18</sup>

Valores elevados de CA 15.3 são encontrados numa maior percentagem de cancros da mama com metástases do que em cancros da mama primários. Além do cancro da mama, os valores deste marcador tumoral também podem estar elevados em doenças benignas do fígado e da mama, ou ainda noutras doenças malignas como o cancro do pâncreas e o cancro do pulmão, entre outros.<sup>18</sup>

O CA 15.3 é um bom marcador para monitorizar a terapêutica e avaliar a progressão da doença em cancros da mama que metastizam, não sendo muito útil em cancros da mama primários uma vez que a maioria não apresenta um aumento dos valores de CA 15.3.<sup>18</sup>

### **8.5.1.2. Antígeno Cancerígeno 19.9**

O CA 19.9 é uma molécula de adesão intracelular cujos valores se encontram aumentados em pessoas com cancro do pâncreas ou cancro biliar, sendo por esta razão utilizado como marcador tumoral nestas doenças. Contudo, o valor de CA 19.9 também pode estar elevado noutras doenças malignas do trato gastrointestinal e em algumas doenças benignas como a cirrose ou a colestase.<sup>19</sup>

Este marcador está relacionado com os antígenos do grupo sanguíneo Lewis e apenas os grupos Le ( $\alpha$ - $\beta$ +) ou Le ( $\alpha$ + $\beta$ -) expressam o antígeno CA 19.9.<sup>20</sup> Quando determinado com um quadro clínico consistente com cancro do pâncreas, um valor de 1000 unidades internacionais por mililitro (UI/mL) indicam a presença de metástases.<sup>19</sup>

### **8.5.1.3. Antígeno Cancerígeno 125**

O CA 125 é uma glicoproteína expressa pelas células epiteliais do ovário e valores elevados deste antígeno são sugestivos de cancro das células epiteliais do ovário. Este marcador é detetado pelo anticorpo monoclonal OC125.<sup>18</sup>

Os valores de CA 125 podem estar elevados noutras doenças malignas como o cancro do endométrio, cancro do pâncreas, cancro do pulmão e cancro da mama, entre outros. Para além das doenças malignas, elevados valores de CA 125 também se podem verificar na fase folicular do ciclo menstrual ou em doenças benignas como cirrose, hepatite ou endometriose.<sup>18</sup>

O CA 125 é utilizado na avaliação da resposta à terapia no cancro das células epiteliais do ovário e a sua determinação também pode ser útil no rastreio de mulheres que tenham

história familiar de cancro do ovário, sendo necessária a confirmação através de outros exames médicos. Quando se trata de cancro do ovário, a concentração de CA 125 está correlacionada com o tamanho do tumor e o estado da doença. Após a quimioterapia, a determinação da concentração de CA 125 permite avaliar a resposta ao tratamento e o prognóstico da doença.<sup>18</sup>

#### **8.5.1.4. Antígeno Carcinoembrionário**

O Antígeno Carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína com uma massa molecular entre 150 e 300 Kilodaltons que se encontra aumentada em algumas doenças, como por exemplo o cancro colorretal ou o cancro do pulmão. Quando as concentrações de CEA se encontram continuamente elevadas num valor entre 5 a 10 vezes superior ao valor de referência é altamente sugestivo a presença de cancro do cólon. Quando se trata de cancro do cólon, as concentrações de CEA correlacionam-se com o estadio da doença.<sup>18</sup>

O CEA é também útil na monitorização do cancro da mama quando existem metástases, uma vez que as concentrações de CEA também aumentam. Já no cancro da mama que não apresenta metástases este aumento não se verifica e o CEA é menos sensível do que outros marcadores, como por exemplo o CA 15.3.<sup>18</sup>

#### **8.5.1.5. Alfa-Fetoproteína**

A Alfa-Fetoproteína (AFP) é um marcador de carcinoma hepatocelular e de carcinoma das células germinativas. A AFP é uma glicoproteína sintetizada em grande quantidade no saco vitelino fetal durante a fase embrionária.<sup>18</sup>

Em adultos saudáveis, as concentrações de AFP não excedem os 10 microgramas por litro ( $\mu\text{g/L}$ ), mas em mulheres grávidas esta concentração está aumentada. Em casos de hepatite ou cirrose estes valores podem atingir os 200  $\mu\text{g/L}$ . Os valores na ordem dos 1000  $\mu\text{g/L}$  são sugestivos de carcinoma hepatocelular e o tamanho do tumor pode ser correlacionado com os valores de AFP.<sup>18</sup>

A AFP é utilizada também para monitorizar a terapêutica do carcinoma hepatocelular e para determinar o prognóstico da doença.<sup>18</sup>

### **8.5.1.6. Antígeno Específico da Próstata**

O Antígeno Específico da Próstata (PSA) é uma protease serínica da família da calicreína produzida pela próstata. A maior parte do PSA está complexado com dois inibidores de protease ( $\alpha$ 1-antiquimiotripsina e  $\alpha$ 2-macroglobulina) e apenas uma pequena parte existe na forma livre.<sup>18</sup>

A determinação do PSA é muito utilizada no rastreio e monitorização do tratamento do cancro da próstata.<sup>18</sup> No entanto, os valores elevados de PSA não se verificam apenas em casos de cancro da próstata, mas também em prostatites e hiperplasias benignas da próstata. Quando os valores de PSA se encontram entre 4 nanogramas por mililitro (ng/mL) e 10 ng/mL pode ser particularmente útil efetuar a razão PSA Livre/PSA Total de modo a distinguir entre cancro da próstata e hiperplasia benigna da próstata. Pessoas com cancro da próstata apresentam uma razão PSA Livre/PSA Total menor do que pessoas com hiperplasias benignas.<sup>21</sup> Valores elevados de PSA devem sempre ser confirmados por outros exames como a biópsia e após o tratamento do cancro deve efetuar-se a quantificação do PSA a cada 6 meses durante 5 anos e após este período deve ser realizado anualmente, de forma a averiguar a eficácia do tratamento.<sup>19</sup>

## **8.5.2. Painel Toxoplasma/Rubéola/Citomegalovírus (TORC)**

### **8.5.2.1. *Toxoplasma gondii* IgG e *Toxoplasma gondii* IgM**

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular pertencente ao filo *Apicomplexa* e é o agente etiológico da Toxoplasmose. Os hospedeiros definitivos deste parasita são os gatos e outros felídeos, enquanto o Homem, outros mamíferos e as aves constituem os hospedeiros intermediários. Num adulto cujo sistema imunológico seja totalmente competente a Toxoplasmose é habitualmente assintomática e autolimitada, mas em imunodeprimidos pode ser grave. Esta doença também pode ser congénita e a probabilidade de a grávida contrair a infeção é maior no terceiro trimestre de gestação do que no primeiro, no entanto, quando a infeção ocorre no primeiro trimestre pode levar a complicações graves como o aborto.<sup>22</sup>

O ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* apresenta uma fase sexuada no hospedeiro definitivo e uma fase assexuada no hospedeiro intermediário. Os felídeos são infetados ao ingerir os quistos que têm os bradizoítos, que vão depois sofrer a transformação em ooquistos no trato intestinal do felídeo. Estes ooquistos são eliminados nas fezes e são altamente resistentes às condições ambientais, transformando-se em esporozoítos que são as formas



infetantes ingeridas pelo hospedeiro intermediário. Uma vez no hospedeiro, os esporozoítos diferenciam-se em taquizoítos, uma forma rápida de replicação, conseguindo invadir as células rapidamente durante a fase aguda da infecção. A replicação dos taquizoítos leva à lise celular e à libertação destes para a corrente sanguínea, ocorrendo a destruição dos tecidos invadidos. Os taquizoítos transformam-se depois em quistos que contêm bradizoítos, podendo estes quistos permanecer no estado latente nos tecidos do hospedeiro para o resto da vida.<sup>22</sup>

