

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



O PLANO DE VACINAÇÃO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR HPV E O IMPACTO NA SOCIEDADE PORTUGUESA EM PERÍODO DE PANDEMIA CAUSADA POR SARS-COV-2

Carla Sofia Oliveira Narciso

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Quirina dos Santos Costa e
Coorientado pela Doutora Manuela Azevedo

Mestrado em Análises Clínicas

2025

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**O PLANO DE VACINAÇÃO E TRATAMENTO DA INFEÇÃO POR HPV E O
IMPACTO NA SOCIEDADE PORTUGUESA EM PERÍODO DE PANDEMIA
CAUSADA POR SARS-COV-2**

Carla Sofia Oliveira Narciso

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora Quirina dos Santos Costa e
Coorientado pela Doutora Manuela Azevedo

Mestrado em Análises Clínicas

2025

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte do meu percurso profissional e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho final.

Agradeço a todos os docentes e convidados pelos conhecimentos ministrados no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas.

Em especial, quero expressar o meu sincero agradecimento à Prof. Doutora Quirina dos Santos Costa, pelo seu apoio e disponibilidade na orientação da realização do relatório de estágio e da monografia.

Expresso a minha gratidão a toda a equipa do Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Lisboa por todos os conhecimentos transmitidos essenciais para a minha formação profissional e para a elaboração do presente trabalho. À minha orientadora de estágio, a Dr.^a Manuela Azevedo, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade. À Dr.^a Lurdes Monteiro por me receber nas instalações, por orientar o meu plano de estágio e pela disponibilidade. A todos os profissionais das diversas áreas laboratoriais pela paciência, disponibilidade, simpatia, boa disposição e amizade.

Um agradecimento enorme aos meus colegas e amigos, Carolina Tasca e Luís Lopes, pela amizade e partilha de experiências, pelo apoio e por acreditarem em mim. À minha amiga Inês Gabriel por toda ajuda, apoio e força transmitidos.

Um grande obrigado a toda a minha família, em especial, à minha irmã Sara e aos meus tios Maria e João, por todo o apoio transmitido.

Por último, agradeço verdadeiramente aos meus pais, por todo o esforço que sempre fizeram para que fosse possível concluir a minha formação académica, por todos os valores transmitidos e pelo amor e apoio incondicionais.

A todos, um enorme Obrigado!

Declaração

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Este trabalho foi elaborado de acordo com o disposto no Artigo 40º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, nº 999/2021, DR, 2.a série – Nº 236, de 7 de dezembro de 2021.

Resumo

O presente relatório descreve o estágio laboratorial integrado no plano curricular do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, decorrido no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Lisboa. Os principais objetivos da sua realização foram a consolidação e aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo da formação académica e a aquisição de experiência profissional. O relatório apresenta um resumo das atividades desenvolvidas nas valências laboratoriais da Fase Pré-Analítica, Química Clínica, Imunologia e Patologia Molecular, abordando as diversas metodologias associadas a cada área laboratorial, bem como os principais parâmetros analíticos e respetivo significado clínico. São também abordadas as temáticas de Higiene, Saúde e Segurança e de Controlo de Qualidade.

O presente documento apresenta uma monografia intitulada “*O Plano de Vacinação e Tratamento da Infecção por HPV e o Impacto na Sociedade Portuguesa em Período de Pandemia causada por SARS-CoV-2*”. A infecção pelo Vírus do Papiloma Humano é uma das infeções sexualmente transmitidas mais comuns, sendo considerada um problema de saúde pública. Esta infecção está também associada ao desenvolvimento de cancro de colo do útero, sendo que a vacinação constitui um modo de prevenção crucial. O surgimento da pandemia originou uma sobrecarga do sistema de saúde e também foram implementadas medidas de isolamento social, influenciando os serviços prestados, como, os programas de vacinação. Neste âmbito, o estudo corresponde a uma revisão bibliográfica sobre o possível impacto que a pandemia causada por SARS-CoV-2 teve na vacinação do HPV em Portugal.

Palavras-chave: Análises Clínicas, HPV, SARS-Cov-2, Vacinação, Pandemia.

Abstract

This report details the laboratory internship integrated into the curriculum of the Master's program in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, conducted at the SYNLAB Lisbon Clinical Analysis Laboratory. The primary objectives of this internship were to consolidate and apply the theoretical knowledge acquired throughout the academic training and to develop professional experience. The report summarizes the activities carried out in the laboratory phases of Pre-Analytical, Clinical Chemistry, Immunology, and Molecular Pathology, addressing the various methodologies associated with each laboratory domain, as well as the key analytical parameters and their clinical significance. Additionally, topics related to Hygiene, Health and Safety, and Quality Control are discussed.

This document also presents a monograph titled “The Vaccination Plan and Treatment of HPV Infection and Its Impact on Portuguese Society During the SARS-CoV-2 Pandemic.” Infection with the Human Papillomavirus is one of the most prevalent sexually transmitted infections and is regarded as a public health concern. This infection is also linked to the development of cervical cancer, making vaccination a crucial preventive measure. The onset of the pandemic has placed an overwhelming burden on the healthcare system and has led to the implementation of social isolation measures, which have influenced the delivery of services, including vaccination programs. In this context, the study serves as a literature review exploring the potential impact of the SARS-CoV-2 pandemic on HPV vaccination in Portugal.