A resposta imunológica do hospedeiro consiste na produção de anticorpos que eliminam as formas extracelulares do parasita. Os anticorpos IgM surgem nos primeiros dias da infecção e os anticorpos IgG surgem cerca de duas semanas após o início da infecção e permanecem para o resto da vida no hospedeiro, refletindo a latência da infecção.<sup>22</sup>

A deteção de anticorpos IgM e IgG é realizada habitualmente no início da gravidez para averiguar a existência de imunidade contra a Toxoplasmose. Se forem detetados anticorpos IgG e se o resultado para os anticorpos IgM for negativo então a grávida está imune para a Toxoplasmose e o risco de contrair a infecção é muito reduzido. O resultado negativo para os anticorpos IgG e positivo para IgM é sugestivo de uma infecção ativa, no entanto o diagnóstico deve ser confirmado por outra técnica. Neste caso deve-se iniciar de imediato o tratamento e repetir o teste após 3 semanas. Se ao repetir a análise os anticorpos IgM e IgG apresentarem um resultado positivo então trata-se de uma infecção recente, no entanto se apenas os anticorpos IgM se mantiverem positivos a grávida tem anticorpos não específicos, o que significa que não há infecção, no entanto também não existe imunidade. Por último, um resultado negativo para ambas as classes de anticorpos é indicativo que a grávida não tem imunidade e por isso deve ser realizada a sua monitorização serológica durante a gravidez.<sup>23</sup>

#### **8.5.2.2. Rubéola IgG e Rubéola IgM**

O Vírus da Rubéola, agente etiológico da Rubéola, pertence à família *Togaviridae* e ao género *Rubivirus* e é um vírus envelopado de RNA (ácido ribonucleico) de polaridade positiva.<sup>22</sup> A transmissão deste vírus ocorre por contacto direto com secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas e o tempo de incubação da doença é de 14 a 17 dias, podendo ir até 21 dias. Os sintomas mais comuns da Rubéola incluem erupções rosadas na pele que se espalham rapidamente do rosto ao pescoço, tronco e extremidades. Outros sintomas comuns são a febre baixa e o aparecimento de gânglios palpáveis e dolorosos na nuca, que podem surgir mesmo antes das erupções na pele.<sup>24</sup>

A infecção pelo Vírus da Rubéola durante a gravidez pode trazer complicações resultantes da passagem do vírus através da placenta. Essas complicações podem ser o aborto espontâneo, a morte à nascença ou malformações congénitas. A transmissão do vírus ao feto é mais comum no primeiro trimestre da gestação.<sup>24</sup>

O primeiro teste serológico para a deteção de anticorpos IgM e IgG contra o vírus da rubéola deve ser feito aquando do planeamento da gravidez pois se a mulher não for imune deverá ser vacinada contra a Rubéola. Se a mulher já estiver grávida o teste deverá ser feito o mais precocemente possível. Se o resultado do teste serológico for negativo para IgM e IgG significa que não há infecção nem imunidade. Um resultado negativo para IgM e positivo para IgG com valores médios a elevados significa que há imunidade bem estabelecida ou recente, mas no caso de os valores de IgG serem baixos o teste deve ser repetido 2 ou 3 semanas depois. Neste segundo teste, se ocorrer um aumento de 4 vezes ou mais no título de anticorpos IgG ou se o resultado de IgM for positivo significa que ocorreu infecção e a grávida deve ser referenciada. Por outro lado, se os valores de IgG se mantiverem estáveis significa que existe imunidade antiga. Por último, se o resultado do teste for positivo para IgM e negativo para IgG estamos na presença de uma infecção ativa.<sup>24</sup>

### **8.5.2.3. Citomegalovírus IgG e Citomegalovírus IgM**

O Citomegalovírus (CMV) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e ao género *Cytomegalovirus* e é um vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico) de cadeia dupla linear que provoca citomegalia, ou seja, um aumento da célula infetada.<sup>22</sup>

A transmissão do vírus ocorre por contacto sexual ou por contacto com secreções como a saliva, urina, secreções cervicais ou sémen. A transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue que contenha leucócitos infetados. Após ocorrer a infecção o indivíduo pode ser sintomático ou assintomático e o vírus pode persistir no hospedeiro por tempo indefinido, estabelecendo latência. A reativação do CMV pode ocorrer quando existe um compromisso da imunidade causado por uma baixa de linfócitos T, como acontece por exemplo com a toma de imunossuppressores. A infecção por CMV provoca um quadro clínico semelhante ao da Mononucleose Infeciosa composto por febre persistente, fadiga, astenia e mialgia, entre outros sintomas. O período de incubação do vírus varia entre 20 a 60 dias e a doença pode durar entre 2 a 6 semanas.<sup>24</sup>

Quando a infecção ocorre na gravidez, o CMV pode ser transmitido ao feto e resultar numa infecção ligeira e sem complicações aparentes ou numa doença grave e disseminada. A

hepatoesplenomegalia e a icterícia constituem as consequências mais comuns nestes casos, mas outras consequências como microcefalia e prematuridade podem ocorrer. Recém-nascidos com infecção assintomática à nascença podem mais tarde vir a desenvolver um quadro de anomalias psicomotoras, auditivas, oculares ou dentárias. A infecção da criança pode ainda ocorrer no momento do nascimento por contacto com as secreções vaginais da mãe ou através do leite materno, que também constitui um veículo de transmissão. Nestes casos, a maioria das infeções mantém-se assintomática.<sup>24</sup>

A realização do teste serológico para a deteção de anticorpos IgM e IgG também faz parte das análises realizadas na gravidez. Um resultado negativo para ambos os anticorpos revela que não existe imunidade e a grávida deverá tomar todas as precauções necessárias e aconselhadas. Um resultado positivo para IgG com valores médios a elevados significam imunidade bem estabelecida ou recente, por outro lado, valores muito baixos ou muito altos de IgG carecem de uma repetição do teste 4 semanas depois. Se no segundo teste houver um aumento de 4 vezes ou mais no título de IgG ou se os anticorpos IgM positivarem pode concluir-se que existe infecção e a grávida deve ser referenciada, no entanto se os valores de IgG se mantiverem estáveis significa que existe imunidade antiga. Por fim, um resultado positivo para IgM e IgG sugerem uma infecção evolutiva, no entanto é necessário confirmar este resultado por outra técnica antes de fornecer um diagnóstico.<sup>24</sup>

### **8.5.3. Marcadores Virais**

#### **8.5.3.1. Vírus da Imunodeficiência Humana**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pertence à família *Retroviridae* e ao género *Lentivirus* e é um vírus de RNA de cadeia simples linear com polaridade positiva e envelopado. Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2 que partilham apenas 40% a 50% da homologia genética.<sup>22</sup>

A transmissão do vírus pode ocorrer por via sexual, pela partilha de objetos contaminados como agulhas no caso dos utilizadores de drogas injetáveis, ou de mãe para filho na gravidez. A infecção do indivíduo ocorre quando a glicoproteína gp120 do envelope se liga ao recetor CD4 presente na superfície dos linfócitos T *helper* ( $T_H$ ), necessitando também de um dos co-recetores CCR5 ou CXCR4 para conseguir estabelecer a ligação. Durante a infecção primária o vírus consegue infetar um grande número de linfócitos  $T_H$ . Nesta fase ainda não há produção de anticorpos e por isso a carga viral aumenta. Nesta fase o diagnóstico da infecção pode ser realizado através da pesquisa do antigénio p24 da cápside viral. A virémia atinge um

pico até ao aparecimento da resposta imune adaptativa que se caracteriza pela produção de linfócitos T citotóxicos ( $T_c$ ) específicos contra o HIV. No entanto, nesta fase já o vírus estabeleceu latência nos seus reservatórios e ocorreu a destruição de um grande número de linfócitos  $T_h$ . A carga viral pode manter-se estável durante vários anos, ocorrendo continuamente um decréscimo do número de linfócitos  $T_h$ . Quando o sistema imunológico deixa de conseguir responder à infeção, a carga viral aumenta e ocorre a destruição dos poucos linfócitos  $T_h$  que ainda existem, instalando-se um quadro de SIDA.<sup>22</sup>

A deteção de anticorpos contra o HIV constitui o método mais comum de diagnóstico. No entanto, existe um período janela que consiste no intervalo de tempo entre o momento em que ocorre a infeção e o momento a partir do qual os anticorpos são detetáveis no soro. Por esta razão, o teste de pesquisa de anticorpos apenas deve ser realizado cerca de 3 meses após o início da infeção. Um resultado positivo para a presença de anticorpos deve ser repetido e caso o resultado se mantenha positivo este deve ser repetido por uma técnica diferente como método confirmatório. Uma deteção precoce da infeção por HIV é de extrema importância pois no início da mesma a carga viral é muito elevada e o indivíduo constitui um veículo de transmissão da doença.<sup>25</sup>

### **8.5.3.2. Vírus da Hepatite A IgG e Vírus da Hepatite A IgM**

O Vírus da Hepatite A (HAV) pertence à família *Picornaviridae* e ao género *Hepatovirus* e é um vírus de RNA de cadeia simples linear de polaridade positiva. O HAV é o agente etiológico da Hepatite A e é um vírus resistente a agentes físicos e químicos, conseguindo por esta razão permanecer viável na natureza durante vários meses. A transmissão do HAV ocorre predominantemente por via fecal-oral através do contacto próximo com pessoas infetadas ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados. A transmissão também pode ocorrer por contacto sexual ou por transfusão sanguínea, embora raramente estas situações se verifiquem. O HAV é o responsável pela maior parte das hepatites agudas virais e as manifestações clínicas da doença são idênticas às outras hepatites, não sendo possível distinguir a Hepatite A sem recorrer a testes serológicos para a deteção de anticorpos.<sup>22</sup>

O período de incubação do vírus varia entre 10 e 50 dias e durante este intervalo de tempo o indivíduo encontra-se assintomático. Nesta fase da infeção a carga viral é elevada, o que torna o período de incubação na fase de maior risco de transmissão do HAV. Os primeiros sintomas da Hepatite A aguda são inespecíficos, duram cerca de 10 dias e incluem anorexia, fadiga, mal-estar, febre, vómitos, entre outros sintomas. Após os primeiros sintomas começam

a surgir sintomas sugestivos de disfunção hepática como a urina escura, as fezes descoloradas e a icterícia. A evolução da doença é benigna e a recuperação é total, sendo o vírus eliminado do organismo e induzida imunidade contra uma possível reinfeção.<sup>22</sup>

A detecção de anticorpos neutralizantes específicos para o HAV é a abordagem mais comum no diagnóstico da Hepatite A. Os anticorpos IgM são produzidos normalmente entre 4 a 6 semanas após o início da infecção e encontram-se detetáveis no soro até 6 meses. Os anticorpos IgG aparecem numa fase mais tardia e são produzidos durante vários anos, conferindo imunidade duradoura. Um resultado positivo para anticorpos IgM e negativo para anticorpos IgG sugerem uma Hepatite A aguda, enquanto o inverso é indicativo de imunidade.<sup>22</sup>

### **8.5.3.3. Marcadores da Hepatite B**

O Vírus da Hepatite B (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae* e ao género *Orthohepadnavirus* e é um vírus constituído por DNA de cadeia dupla circular. Este vírus é constituído por envelope no qual se encontra o antigénio de superfície (AgHBs). A transmissão pode ocorrer por via sexual, pelo contacto com objetos contaminados como as agulhas ou pode também ocorrer a transmissão de uma mãe portadora para o filho. A maioria das infeções por HBV evolui para Hepatite B crónica.<sup>22</sup>

O diagnóstico inicial de Hepatite pode ser feito com base nos sintomas clínicos e na elevação das concentrações séricas das enzimas hepáticas, no entanto a identificação do agente etiológico tem de ser feita com base na pesquisa de antigénios ou anticorpos marcadores de Hepatite B. O AgHBs é o marcador característico de infeção por HBV, aparecendo no soro 1 a 10 semanas após o início da infeção e torna-se indetetável normalmente ao fim de 4 a 6 meses. No decorrer da infeção aguda e pouco tempo depois do aparecimento do AgHBs surge o Anticorpo IgM contra o Antigénio nuclear do Vírus da Hepatite B (AcHBc IgM) e consequentemente surge também o Anticorpo total contra o Antigénio nuclear do Vírus da Hepatite B (AcHBc Total), podendo este último ser detetável no soro durante anos. Quando o AgHBs se torna indetetável surge o Anticorpo contra o Antigénio de superfície do Vírus da Hepatite B (AcHBs), indicando que a infeção está em fase de resolução. O AcHBs pode ainda surgir como resultado da vacinação, conferindo imunidade contra o HBV.<sup>22</sup>

#### **8.5.3.4. Vírus da Hepatite C**

O Vírus da Hepatite C (HCV), pertencente à família *Flaviviridae* e ao género *Hepacivirus*, é um vírus constituído por envelope e genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva. O HCV é transmitido maioritariamente através do contacto com o sangue de indivíduos infetados, como acontece, por exemplo, com a partilha de agulhas e seringas em utilizadores de drogas injetáveis. A maioria dos indivíduos com Hepatite C aguda não apresenta sintomas e quando apresentam, esses sintomas incluem mal-estar, náuseas, dores abdominais e icterícia. Entre 70% e 90% dos doentes com Hepatite C aguda evoluem para Hepatite C crónica por não conseguirem eliminar o vírus, sendo o HCV a principal causa de hepatite crónica viral. A maioria dos doentes com Hepatite C crónica são assintomáticos, no entanto sequelas mais tardias da doença como a cirrose ou o carcinoma hepatocelular podem surgir.<sup>22</sup>

O diagnóstico da Hepatite C baseia-se na pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Hepatite C (AcHCV) no soro. Contudo, a presença de anticorpos no soro não é garantia de que o vírus está presente pois pode tratar-se de uma infeção antiga e resolvida mas os anticorpos AcHCV ainda permanecerem no soro. Para averiguar a existência de uma infeção ativa o Coimbralab envia as amostras para laboratórios externos para ser confirmado o diagnóstico.<sup>22</sup>

### **8.5.4. Endocrinologia**

#### **8.5.4.1. Hormona Folículo-estimulante e Hormona Luteinizante**

A Hormona Folículo-Estimulante (FSH) e a Hormona Luteinizante (LH) são hormonas glicoproteicas sintetizadas na adenohipófise. Na mulher, a FSH estimula o crescimento e maturação folicular, a alteração das paredes do endométrio durante a fase proliferativa e a secreção de estrogénios pelos folículos maduros quando está na presença de LH. Nos homens a FSH também tem um papel importante na estimulação da espermatogénese. A LH em conjunto com a FSH estimula a ovulação e a secreção de progesterona. Na mulher a LH estimula a formação do corpo lúteo e no homem estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig.<sup>18</sup>

### **8.5.4.2. Gonadotrofina Coriónica Humana**

A Gonadotrofina Coriónica Humana é uma hormona glicoproteica produzida pelos trofoblastos da placenta após a fertilização e é constituída por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ , sendo doseada apenas a subunidade  $\beta$  ( $\beta$ -hCG).<sup>18</sup>

As concentrações de  $\beta$ -hCG encontram-se elevadas na gravidez, em doenças trofoblásticas e em tumores das células germinativas. Por esta razão, além de ser uma análise utilizada para diagnosticar e monitorizar uma gravidez, a  $\beta$ -hCG também constitui um marcador de tumores trofoblásticos. Concentrações muito elevadas são verificadas em casos de tumores trofoblásticos, no entanto esta condição também se verifica noutros tumores e por esta razão a  $\beta$ -hCG não é um bom marcador de diagnóstico de tumores trofoblásticos mas sim um bom marcador para a monitorização do tratamento e avaliação da progressão do tumor, uma vez que a concentração de  $\beta$ -hCG se correlaciona com o volume do tumor.<sup>18</sup>

## **8.6. Técnicas Manuais**

### **8.6.1. Teste Imunológico de Gravidez**

O Teste Imunológico de Gravidez (TIG) utiliza a técnica de *lateral flow assay* para detetar a  $\beta$ -hCG. Numa gravidez normal, a  $\beta$ -hCG pode ser detetada na urina entre o sétimo e décimo dia após a conceção.