Keywords: Clinical Trials, HPV, SARS-CoV-2, Vaccination, Pandemic.

Índice Geral

| | |
|---|-----|
| Agradecimentos..... | iii |
| Declaração..... | iv |
| Resumo..... | v |
| Abstract..... | vi |
| Índice Geral..... | vii |
| Índice de Figuras..... | x |
| Índice de Tabelas..... | xi |
| Lista de Siglas de Abreviaturas..... | xii |
| Parte I: Relatório de Estágio..... | 1 |
| 1. Introdução..... | 2 |
| 2. O Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB..... | 3 |
| 3. Higiene, Saúde e Segurança..... | 4 |
| 4. Fase Pré-Analítica..... | 6 |
| 4.1. Colheita de Amostras..... | 6 |
| 4.2. Triagem de Amostras..... | 7 |
| 5. Fase Analítica..... | 8 |
| 5.1. Química Clínica..... | 9 |
| 5.1.1. Química Clínica e Imunoensaios..... | 9 |
| A. Equilíbrio Hidroeletrólítico..... | 11 |
| B. Metabolismo de Proteínas..... | 11 |
| C. Metabolismo dos Glúcidos..... | 12 |
| D. Metabolismo dos Lípidos..... | 15 |
| F. Avaliação da Função Renal..... | 17 |
| G. Avaliação da Função Hepática..... | 18 |
| H. Avaliação da Função Tiroideia..... | 21 |
| I. Avaliação da Função Cardíaca..... | 22 |
| J. Endocrinologia Reprodutiva..... | 24 |
| K. Marcadores tumorais..... | 26 |
| 5.1.3. Análise Sumária da Urina..... | 28 |
| A. Exame Físico..... | 29 |
| B. Exame Químico..... | 29 |
| C. Exame Microscópico do Sedimento Urinário..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 5.2. Imunologia | 33 |
| 5.2.1. ELISA..... | 33 |
| 5.2.2. Eletroforese de Proteínas..... | 34 |
| 5.2.3. Imunofixação..... | 36 |
| A. Imunofixação Sérica..... | 37 |
| B. Imunofixação urinária..... | 38 |
| 5.3. Patologia Molecular | 39 |
| 5.3.1. COVID-19..... | 39 |
| A. Princípio da Polymerase Chain Reaction (PCR) e Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)..... | 39 |
| B. Triagem de Amostras | 40 |
| C. Inativação de Amostras..... | 41 |
| D. Processamento de amostras | 41 |
| E. Interpretação dos resultados..... | 42 |
| 6. Fase Pós-Analítica..... | 44 |
| 7. Controlo de Qualidade | 45 |
| 7.1. Controlo de Qualidade Interno | 45 |
| 7.2. Avaliação Externa da Qualidade..... | 45 |
| 8. Conclusão | 46 |
| Parte II: Monografia | 47 |
| Materiais e Métodos | 48 |
| 1. Introdução..... | 49 |
| 2. Infeção por HPV..... | 50 |
| 2.1. Estrutura da partícula viral | 50 |
| 2.2. Dados epidemiológicos | 51 |
| 2.3. Ciclo replicativo | 53 |
| 2.4. Patogénese da infeção | 54 |
| 2.5. Diagnóstico..... | 56 |
| 2.6. Prevenção | 56 |
| 2.7. Plano de vacinação | 57 |
| 2.8. Tratamento..... | 57 |
| 3. Infeção por SARS-CoV-2..... | 58 |
| 3.1. Estrutura da partícula viral | 58 |
| 3.2. Dados epidemiológicos | 59 |
| 3.3. Ciclo replicativo | 60 |

| | |
|---|----|
| 3.4. Patogénese da infeção | 62 |
| 3.5. Diagnóstico..... | 62 |
| 3.6. Prevenção | 62 |
| 3.7. Plano de vacinação | 63 |
| 4. Impacto da pandemia COVID-19 na vacinação do HPV a nível Mundial | 65 |
| 5. Impacto da pandemia COVID-19 na vacinação do HPV em Portugal | 66 |
| 6. Conclusão | 67 |
| Referências Bibliográficas | 68 |

Índice de Figuras

Parte I

Relatório de Estágio

| | |
|--|----|
| Figura 1. Equipamento de triagem automática AutoMate™ 2550, da Beckman Coulter..... | 7 |
| Figura 2: Equipamento Atellica™ Solution, da Siemens Healthineers..... | 9 |
| Figura 3: Representação gráfica do padrão de libertação de alguns biomarcadores, após enfarte agudo do miocárdio..... | 23 |
| Figura 4: Equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System, da Siemens Healthineers..... | 28 |
| Figura 5: Equipamento EUROIMMUN Analyzer I-2P..... | 34 |
| Figura 6: Equipamento HYDRASYS 2 Scan Focusing, da Sebia..... | 35 |
| Figura 7: Representação de um perfil normal de eletroforese de proteínas no soro..... | 35 |
| Figura 8: Equipamento HYDRASYS, da Sebia..... | 36 |
| Figura 9: Exemplos de imunofixação sérica em gel de agarose..... | 37 |
| Figura 10. Equipamento Alinity m, da Abbott..... | 41 |
| Figura 11: Gráfico de amplificação do método RT-PCR em tempo real..... | 42 |