A cassete de teste é composta por uma membrana de nitrocelulose. Na membrana existe uma zona que precede a janela de resultados e onde se encontra um conjugado de partículas que podem ser de ouro. Estas partículas estão conjugadas com um anticorpo específico para a  $\beta$ -hCG e estão marcadas com um corante. Para além do conjugado existe ainda uma linha de teste (T) onde está fixado outro anticorpo também específico para a  $\beta$ -hCG e uma linha de controlo (C) onde está fixado um anticorpo específico para o anticorpo do conjugado.<sup>26</sup>

Quando a urina é adicionada à cassete, se esta tiver  $\beta$ -hCG vai ocorrer a sua ligação ao conjugado, que depois migra ao longo da membrana e se liga ao segundo anticorpo presente na linha T, resultando no aparecimento de uma linha T visível na janela de observação dos resultados. A validação do resultado é garantida pelo aparecimento da linha C correspondente ao controlo, que indica a correta execução do teste.<sup>26</sup>

### 8.6.2. Reação de Paul-Bunnell

A reação de Paul-Bunnell é utilizada no diagnóstico da Mononucleose Infeciosa, cujo agente etiológico é o Vírus Epstein-Barr (EBV). O EBV é um vírus constituído por DNA de dupla cadeia e pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae* e Género *Lymphocryptovirus*. Este vírus transmite-se através do contacto íntimo com secreções orais, nomeadamente a saliva, ocorrendo a infeção primária a nível das células epiteliais da orofaringe e nasofaringe. A infeção é posteriormente transmitida aos Linfócitos B, que expressam o recetor do EBV na sua superfície e onde pode ocorrer uma infeção lítica, uma infeção latente, ou existir uma proliferação policlonal.<sup>22</sup>

A Mononucleose Infeciosa corresponde à infeção primária por EBV e resulta de uma resposta exagerada dos Linfócitos T citotóxicos, causadora de hepatosplenomegalia e linfadenopatias, e da infeção lítica do EBV nas células epiteliais da orofaringe, responsável pela faringite. Os linfócitos atípicos que surgem no quadro clínico da Mononucleose Infeciosa são os Linfócitos T reativos à infeção por EBV. Esta doença caracteriza-se, na maioria dos casos, por uma tríade clínica de febre, faringite e linfadenopatia e também por ser autolimitada, durando em média 2 a 3 semanas.<sup>22</sup>

A reação de Paul-Bunnell tem por base a deteção de anticorpos heterófilos produzidos pelos Linfócitos B em resposta à sua ativação pelo EBV, utilizando como reagente partículas de látex ligadas a eritrócitos de carneiro que vão funcionar como antigénios. Caso se esteja na presença de Mononucleose Infeciosa, irá ocorrer aglutinação como resultado da reação dos anticorpos presentes no soro contra os eritrócitos de carneiro. Caso o resultado do teste seja negativo e não se verifique a existência de anticorpos heterófilos, pode recorrer-se à serologia específica que consiste na pesquisa de anticorpos contra antigénios específicos do EBV, como os anticorpos produzidos contra a cápside viral (Anti-VCA).<sup>22</sup>

### 8.6.3. Reação de Weil-Felix

A reação de Weil-Felix é o teste utilizado para a pesquisa de rickettsias, bactérias com a forma de cocobacilos e intracelulares obrigatórias. O género *Rickettsia* divide-se em dois grandes grupos: o grupo do tifo e o grupo das febres exantemáticas. O grupo do tifo inclui duas espécies: *Rickettsia prowazekii*, agente etiológico do tifo epidémico, transmitido pelo piolho do corpo, e *Rickettsia typhi*, agente etiológico do tifo endémico ou murino e cujo vetor é a pulga do rato. O grupo das febres exantemáticas engloba cerca de 15 espécies de rickettsias



patogénicas para o Homem e que são transmitidas por vetores como carraças, ácaros e pulgas.<sup>27</sup>

Quando inoculadas na derme do hospedeiro, estas bactérias invadem os vasos e os nódulos linfáticos e infetam as células endoteliais dos vasos sanguíneos. Uma vez no citoplasma das células, estas multiplicam-se por divisão binária e no caso do grupo das febres exantemáticas estas proliferam e infetam outras células endoteliais. As rickettsias do grupo tifo, por não possuírem a capacidade de proliferar e infetar outras células, multiplicam-se e acumulam-se no citoplasma da célula.<sup>27</sup>

A proliferação das rickettsias provoca um aumento da permeabilidade vascular com perda de fluidos para o espaço intersticial, tendo consequências como edema e hipovolémia, entre outras, que levam ao comprometimento de vários órgãos.<sup>27</sup>

O teste de Weil-Felix baseia-se numa reação cruzada dos anticorpos anti-*Rickettsia* presentes no soro com os antígenos de algumas estirpes de *Proteus* (Estirpes OX2 e OX19 de *Proteus vulgaris* e Estirpe OXK de *Proteus mirabilis*). A reação de aglutinação entre os antígenos em suspensão e o soro indicam um resultado positivo para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* e por isso a existência de uma infeção ativa ou anterior por rickettsias.<sup>28</sup> Devido à baixa sensibilidade e especificidade desta técnica, atualmente é utilizada a técnica de imunofluorescência indireta como método de referência para o diagnóstico serológico de infeções por rickettsias.<sup>27</sup>

#### **8.6.4. Reação de Widal**

A reação de Widal é um teste utilizado no diagnóstico da Febre Tifoide e Febre Paratifoide. O Género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e engloba mais de 2500 serotipos distintos. A Febre Tifoide e Febre Paratifoide estão associadas aos serotipos *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*, respetivamente.<sup>27</sup>

Este teste permite rastrear a presença de anticorpos no soro contra o antígeno somático O e o antígeno flagelar H. Para tal, é utilizada uma suspensão com antígenos O e H de *Salmonella typhi* (TO e TH) que quando adicionados ao soro irão aglutinar caso este contenha anticorpos Anti-TO e Anti-TH. Este é um teste qualitativo que permite identificar a presença de anticorpos. Caso existam anticorpos procede-se ao ensaio semi-quantitativo através de sucessivas diluições para determinar o título de anticorpos.<sup>29</sup>

### **8.6.5. Reação de Wright**

A reação de Wright é o teste utilizado para o diagnóstico da brucelose, uma doença sistêmica causada por bactérias do gênero *Brucella*, sendo as espécies *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* as mais patogênicas para o Homem. A brucelose caracteriza-se por ser uma doença febril aguda e com um quadro clínico de cefaleias, mialgias, suores noturnos, artralgias, entre outros.<sup>27</sup>

Estas bactérias entram no organismo principalmente pelas mucosas oral e digestiva e multiplicam-se nos tecidos linfáticos, disseminando-se numa fase inicial aos gânglios linfáticos, baço, fígado e medula óssea e posteriormente ao coração, sistema geniturinário e sistema nervoso central.<sup>27</sup>

O teste de Wright é um teste de aglutinação sérica que permite diagnosticar precocemente a brucelose, uma vez que deteta a presença de anticorpos IgM no soro logo na segunda semana após a infecção.<sup>27</sup> Este teste baseia-se na reação de aglutinação entre antígenos de *Brucella*, presentes no reagente, e anticorpos contra a bactéria que estão presentes no soro, indicativo de infecção. O título de anticorpos permite avaliar o estado e a evolução da infecção pois à medida que esta avança para a cura a positividade diminui.<sup>30,31</sup>

### **8.6.6. Teste da Reagina Plasmática Rápida**

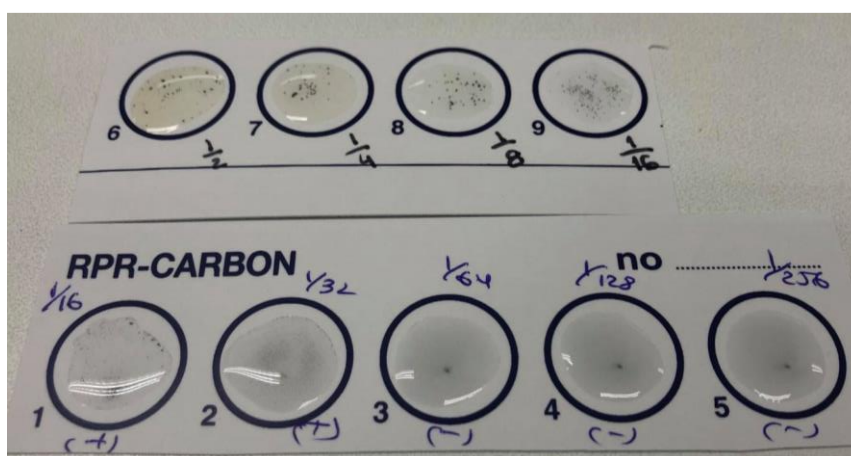
O teste da reagina plasmática rápida (RPR) permite diagnosticar a sífilis, doença causada pelo agente infeccioso *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. Esta bactéria tem a forma de espiroqueta e pode ser identificada pelo seu movimento característico quando observada em microscopia de fundo escuro. A sua mobilidade é um fator de virulência, conferindo-lhe a capacidade de invadir e se disseminar pelos tecidos.<sup>27</sup>

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível que compreende três estádios clínicos. O primeiro estágio caracteriza-se pelo aparecimento de uma pápula no local de entrada que rapidamente evolui para uma infecção localizada, o chamado cancro duro, e que corresponde a um período infeccioso devido à presença do microrganismo nas lesões. Dá-se a evolução para o segundo estágio da doença se esta não for tratada e ocorre a disseminação a outros tecidos, resultando num período altamente infeccioso. O terceiro estágio da doença pode surgir muitos anos após a infecção primária e apenas em alguns casos, no entanto nesta fase já não é contagiosa. A sífilis também pode ser transmitida por uma mãe infetada ao feto durante a fase de gestação ou no nascimento, podendo levar a complicações sérias como o parto prematuro,

morte fetal ou ainda a sífilis congênita. Por esta razão é importante o rastreio da sífilis na gravidez.<sup>27</sup>

A resposta à infecção por *Treponema pallidum* leva à produção de anticorpos IgG e IgM anti-treponema, as chamadas reaginas, que são os anticorpos detetados pelo teste RPR.<sup>27</sup> Este teste é um método não treponémico e utiliza como antígeno uma suspensão de cardiolipina, lecitina e colesterol misturada com partículas de carvão.<sup>32</sup>

Quando se dá a mistura do antígeno ligado às partículas de carvão com o soro, se nele existirem reaginas então irá ocorrer uma reação de floculação que pode ser visível a olho nu ao fim de 8 minutos, como se pode ver na **Figura 3**. Se existir floculação significa que o resultado é positivo e têm de ser feitas várias diluições para determinar o título de anticorpos.<sup>32</sup>



**Figura 3** – Teste da Reagina Plasmática Rápida. Na figura está representado um resultado positivo até à diluição 1/32.

## 9. Procedimento Pós-analítico

Após o processamento de todas as amostras e a realização de todas as análises requisitadas os resultados são avaliados pelos técnicos superiores de laboratório de forma a averiguar se existe a necessidade de repetir alguma análise ou se os resultados podem ser validados.

Após serem validados pelos técnicos, os resultados são novamente avaliados pela diretora técnica do laboratório e posteriormente são impressos os boletins e entregues aos utentes. Os boletins de resultados podem ser entregues ao utente de forma presencial no laboratório ou os resultados podem ser consultados *online* com recurso a um código de acesso fornecido pelo laboratório.

## **PARTE II – Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra**

### **I. Caracterização do Local de Estágio**

O Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Coimbra (LACUC) iniciou a sua atividade em outubro de 1983 e está atualmente sob a direção técnica da Professora Doutora Ana Miguel Matos. Desde o mês de abril de 2020 que o LACUC se encontra em funcionamento no edifício da Faculdade de Medicina do Polo I da Universidade de Coimbra, onde está exclusivamente dedicado ao rastreio, diagnóstico e monitorização da COVID-19, doença infecciosa provocada pelo vírus SARS-CoV-2.

### **2. Procedimento Pré-analítico**

O laboratório recebe diariamente amostras de diversos locais como o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), o Instituto Português de Oncologia (IPO), Drive-in de Coimbra, Domicílios, entre outros. Além da receção destas amostras, o LACUC tem em vigor um protocolo com o Governo da Madeira e dos Açores, o que permite a realização do teste gratuitamente a quem viaje para estes locais, sendo necessário o agendamento prévio.

A partir do mês de setembro de 2020 o LACUC começou também a realizar testes de rastreio à comunidade da Universidade de Coimbra, realizando em média 100 testes diários a estudantes e funcionários da instituição selecionados aleatoriamente. Atualmente também já é possível realizar o teste de diagnóstico da COVID-19 no LACUC mediante a apresentação de uma credencial do Serviço Nacional de Saúde ou da ADSE.

Após a receção das amostras no laboratório, estas são registadas no sistema informático, onde são inseridas todas as informações de cada utente e é atribuído um código alfanumérico a cada amostra. No caso dos testes de rastreio à comunidade universitária e das pessoas que vão viajar os dados são inseridos previamente no sistema informático, antes da colheita da amostra. Depois de colhidas e inseridas no sistema informático, as amostras seguem para o laboratório para serem processadas.

### 3. Amostras

No LACUC são analisadas dois tipos de amostras: a zaragatoa nasofaríngea e o soro. A zaragatoa nasofaríngea é utilizada no diagnóstico da COVID-19 pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa (qRT-PCR), bem como para o teste rápido de pesquisa do antígeno do vírus SARS-CoV-2, utilizado no rastreio da comunidade universitária. O soro é a amostra utilizada para a realização do teste serológico no qual se deteta a presença de anticorpos IgM e IgG contra o vírus.

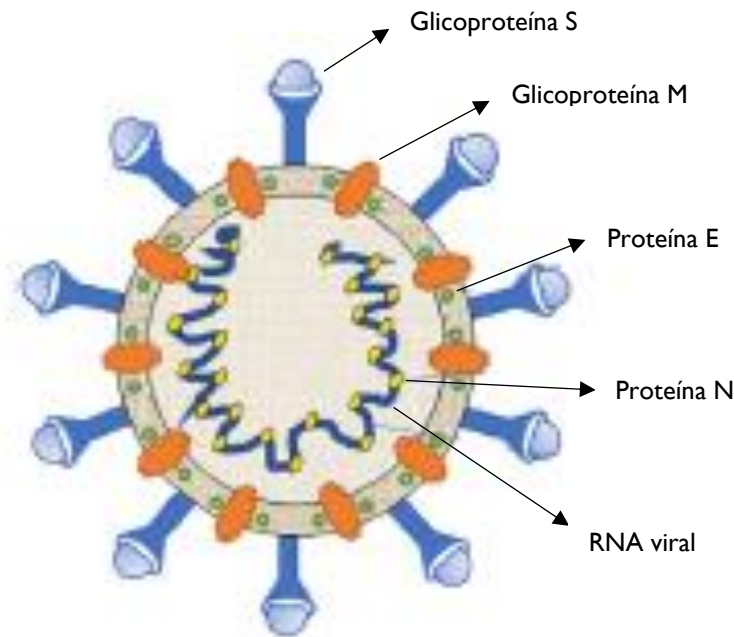
### 4. Avaliação Externa da Qualidade

A avaliação externa da qualidade permite avaliar a exatidão dos resultados emitidos pelo laboratório. No LACUC esta avaliação é assegurada pela entidade *LabQuality*, que envia as amostras que são processadas como uma amostra comum.