Parte II

O Plano de Vacinação e Tratamento da Infecção por HPV e o Impacto na Sociedade Portuguesa em Período de Pandemia causada por SARS-CoV-2

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV..... | 50 |
| Figura 2: Comparação entre a taxa de incidência do cancro do colo do útero com outros cancros em mulheres de todas as idades em Portugal..... | 52 |
| Figura 3: Comparação entre a taxa de incidência do cancro do colo do útero com outros cancros em mulheres, com idades compreendidas entre 15 e 44 anos, em Portugal..... | 52 |
| Figura 4: Ligação do HPV às células das camadas basais do epitélio..... | 53 |
| Figura 5: Esquema do ciclo replicativo do HPV..... | 54 |
| Figura 6: Etapas da progressão da infeção natural por HPV para cancro invasivo..... | 55 |
| Figura 7: Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2..... | 59 |
| Figura 8: Principais eventos ocorridos no período de pandemia causada por SARS-CoV-2..... | 60 |
| Figura 9: Representação esquemática do ciclo replicativo do SARS-CoV-2..... | 61 |

Índice de Tabelas

Parte I

Relatório de Estágio

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Plano de Estágio. | 2 |
| Tabela 2a: Classificação de resíduos hospitalares e respetivas especificações. | 4 |
| Tabela 2b: Classificação de resíduos hospitalares e respetivas especificações. | 5 |
| Tabela 3: Valores de referência relativos aos iões sódio, potássio e cloro, no soro e urina. ... | 11 |
| Tabela 4: Valores de Referência relativos às proteínas totais no soro/plasma. | 12 |
| Tabela 5: Valores de Referência relativos à albumina no soro/plasma. | 12 |
| Tabela 6: Valores de Referência relativos à glucose no soro/plasma. | 14 |
| Tabela 7: Valores de Referência relativos à insulina no soro. | 14 |
| Tabela 8: Valores de Referência relativos ao péptido C no soro. | 14 |
| Tabela 9: Valores de Referência relativos ao colesterol total no soro/plasma. | 15 |
| Tabela 10: Valores de referência relativos aos triglicéridos no soro/plasma. | 16 |
| Tabela 11: Valores de referência relativos ao colesterol das LDL no soro/plasma. | 17 |
| Tabela 12: Valores de referência relativos ao colesterol das HDL no soro/plasma. | 17 |
| Tabela 13: Valores de referência relativos à creatinina, no soro e urina. | 18 |
| Tabela 14: Valores de referência relativos à ureia no soro/plasma. | 18 |
| Tabela 15: Valores de referência da bilirrubina total e da bilirrubina conjugada, no soro/plasma. | 19 |
| Tabela 16: Valores de referência relativos à AST e ALT no soro/plasma. | 20 |
| Tabela 17: Valores de referência relativos à ALP no soro/plasma. | 20 |
| Tabela 18: Valores de referência relativos à GGT no soro/plasma. | 21 |
| Tabela 19: Valores de referência relativos à TSH no soro/plasma. | 22 |
| Tabela 20: Valores de referência relativos à FT4 e FT3 no soro/plasma. | 22 |
| Tabela 21: Valores de referência relativos aos biomarcadores de enfarte agudo do miocárdio no soro/plasma. | 24 |
| Tabela 22: Valores de referência relativos ao NT-proBNP no soro/plasma. | 24 |
| Tabela 23: Valores de referência relativos à LH e FSH no soro. | 25 |
| Tabela 24: Valores de referência relativos à Progesterona no soro. | 25 |
| Tabela 25: Valores de referência relativos à Testosterona no soro/plasma. | 26 |
| Tabela 26: Valores de referência relativos à hCG no soro. | 26 |
| Tabela 27: Valores de referência relativos ao PSA total no soro. | 27 |
| Tabela 28: Valores de referência relativos ao CEA no soro. | 27 |
| Tabela 29: Causas mais frequentes da coloração anormal da urina. | 29 |
| Tabela 30: Principais proteínas de cada uma das frações eletroforéticas e respetivos valores de referência. | 36 |

Parte II

O Plano de Vacinação e Tratamento da Infecção por HPV e o Impacto na Sociedade Portuguesa em Período de Pandemia causada por SARS-CoV-2

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Taxa de incidência bruta por 100.00 habitantes e por ano, em Portugal. | 51 |
| Tabela 2: Vacinas contra a COVID-19 aprovadas e administradas em Portugal. | 63 |