Após todo o processo de análise o laboratório envia os seus resultados à *LabQuality* e estes são avaliados e comparados com os resultados de outros laboratórios participantes no mesmo programa de avaliação externa da qualidade.

### 5. Vírus SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) (**Figura 4**), responsável pela doença COVID-19, é um novo coronavírus descoberto no final de 2019 na China. Este é um vírus de RNA de polaridade positiva, não segmentado e envelopado pertencente à família *Coronaviridae* e ao género *Coronavirus*.<sup>33</sup> É constituído por várias proteínas estruturais: glicoproteína S (superfície), glicoproteína M (membranar), proteína E (envelope) e a proteína N (nucleocápside) que está associada ao RNA viral.<sup>34</sup>



**Figura 4** – Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2. O vírus SARS-CoV-2 é constituído por uma cadeia simples de RNA e apresenta quatro proteínas estruturais essenciais: glicoproteína S (superfície), glicoproteína M (membranar), proteína E (envelope) e proteína N (nucleocápside). *Adaptado de:* Naqvi, A. A. T. *et al.* (2020).

Este vírus é transmitido de pessoa a pessoa através do contacto com gotículas infecciosas ou através de contacto direto, tendo a doença um período de incubação de 5 a 14 dias. A infeção do indivíduo ocorre quando há a invasão das células hospedeiras pelo vírus através da glicoproteína S, que é constituída por duas subunidades: a subunidade S1 responsável pela ligação do vírus ao recetor e a subunidade S2 que medeia a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. A glicoproteína S liga-se ao recetor, a enzima conversora da angiotensina II (ECAII), que está presente na superfície das células do trato respiratório inferior.<sup>33</sup>

A maioria das pessoas infetadas pelo vírus SARS-CoV-2 são assintomáticas, no entanto quando ocorre a manifestação de sintomas os mais comuns são a febre, tosse e dificuldade respiratória. Pode ainda ocorrer a manifestação de outros sintomas como fadiga, dor de cabeça, corrimento nasal e casos mais graves da doença podem mesmo evoluir para pneumonia grave e levar à morte.<sup>36</sup>

## **6. Procedimento Analítico**

### **6.1. Diagnóstico da COVID-19 por qRT-PCR**

A técnica de qRT-PCR é considerada o método de referência para o diagnóstico da COVID-19, pois permite a obtenção de resultados com elevado grau de sensibilidade e especificidade.<sup>37</sup> A técnica de biologia molecular utilizada no LACUC permite detetar, em amostras obtidas por zaragatoa nasofaríngea, a presença das sequências codificantes dos genes N e RdRP (codificam a nucleocápside e a RNA Polimerase RNA dependente, respetivamente) do vírus.

#### **6.1.1. Colheita e Inativação das Amostras**

A amostra é obtida com uma zaragatoa nasofaríngea, sendo esta zaragatoa depois armazenada num tubo que contém tiocianato de guanidina para manter a integridade do RNA viral até ao seu processamento.

Depois da sua chegada ao laboratório, as amostras entram na câmara de fluxo laminar tipo II para se proceder à inativação das partículas virais, utilizando tampão de lise que atua como agente desnaturante das proteínas virais. Este tampão contém detergente e também tiocianato de guanidina, mas em maior concentração do que aquele que é utilizado na conservação da amostra até ao processamento.<sup>38</sup>

#### **6.1.2. Extração e Preparação das Amostras**

Após a inativação, as amostras seguem para a extração e amplificação, onde é utilizado o equipamento *Abbott m2000 RealTime System* que consiste em dois aparelhos: o *Abbott m2000sp* para a extração do RNA viral e preparação das amostras para a reação de amplificação, e o *Abbott m2000rt* para a amplificação e deteção do RNA viral.

Na fase de extração, o equipamento *Abbott m2000sp* pode processar corridas de 24, 48, 72 ou 96 amostras. Este equipamento utiliza um *kit* de reagentes comercial para a extração que contém: o tampão de lise, duas soluções de lavagem, o tampão de eluição e micropartículas magnéticas. Ao tampão de lise e às duas soluções de lavagem são adicionadas quantidades específicas de etanol.

Em cada corrida é utilizado um controlo negativo e um controlo positivo que são processados da mesma forma que as amostras para garantir a validação da corrida. O controlo

negativo consiste numa solução tampão de sulfato de amónia com detergente e o controlo positivo, além destes mesmos componentes, contém um plasmídeo com sequências que codificam os genes N e RdRP do vírus SARS-CoV-2.<sup>38</sup> Adicionalmente é ainda utilizado um tubo com água que serve também como controlo negativo adicional, e é colocado entre as amostras.

Paralelamente é utilizado um controlo interno (CI) que contém uma sequência de RNA totalmente independente do vírus e que codifica um gene de abóbora. O CI é adicionado ao tampão de lise no momento da preparação dos reagentes e é amplificado em cada uma das amostras, permitindo desta forma assegurar a validação da corrida.

Durante o processo de extração, o tampão de lise desnatura as proteínas virais e o RNA viral liga-se às micropartículas magnéticas. De seguida todos os componentes da amostra que não ficaram ligados às micropartículas são removidos pela lavagem e por fim o RNA viral é eluído das micropartículas por ação do tampão de eluição.<sup>39</sup> Após a extração do RNA é necessária a intervenção do operador para a preparação da reação de amplificação. O kit comercial de reagentes que é utilizado na amplificação contém os componentes necessários à qRT-PCR, e são eles: as sondas específicas das sequências a amplificar, o corante fluorescente ROX™ (carboxi-X-rodamina) que serve como sonda de referência, manganês que serve de cofator da polimerase, os *primers* complementares das sequências a amplificar e a rTth DNA polimerase, uma enzima termoestável que funciona como transcriptase reversa e DNA polimerase.<sup>40</sup>

### 6.1.3. Amplificação e Detecção do RNA

Após o processo de preparação das amostras no aparelho *Abbott m2000sp* estas são transferidas para o *Abbott m2000rt* onde ocorre a amplificação e deteção do RNA viral. Neste aparelho é utilizada a técnica de qRT-PCR que consiste na amplificação da sequência alvo e na sua deteção, através da emissão de fluorescência, durante o decorrer da reação de amplificação.

Durante a reação de amplificação os *primers* específicos ligam-se às sequências do RNA viral e este é convertido em DNA complementar (cDNA) por ação da rTth DNA polimerase através da sua função de transcriptase reversa. De seguida ocorre a fase de desnaturação, na qual há um aumento da temperatura e se dá a separação da dupla cadeia RNA-cDNA formada anteriormente. Após a separação da dupla cadeia, um segundo *primer* liga-se à sequência de cDNA e ocorre a extensão do primer por ação da rTth DNA polimerase, dando origem ao



DNA de dupla cadeia.<sup>37</sup> O processo de desnaturação, emparelhamento de primers e extensão é repetido ao longo de vários ciclos de PCR, resultando num aumento do número de cópias. Para a amplificação do gene do CI a reação decorre da mesma forma, mas com *primers* específicos para o CI.