Lista de Siglas de Abreviaturas

Parte I

Relatório de Estágio

| | |
|------------------------|--|
| AEQ | Avaliação Externa da Qualidade |
| ALP | Fosfatase Alcalina, do inglês <i>Alkaline Phosphatase</i> |
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| AST | Aspartato Aminotransferase |
| ATP | Trifosfato de Adenosina, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i> |
| BCG | Solução Verde de Bromocresol, do inglês <i>Bromocresol Green</i> |
| BJP | Proteína de Bence Jones, do inglês <i>Bence Jones Protein</i> |
| BNP | Péptido Natriurético Cerebral, do inglês <i>Brain Natriuretic Peptide</i> |
| BSL2 | Biossegurança de Nível 2, do inglês <i>Biosafety Level 2</i> |
| cDNA | DNA complementar |
| CEA | Antigénio Carcino-Embrionário, do inglês <i>Carcinoembryonic Antigen</i> |
| CK-MB | Isoenzima MB da Creatinina Cinase, do inglês <i>Creatine Kinase Isoenzyme MB</i> |
| CQI | Controlo de Qualidade Interno |
| COVID-19 | Doença por coronavírus 2019, do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| CT | Do inglês, <i>Cycle Threshold</i> |
| cTnI | Troponina I Cardíaca, do inglês <i>Cardiac Troponin I</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| dNTPs | Trifosfatos de Desoxirribonucleótidos, do inglês <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> |
| EAM | Enfarte Agudo do Miocárdio |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FSH | Hormona Folículo-Estimulante, do inglês <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> |
| FT₃ | T ₃ livre, do inglês <i>Free T₃</i> |
| FT₄ | T ₄ livre, do inglês <i>Free T₄</i> |
| GGT | Gama-Glutamil Transferase |
| hCG | Gonadotrofina Coriónica Humana, do inglês <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> |
| HCV | Vírus da Hepatite C |
| HDL | Lipoproteínas de Alta Densidade, do inglês <i>High-Density Lipoprotein</i> |
| HPV | Vírus do Papiloma Humano |
| HSV | Vírus Herpes Simplex |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| LDL | Lipoproteínas de Baixa Densidade, do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i> |
| LH | Hormona Luteinizante, do inglês <i>Luteinizing Hormone</i> |
| NAD⁺ | Dinucleótido de Adenina Nicotinamida Oxidado |
| NADH | Dinucleótido de Adenina Nicotinamida Reduzido |
| NT-proBNP | N-Terminal do pró-Péptido Natriurético Cerebral, do inglês <i>N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> |

| | |
|----------------------|---|
| PSA | Antigénio Específico da Próstata, do inglês <i>Prostate Specific Antigen</i> |
| PTGO | Prova de Tolerância Oral à Glucose |
| RFU | Unidade Relativa de Fluorescência, do inglês, do inglês <i>Relative Fluorescence Units</i> |
| RNA | Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> |
| rpm | Rotações por Minuto |
| RT-PCR | Do inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| SARS-COV-2 | Síndrome Respiratória Aguda pelo Coronavírus Tipo 2, do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| SGQ | Sistema de Gestão da Qualidade |
| T₃ | Triiodotironina |
| T₄ | Tiroxina |
| TSH | Hormona Estimulante da Tireoide, do inglês <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> |
| VLDL | Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade, do inglês <i>Very-Low-Density Lipoprotein</i> |

Parte II

O Plano de Vacinação e Tratamento da Infecção por HPV e o Impacto na Sociedade Portuguesa em Período de Pandemia causada por SARS-CoV-2

| | |
|-----------------|---|
| ACE2 | Enzima Convertora da Angiotensina 2, do inglês <i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i> |
| Ad26 | Adenovírus tipo 26 |
| COVID-19 | Doença por coronavírus 2019, do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| CIN | Neoplasia Intraepitelial Cervical, do inglês |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| ECDC | Do inglês, <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> |
| HSPGs | Proteoglicanos de Sulfato de Heparano, do inglês <i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i> |
| HPV | Vírus do Papiloma Humano |
| IARC | Do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| LCR | Do inglês, <i>Long Control Region</i> |
| mRNA | RNA mensageiro |
| ORFs | Do inglês, <i>Open Read Frames</i> |
| PML | Do inglês, <i>Promyelocytic Leukaemia</i> |
| PNV | Plano Nacional de Vacinação |
| pRb | Proteína do Retinoblastoma |
| RBD | Do inglês, <i>Receptor Binding Domain</i> |
| RdRp | RNA polimerase RNA-dependente |
| RNA | Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RTC | Complexo de Replicação e Transcrição |

| | |
|-------------------|---|
| SARS-COV-2 | Síndrome Respiratória Aguda pelo Coronavírus Tipo 2, do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| TMPRSS2 | Do inglês, <i>Transmembrane Protease Serine 2</i> |
| URR | Do inglês, <i>Upstream Regulatory Region</i> |
| UNICEF | Do inglês, <i>United Nations International Children's Emergency Fund</i> |
| VLPs | Partículas tipo-vírus, do inglês <i>Virus-like Particles</i> |

Parte I: Relatório de Estágio

1. Introdução

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, foi realizado o estágio profissional integrado no plano de estudos do Curso, de modo a complementar a aprendizagem nas diferentes áreas científicas das Análises Clínicas. Os principais objetivos passam por promover a integração no meio profissional e o contacto com outros profissionais da área; a consolidação dos conhecimentos adquiridos em contexto de trabalho; e o desenvolvimento da capacidade de trabalho multidisciplinar e em equipa.

O estágio decorreu no Laboratório de Análises Clínicas - SYNLAB HEALTH II, sob a orientação da Dr^a Manuela Azevedo, Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, abrangendo as valências de Microbiologia, Patologia Molecular, Fase Pré-Analítica, Química Clínica e Imunologia. A duração do estágio foi de 785 horas, com início a 15 de fevereiro de 2021 e fim a 3 de setembro de 2021, estando o plano de estágio descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Plano de Estágio.

| Valência | Data | Nº de horas |
|----------------------------|-------------------------|--------------------|
| Microbiologia | 15/02/2021 – 26/03/2021 | 225 |
| Patologia Molecular | 29/03/2021 – 07/05/2021 | 110 |
| Fase Pré-Analítica | 10/05/2021 – 21/05/2021 | 110 |
| Química Clínica | 24/05/2021 – 16/07/2021 | 265 |
| Imunologia | 26/07/2021 – 03/09/2021 | 185 |

O presente relatório começa por apresentar o laboratório de Análises Clínicas SYNLAB, desenvolvendo de seguida os principais conceitos associados a cada uma das valências laboratoriais: a Fase Pré-Analítica, salientando a importância de aspetos do processo de colheita das amostras biológicas e abordando o processo de triagem; as várias áreas analíticas, descrevendo as principais metodologias, procedimentos e parâmetros analíticos dos setores de Química Clínica, Imunologia e Patologia Molecular; e a Fase Pós-analítica. Por fim, será abordado o Controlo de Qualidade.

A elaboração deste documento baseou-se nas referências bibliográficas indicadas, nos procedimentos desenvolvidos no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Lisboa e nos folhetos informativos das metodologias e manuais operativos, todos eles referentes ao período em que decorreu o estágio laboratorial.

2. O Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB

A SYNLAB surgiu em 2015 com a junção das marcas Synlab e Labco e está presente em mais de 40 países. É líder em serviços de diagnóstico médico na Europa, oferecendo uma gama completa de serviços de Medicina Laboratorial a utentes, profissionais de saúde, clínicas e indústria farmacêutica, com o intuito de providenciar um diagnóstico rápido, eficiente, preciso e de alta qualidade. O principal objetivo da SYNLAB é fornecer uma base sólida e fiável de resultados laboratoriais para dar apoio ao médico clínico na tomada de decisões a nível de diagnóstico e terapêuticas, apresentando processos e metodologias analíticas que cumprem altos níveis de qualidade. A SYNLAB apresenta uma gama completa de serviços de laboratório médico nas áreas da Química Clínica, Hematologia, Coagulação, Microbiologia, Imunologia, Genética, Patologia Molecular e Anatomia Patológica (1).

A Política de Qualidade do Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Lisboa é sustentada pelas Normas NP EN ISO 9001:2015, NP EN ISO 15189:2014, Manual de Boas Práticas Laboratoriais, e por todos os requisitos legais e regulamentação aplicável (2). O Manual de Boas Práticas Laboratoriais constituiu um instrumento para a implementação de um sistema de qualidade dirigido por todos os colaboradores, independentemente da sua qualificação, função ou vínculo contratual. A qualidade deve ser uma preocupação constante de todos os colaboradores do laboratório, pelo que, o desenvolvimento de um sistema da qualidade é fundamental para uma atividade adequada e para o correto exercício profissional nos laboratórios (3).

Neste contexto, o Sistema de Gestão da Qualidade implementado no Laboratório de Análises Clínicas SYNLAB Lisboa contempla a integração de todos os processos necessários para o cumprimento da política e objetivos de qualidade, de modo a satisfazer as necessidades e requisitos dos seus utilizadores (2).

3. Higiene, Saúde e Segurança

De acordo com a Lei n.º102/2009 de 10 de setembro, em vigor durante o período de estágio, o trabalhador tem direito à prestação de trabalho em condições que garantam a sua segurança e saúde, asseguradas pela entidade empregadora ou pela pessoa, individual ou coletiva, que detenha a gestão das instalações em que a atividade é desenvolvida (4).

A Portaria n.º 166/2014 de 21 de agosto refere que os laboratórios de patologia clínica/análises clínicas devem ter um Manual de Higiene e Segurança e garantir a formação de todos os seus colaboradores nesta área (5). O Manual de Higiene e Segurança tem como objetivos identificar os riscos associados do Laboratório e definir as medidas preventivas e os procedimentos a adotar em caso de incidente (6).

Os resíduos hospitalares são os resíduos provenientes da prestação de cuidados de saúde a seres humanos ou animais, nas áreas médicas de prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação, ou investigação e ensino, bem como de outras atividades envolvendo procedimentos invasivos (7). A gestão destes resíduos é de grande importância e envolve um conjunto de procedimentos de triagem, transporte, acondicionamento, tratamento, valorização e eliminação de modo a não constituírem perigo para a saúde humana ou para o ambiente. Para isso, é necessário identificar e separar todos os tipos de resíduos; minimizar a produção de resíduos; implementar procedimentos de triagem e transporte; e providenciar o manuseamento e recolha de resíduos apenas por uma entidade credenciada. Na SYNLAB, a recolha dos resíduos hospitalares é assegurada pela empresa Ambimed (6). Os resíduos em questão são classificados em quatro grupos, segundo o Despacho n.º 242/96 de 13 de agosto, sendo explicados na Tabela 2 (8).