Ao longo de cada ciclo da reação as sequências de genes codificantes das proteínas virais e o controlo interno são detetadas através do uso de sondas *TaqMan* específicas marcadas com fluoróforos. As duas sondas específicas dos genes N e RdRP estão marcadas com o mesmo fluoróforo e a sonda específica do controlo interno está marcada com outro fluoróforo, permitindo assim a deteção simultânea de ambos os produtos amplificados. O fluoróforo encontra-se ligado na extremidade 5' da sonda e na extremidade 3' existe um *quencher* que absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo quando a sonda se encontra intacta. Caso a amostra contenha o vírus, ocorre a ligação das sondas às sequências alvo e estas sofrem a ação da DNA polimerase quando se dá a extensão dos *primers*. Desta forma ocorre a fragmentação das sondas e o afastamento entre o fluoróforo e o *quencher*, o que permite a emissão de fluorescência e a deteção do genoma viral.<sup>41</sup> A emissão de fluorescência pela sonda específica do controlo interno, que se comporta exatamente da mesma forma que as sondas específicas dos genes N e RdRP, garante a validação do processo.

## **6.2. Pesquisa de Anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV-2**

Os anticorpos IgM e IgG contra o vírus SARS-CoV-2 são detetados no soro, permitindo desta forma avaliar se o indivíduo já esteve em contacto com o vírus ou, caso tenha existido infeção, o teste permite avaliar se ainda existem anticorpos no soro. A glicoproteína S do vírus é o determinante antigénico responsável por induzir a produção dos anticorpos.<sup>22</sup>

O equipamento utilizado no LACUC para este teste é o VIDAS da *bioMérieux* que utiliza o método de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) com deteção por fluorescência. Este equipamento utiliza barretes que já contém todos os reagentes necessários à reação e nas quais apenas é necessário pipetar a amostra. A identificação da amostra é feita de forma manual inserindo o código identificativo no sistema. Para a pesquisa de cada anticorpo (IgM e IgG) é utilizado um calibrador, um controlo negativo e um controlo positivo que são processados em cada barrete de forma individual tal como acontece com as amostras. Após o processamento da amostra os resultados indicam a presença ou ausência de anticorpos

IgM e IgG e a sua quantificação, sendo que só a partir de um certo valor se considera um resultado positivo.

Para a infeção por SARS-CoV-2 ser considerada uma infeção ativa tem de ser detetada a presença de RNA viral através da técnica qRT-PCR, no entanto o estudo da presença de anticorpos pode fornecer informação adicional ao diagnóstico. Os anticorpos IgM são produzidos numa fase mais precoce da infeção e os anticorpos IgG são produzidos numa fase mais tardia. Isto significa que é importante correlacionar a presença ou ausência de RNA viral com a presença de anticorpos IgM e IgG no soro para avaliar o estado da infeção.

A deteção de RNA viral confirma a existência de infeção ativa, no entanto esta pode ser uma infeção relativamente recente, o que é sugerido pela presença de anticorpos IgM no soro, ou pode ser mais antiga, e neste caso existem anticorpos IgG no soro, que surgem normalmente duas semanas após a infeção.<sup>42</sup> A presença de anticorpos IgG sem a presença de IgM e a deteção de RNA viral poderá ainda sugerir uma reinfeção do indivíduo, no entanto ainda pouco se conhece sobre casos de reinfeção em indivíduos que já tiveram COVID-19.

A ausência do RNA viral pode dever-se a duas situações: ausência de infeção ou uma infeção resolvida. Quando se trata de uma infeção resolvida o indivíduo pode apresentar anticorpos IgG no soro, no entanto não existem evidências de que estes anticorpos confirmam imunidade.<sup>42</sup>

### **6.3. Pesquisa do Antígeno do Vírus SARS-CoV-2**

O kit Panbio<sup>TM</sup> COVID-19 Ag Rapid Test Device é um teste rápido para a deteção qualitativa do antígeno do vírus SARS-CoV-2 em amostras obtidas com zangafalhos nasofaríngeas e é utilizado no LACUC para o rastreio da comunidade da Universidade de Coimbra.

O teste rápido utiliza a técnica de *lateral flow assay* que consiste na migração da amostra ao longo de uma membrana que contém uma linha de teste (T) e uma linha de controlo (C) que não são visíveis antes da aplicação da amostra no dispositivo. A linha T é revestida com anticorpo monoclonal Anti-SARS-CoV-2 e a linha C é revestida por anticorpo monoclonal de murganho Anti-Galinha. Na membrana existem partículas de ouro conjugadas com anticorpo contra o antígeno viral que se ligam ao antígeno caso este esteja presente na amostra, culminando no aparecimento da linha T.<sup>43</sup>

Após a colheita, a zaragatoa é colocada dentro de um tubo que contém tampão de extração para extrair as proteínas virais sem as desnaturar e o teste deve ser realizado nas duas horas seguintes à colheita. Para a realização do teste são dispensadas cinco gotas no dispositivo, no local indicado com a letra S, e de seguida aguarda-se cerca de 15 minutos para a leitura do resultado. Se a amostra tiver o antígeno viral, durante a migração este vai ligar-se ao anticorpo Anti-SARS-CoV-2 presente na linha T e esta torna-se visível na janela de resultados.

Quando se realiza a leitura, o resultado negativo é indicado pela presença apenas da linha correspondente ao controlo, enquanto o resultado positivo é dado pela presença da linha de controlo e da linha de teste, mesmo que esta seja muito ténue. Um resultado negativo não exclui totalmente a infeção por SARS-CoV-2, assim como um resultado positivo não tem valor de diagnóstico definitivo, sendo necessária a confirmação por um método mais sensível como por exemplo a técnica de qRT-PCR.

Este teste rápido de rastreio tem a vantagem de conseguir fornecer resultados rápidos, sendo importante na toma de medidas rápidas para evitar o contágio entre a comunidade.

## **7. Procedimento Pós-analítico**

O procedimento pós-analítico corresponde a todo o processo após a análise das amostras, ou seja, a validação dos resultados e o envio dos mesmos aos utentes ou às entidades competentes.

Na técnica de qRT-PCR são visualizados os gráficos de cada amostra para avaliar a emissão de fluorescência pelas sondas específicas dos genes codificantes das proteínas virais. Numa amostra positiva para a deteção do RNA viral, a verificação do ciclo a partir do qual tem início o processo de amplificação exponencial permite ter uma ideia da carga viral na amostra. Nos gráficos correspondentes ao controlo negativo e ao tubo com água não deve ser detetado RNA viral pois seria indicativo de contaminação. No controlo positivo espera-se a deteção do RNA viral e o controlo interno também deve estar amplificado em todos os tubos (amostras e controlos) para garantir a correta execução do processo. A não amplificação do controlo interno numa amostra implica a repetição do ensaio para essa amostra. Em relação ao controlo positivo e ao controlo negativo, um resultado inválido implica a repetição do ensaio de todas as amostras dessa corrida. Após a visualização de todos os gráficos e confirmação de que não ocorreu nenhuma falha nos controlos, os resultados são emitidos e enviados.

No teste serológico para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG os resultados são validados se não ocorrerem erros ao nível dos calibradores e dos controlos e se estes estiverem de acordo com os resultados esperados. Os resultados são depois entregues ao utente.

No caso do teste rápido para a deteção do antigénio viral, como se trata de um rastreio apenas são contactadas as pessoas cujo resultado do teste é positivo ou inconclusivo pois nestes casos é necessária a repetição do teste pela técnica de qRT-PCR como método de confirmação do diagnóstico.

Os casos de infeção por COVID-19 são depois reportados pelo laboratório às entidades competentes para que possa ser efetuado o acompanhamento médico desses casos.

## **Conclusão**

A realização deste estágio curricular permitiu consolidar e colocar em prática todos os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos dois anos de mestrado, bem como contactar com a rotina de um laboratório clínico.