Tabela 2a: Classificação de resíduos hospitalares e respetivas especificações. [adaptado de 6]

| | |
|------------------------------|---|
| Resíduos Não Perigosos | Grupo I – Resíduos Equiparados a Urbanos |
| | Não apresentam exigências especiais de tratamento: - Resíduos provenientes de serviços gerais (como de gabinetes, salas de reunião, salas de convívio, instalações sanitárias, vestiários, etc.); - Resíduos provenientes de serviços de apoio (como oficinas, jardins, armazéns e outros); - Embalagens e invólucros comuns (como papel, cartão, mangas mistas e outros de natureza idêntica); - Resíduos provenientes da hotelaria resultantes da confeção e restos de alimentos servidos a doentes não incluídos no Grupo III. |
| | Grupo II – Resíduos Hospitalares Não Perigosos |
| | Não estão sujeitos a tratamentos específicos, podendo ser equiparados a urbanos: - Material ortopédico (talas, gessos e ligaduras gessadas não contaminados e sem vestígios de sangue); - Fraldas e resguardos descartáveis não contaminados e sem vestígios de sangue; - Material de proteção individual utilizado nos serviços gerais e de apoio, com exceção do utilizado na recolha de resíduos; - Embalagens vazias de medicamentos ou de outros produtos de uso clínico e ou comum, com exceção dos incluídos nos Grupos III e IV; - Frascos de soros não contaminados, com exceção dos de Grupo IV. |

Tabela 2b: Classificação de resíduos hospitalares e respetivas especificações [adaptado de 6]

| | |
|--------------------|---|
| Resíduos Perigosos | Grupo III – Resíduos Hospitalares de Risco Biológico |
| | Resíduos contaminados ou suspeitos de contaminação, suscetíveis de incineração ou de outro pré-tratamento eficaz, permitindo posterior eliminação como resíduo urbano: <ul style="list-style-type: none"> - Todos os resíduos provenientes de quartos ou enfermarias de doentes infecciosos ou suspeitos, de unidades de hemodiálises, de blocos operatórios, de salas de tratamento, de salas de autópsia e de anatomia patológica, de patologia clínica e de laboratórios de investigação, com exceção dos do Grupo IV; - Todo o material utilizado em diálise; - Peças anatómicas não identificáveis; - Resíduos que resultam da administração de sangue e derivados; - Sistemas utilizados na administração de soros e medicamentos, com exceção dos do Grupo IV; - Sacos coletores de fluídos orgânico e respetivos sistemas; - Material ortopédico (talas, gessos e ligaduras gessadas contaminados ou com vestígios de sangue) e material de prótese retirado a doentes; - Fraldas e resguardos descartáveis contaminados ou com vestígios de sangue; - Material de proteção individual utilizado em cuidados de saúde e serviços de apoio geral em que haja contacto com produtos contaminados (como luvas, máscaras, aventais e outros). |
| | Grupo IV – Resíduos Hospitalares Específicos |
| | Resíduos de vários tipos de incineração obrigatória: <ul style="list-style-type: none"> - Peças anatómicas identificáveis, fetos e placentas; - Cadáveres de animais de experiência laboratorial; - Materiais cortantes e perfurantes: agulhas, cateteres e todo o material invasivo; - Produtos químicos e fármacos rejeitados; - Citostáticos e todo o material utilizado na sua manipulação e administração. |

A triagem e o acondicionamento correto de resíduos sólidos devem ser executadas junto das zonas de produção, identificando de forma clara e inequívoca a origem e grupo. Os resíduos pertencentes aos grupos I e II são embalados em sacos de plástico pretos ou em sacos de reciclagem, e eliminados no final do dia para o lixo urbano. Os resíduos do grupo III devem ser colocados em sacos de cor branca e, posteriormente, colocados em contentores de cor verde, com indicativo de risco biológico. Por fim, os resíduos do grupo IV, nomeadamente cortopercutantes, devem ser imediatamente depositados em contentores amarelos para perfurantes e, posteriormente, em contentores de cor vermelha (6).

Os resíduos líquidos perigosos, isto é, todos os líquidos que apresentem, pelo menos, uma característica de perigosidade para a saúde ou para o meio ambiente devem ser acondicionados em jerricans devidamente identificados quanto ao seu conteúdo e origem dos resíduos(6).

4. Fase Pré-Analítica

O laboratório de Análises Clínicas apresenta um papel fundamental na prevenção, diagnóstico diferencial, tratamento e monitorização de doenças, pelo que é crucial obter resultados precisos. O processo laboratorial é dividido em 3 fases: fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (9).

A fase pré-analítica envolve todas as etapas que decorrem entre a requisição de exames laboratoriais e a preparação da amostra para análise, incluindo a preparação do utente, a obtenção de informações pertinentes, a colheita da amostra, o armazenamento e transporte, e a receção das amostras biológicas (9,10). Esta fase inclui uma série de procedimentos que ocorrem em locais e momentos diferentes, pelo que, os erros pré-analíticos são responsáveis por até 70% de todos os erros laboratoriais. Assim, de modo a minimizar a frequência destes erros, é importante que o laboratório estabeleça indicadores de qualidade para fazer uma monitorização e avaliação do desempenho dos aspetos críticos dos processos pré-analíticos (11,12).

4.1. Colheita de Amostras

O Laboratório Central SYNLAB Lisboa recebe amostras biológicas provenientes dos vários postos de colheitas do grupo SYNLAB, de diversos hospitais privados e, também, da Fundação Champalimaud.

A Portaria n.º 166/2014 estabelece os requisitos mínimos relativos à organização, funcionamento e instalações técnicas dos laboratórios de análises clínicas. No que diz respeito à fase pré-analítica, os laboratórios devem ter um regulamento interno, que deve integrar os procedimentos de colheitas, receção e aceitação de amostras bem como as respetivas condições de transporte, acondicionamento e armazenamento (5). Na SYNLAB, todas essas informações podem ser encontradas no Manual de Colheitas, que está disponível para todos os colaboradores, de modo a assegurar corretamente os pedidos de ensaios constantes numa requisição (10).

Antes do processo de colheita das amostras biológicas, o profissional de saúde deve confirmar a identificação positiva do utente, através de duas questões, como o nome completo, a data de nascimento ou outro dado que permita identificar inequivocamente o utente. Além disso, deve ser inquirido ao utente informações relevantes para o processo, tais como, o motivo da realização da colheita, tempo de jejum, prática de atividade física, dieta, uso de medicamentos ou produtos naturais, tabagismo, ingestão de álcool, entre outros. Todas estas informações são importantes para aquando da interpretação e validação biopatológica dos resultados (10).

Posteriormente, o técnico deve escolher o material adequado para a colheita e rotular todos os tubos e/ou recipientes antes da colheita e na presença do utente. No Laboratório SYNLAB, utilizam-se códigos de barras para esta identificação e, assim, as amostras são rastreáveis de modo inequívoco. Relativamente aos produtos biológicos colhidos pela próprio utente, aquando da entrega destes, estes devem ser verificados (10).

4.2. Triagem de Amostras

A secção de triagem apresenta como principais funções a receção e entrada das amostras biológicas e o respetivo registo no sistema informativo, por forma a desencadear o processo analítico; a subdivisão das amostras em alíquotas, sempre que necessário; o encaminhamento das amostras e alíquotas para as secções respetivas; e o arquivo e armazenamento de amostras (13).

No laboratório SYNLAB Lisboa, o processo de triagem inicia-se com a abertura das malas térmicas de transporte, seguida da medição e registo da temperatura através de um termómetro a laser. Após a receção, as amostras são verificadas aplicando os critérios de aceitação ou rejeição de amostras definidos pelo laboratório. As amostras podem ser rejeitadas caso apresentem uma ou mais das seguintes características: amostras não identificadas ou identificadas erradamente; colheita efetuada com o tipo de anticoagulante incorreto; amostras colhidas desrespeitando a proporção adequada entre sangue e anticoagulante; amostras hemolisadas, lipémicas ou insuficientes; amostras transportadas em condições inapropriadas; amostras colhidas em recipientes inadequados (10).

As amostras de sangue destinadas à obtenção de soro são centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e as destinadas à obtenção de plasma a 2800 rpm durante 15 minutos.

Os tubos primários destinados às secções da Química Clínica e Imunologia, após centrifugação, são encaminhados para o equipamento de triagem automática AutoMate™ 2550, da Beckman Coulter (Figura 1), permitindo agilizar e simplificar os processos das fases pré e pós-analítica. O AutoMate™ 2550 executa a descapsulação dos tubos; a distribuição de amostras por áreas analíticas que usam o tubo primário; a alíquotagem e respetiva rotulagem com códigos de barras, separando as alíquotas por destinos pré-definidos; a separação de amostras urgentes; e, ainda, o arquivo das amostras. Este equipamento possibilita a minimização do processamento manual de amostras e permite maior rastreabilidade das mesmas (14).



Figura 1. Equipamento de triagem automática AutoMate™ 2550, da Beckman Coulter. [Carla Narciso,2021]

Em relação às amostras destinadas às secções da Hematologia, Microbiologia e Patologia Molecular, estas são triadas manualmente e encaminhadas para a respetiva secção.

5. Fase Analítica

A Fase Analítica corresponde à fase onde se executam os ensaios laboratoriais, utilizando sistemas automatizados ou técnicas manuais (15), com vista à obtenção dos resultados. Estes resultados contribuem fortemente para a prevenção, rastreio, prognóstico, diagnóstico, terapêutica e monitorização de patologias humanas (3).

Estima-se que a taxa de erro associada à Fase Analítica é de 7-13%, estando os principais erros relacionados com problemas no funcionamento dos equipamentos, presença de interferentes nas amostras que influenciam o desempenho analítico, falhas no controlo de qualidade e na execução dos procedimentos (16). Os erros decorridos nesta fase do processo laboratorial têm um impacto significativo nos resultados laboratoriais, na medida em que podem levar a diagnósticos incorretos ou terapêuticas inadequadas, sendo, por isso, tão fundamental a garantia da precisão e exatidão na validação dos resultados (15).