Além da experiência e dos conhecimentos adquiridos, o estágio permitiu-me perceber como é de extrema importância o controlo de qualidade interno e externo dos aparelhos e das análises efetuadas, de modo a garantir que os resultados emitidos pelo laboratório são fiáveis. A realização deste estágio também me tornou mais consciente da importância das Análises Clínicas no diagnóstico e monitorização de muitas patologias e de como é fundamental o trabalho realizado por toda a equipa de profissionais do laboratório que diariamente colaboram para prestar um serviço de excelência ao utente.

O estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas foi um processo de aprendizagem a nível pessoal e profissional e considero que cumpri todos os objetivos aos quais me propus com a ajuda de todos os profissionais que me acompanharam e sempre me ajudaram a esclarecer todas as dúvidas.



## Bibliografia

1. HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. – **Essential Haematology**. 6<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1-4051-9890-5.
2. BROWN, Michael; WITTEWER, Carl – **Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology**. *Clinical Chemistry*. 46:8 (2000) 1221-1229.
3. BACALL, Nydia S. – **Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos**. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 31:4 (2009) 218-220.
4. BAIN, Barbara J. – **Blood Cells: A Practical Guide**. 5<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2015. ISBN: 978-1-118-81733-9.
5. KARAKOCHUK ERA O 4, Crystal D. *et al.* – **Measurement and interpretation of hemoglobin concentration in clinical and field settings: a narrative review**. *New York Academy of Sciences*. 1450 (2019) 126-146.
6. BRAY, Christopher *et al.* – **Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine**. *State Medical Society of Wisconsin*. 115:6 (2016) 317-321.
7. CERUTTI, Helena *et al.* - **Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement by VES Matic Cube 80 in Relation to Inflammation Plasma Proteins**. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 25:3 (2011) 198-202.
8. YANG, David T.; ROBERTORYE, Ryan S.; RODGERS, George M. - **Home Prothrombin Time Monitoring: A Literature Analysis**. *American Journal of Hematology*. 77 (2004) 177-186.
9. HOOD, Joshua L.; EBY, Charles S. - **Evaluation of a Prolonged Prothrombin Time**. *Clinical Chemistry*. 54:4 (2008) 765-769.
10. FERREIRA, Ângela Melgaço *et al.* – **Imuno-Hematologia Laboratorial**. 1<sup>a</sup> Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. ISBN: 978-85-334-2160-8.
11. DELAFLORE-WEISS, Eduardo; CHIZHEVSKY, Vladislav – **Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience**. *Laboratory Medicine*. 36:8 (2005) 489-492.

12. PARKER, Victoria; TORMEY, Christopher A. – **The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls**. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 141:2 (2017) 305-310.
13. AROSA, Fernando A.; CARDOSO, Elsa M.; PACHECO, Francisco C. – **Fundamentos de Imunologia**. 2ª Ed. Lisboa: LIDEL, 2012. ISBN: 978-972-757-856-6.
14. OWEN, Judith A.; PUNT, Jenni; STRANFORD, Sharon A. – **Kuby Immunology**. 7ª Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013. ISBN: 978-14641-3784-6.
15. WILD, David (ED.) - **The Immunoassay Handbook - Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques**. 4ª Ed. Elsevier Science, 2013. ISBN: 978-0-08-097037-0.
16. FRANÇA. World Health Organization - **Laboratory Quality Management System: Handbook**. Lyon: WHO, 2011. ISBN: 978-92-4-154827-4.
17. MAGRO, Ana Maria; BENTO, Rui San - **Marcadores tumorais**. Medicina Interna. 4:3 (1997) 189–196.
18. BURTIS, Carl A.; BRUNS, David E. - **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 7ª Ed. Saunders Elsevier, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6.
19. PERKINS, Greg L. *et al.* - **Serum Tumor Markers**. American Family Physician. 68:6 (2003) 1075-1082.
20. BALLEHANINNA, Umashankar K.; CHAMBERLAIN, Ronald S. - **The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal**. Journal of Gastrointestinal Oncology. 3:2 (2012) 105-119. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.
21. ITO, Kazuto *et al.* - **Free/total PSA ratio is a powerful predictor of future prostate cancer morbidity in men with initial PSA levels of 4.1 to 10.0 ng/mL**. Urology. 61:4 (2003) 760–764. doi: 10.1016/S0090-4295(02)02427-5.
22. BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno – **Microbiologia Médica: Volume 2**. Lisboa: LIDEL, 2014. ISBN: 978-972-757-576-3.
23. MARTINS, Carlos - **Toxoplasmose na gravidez**. Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar. 18 (2002) 333-340.



24. PORTUGAL. Direção Geral da Saúde – **Saúde Reprodutiva: Doenças Infecciosas e Gravidez**. Lisboa: DGS, 2000. ISBN: 972-9425-84-1.
25. PORTUGAL. Direção Geral da Saúde – **Rastreio e diagnóstico da SIDA**. Lisboa: DGS, 2019.
26. KOCZULA, Katarzyna M.; GALLOTTA, Andrea - **Lateral flow assays**. *Essays in Biochemistry*. 60 (2016) 111–120. doi: 10.1042/EBC20150012.
27. BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno – **Microbiologia Médica: Volume I**. Lisboa: LIDEL, 2014. ISBN: 978-989-752-057-0.
28. COX, Andrew L.; TADI, Prasanna – **Weil Felix Test**. Florida: StatPearls, 2020. [Acedido a 9 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559225/>
29. ANDUALEM, Gizachew *et al.* – **A comparative study of Widal test with blood culture in the diagnosis of typhoid fever in febrile patients**. *BMC Research Notes*. 7:653 (2014). doi: 10.1186/1756-0500-7-653.
30. PESSEGUEIRO, Pedro; BARATA, Conceição; CORREIA, José – **Brucelose – uma revisão sistematizada**. *Medicina Interna*. 10:2 (2003) 91–100.
31. CORBEL, M.J. – **Brucellosis in humans and animals**. [S.l.], World Health Organization, 2006. ISBN: 978-92-4-154713-0.
32. LUM, Breanna; SERGENT, Shane R. – **Rapid Plasma Reagin (RPR)**. Florida: StatPearls, 2020. [Acedido a 14 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557732/>
33. GUO, Yan-Rong *et al.* – **The origin transmission and Clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status**. *Military Medical Research*. 7:11 (2020). doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
34. TORTORICI, M. Alejandra; VEESLER, David – **Structural insights into coronavirus entry**. *Advances in virus research*. 105 (2019) 93-116.
35. NAQVI, Ahmad Abu Turab *et al.* - **Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach**. *BBA - Molecular Basis of Disease*. 1866:165878. (2020). doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.

36. ROTHAN, Hussin A.; BYRAREDDY, Siddappa N. – **The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak.** *Journal of Autoimmunity*. 109:102433 (2020). doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433.
37. SHEN, Minzhe *et al.* - **Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus.** *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 10 (2020) 97-101. doi: 10.1016/j.jpha.2020.02.010.
38. CONCEIÇÃO, Cláudia *et al.* – **COVID-19: diagnóstico molecular de infeção por SARS-CoV-2.** Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, 2020. [Acedido a 20 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ihmt.unl.pt/covid-19-diagnostico-molecular-de-infecao-por-sars-cov-2/>
39. TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin – **DNA, RNA and Protein Extraction: The Past and The Present.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. doi: 10.1155/2009/574398.
40. SCHWAB, KELLOGG J. *et al.* – **Development of a Reverse Transcription-PCR–DNA Enzyme Immunoassay for Detection of “Norwalk-Like” Viruses and Hepatitis A Virus in Stool and Shellfish.** *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2 (2001) 742-749. doi: 10.1128/AEM.67.2.742–749.2001.
41. **CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel.** Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2020.
42. PORTUGAL. Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes – **Painel Serológico Nacional COVID-19.** Lisboa: iMM, 2020.
43. SCOHY, Anaïs *et al.* - **Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis.** *Journal of Clinical Virology*. 129:104455 (2020). doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455.