A implementação de sistemas e equipamentos automatizados permitiu não só reduzir os erros humanos associados à execução manual dos testes, como também melhorou a eficiência e a capacidade de processamento de amostras. Por outro lado, os programas de Controlo de Qualidade Interno e a participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade constituem ferramentas essenciais para avaliar e monitorizar o desempenho analítico. A manutenção e calibração de equipamentos também são fundamentais (15,16).

O Laboratório SYNLAB Lisboa está dividido em várias áreas analíticas: Química Clínica, Hematologia, Imunologia, Microbiologia e Patologia Molecular. O presente capítulo tem como objetivo descrever os principais procedimentos, metodologias e alguns dos parâmetros analíticos referentes às valências laboratoriais abrangidos na realização do estágio laboratorial, nomeadamente, nas áreas de Química Clínica, Imunologia e Patologia Molecular.

5.1. Química Clínica

A Química Clínica é uma ciência fundamental para o Laboratório de Análises Clínicas (17). Esta ciência combina o conhecimento da química geral, química orgânica e bioquímica com a compreensão da fisiologia humana. É também um serviço, uma vez que, produz evidências objetivas que auxiliam no diagnóstico e monitorização de muitas doenças. O laboratório de química clínica vai, então, determinar alterações de marcadores bioquímicos específicos, que funcionam como indicador do estado de saúde ou de patologia (18).

De todas as secções laboratoriais, a Química Clínica é a área mais automatizada. Esta automatização permite obter resultados mais exatos e precisos, comparativamente com os métodos manuais (18).

Neste capítulo será abordado o fundamento dos métodos dos vários ensaios realizados para avaliação laboratorial dos metabolismos proteico, glucídico, lipídico e à avaliação das principais funções dos sistemas do organismo. Por fim, será também abordada a Análise Sumária da Urina.

5.1.1. Química Clínica e Imunoensaios

No Laboratório Central SYNLAB, grande parte dos ensaios de química clínica e de imunologia são executados no equipamento Atellica™ Solution (Figura 2), da Siemens Healthineers. Este equipamento integra um sistema de transporte, o Atellica Magline™; um sistema de visualização multi-câmara, de modo a reduzir os erros na leitura de códigos de barras; um *software* de programação inteligente, para gerir adequadamente as amostras urgentes e de rotina; e um sistema de programação automatizado de controlos e calibradores, a partir de um compartimento refrigerado a bordo (19).

O equipamento Atellica™ Solution, da Siemens Healthineers, pode ser composto por dois tipos de módulos diferentes: o módulo Atellica™ *CH Analyzer*, analisador de química clínica, e o módulo Atellica™ *IM Analyser*, analisador de imunoensaios.



Figura 2: Equipamento Atellica™ Solution, da Siemens Healthineers. [Carla Narciso, 2021]

O módulo Atellica™ *CH Analyzer* utiliza duas metodologias: um sistema de Tecnologia Multisensores Integrados (IMT), para a determinação quantitativa de iões sódio, potássio e

cloro, por potenciometria; e espectrofotometria, para determinação quantitativa de outros parâmetros bioquímicos.

A potenciometria é um método eletrolítico baseado na medição da diferença de potencial elétrico entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência, na qual a corrente elétrica é mantida constante. O eletrodo de referência tem um potencial conhecido e insensível à composição da solução em estudo, enquanto o eletrodo indicador, seletivo para o íão que se pretende analisar, é utilizado para medir a atividade do íão em questão (18). O módulo Atellica™ *CH Analyser* apresenta um sistema de Tecnologia de Multisensores Integrados, construído por um eletrodo de referência e três eletrodos seletivos de íões para sódio, potássio e cloro.

O método da espectrofotometria baseia-se em dois princípios: primeiro, as substâncias absorvem luz a comprimentos de onda específicos e, segundo, a quantidade de luz absorvida é proporcional à concentração da substância presente. Estes princípios são resumidos na lei de Lambert-Beer, que diz que a absorvência é igual à multiplicação do percurso ótico pela concentração de substância (18).

O módulo Atellica™ *IM Analyser* utiliza a metodologia de quimioluminescência, recorrendo a tecnologia avançada de ésteres de acridina. A luminescência é definida como a radiação emitida por uma molécula ou átomo quando regressam do estado excitado ao estado fundamental, e é classificada de acordo com a fonte de excitação. Quando a fonte de excitação provém de reações químicas é classificada como quimioluminescência (20). Neste método, o processo de excitação é causado por um oxidante e envolve a oxidação de um composto orgânico, que no caso do Atellica™ *IM Analyser* corresponde a éster de acridina. Esta reação ocorre na presença de um catalisador e origina um produto num estado excitado que emite luz ao voltar ao estado fundamental (20,21). Na quimioluminescência, os imunoensaios podem ser competitivos ou não competitivos.

Os imunoensaios competitivos traduzem-se em reações cujo número de locais de ligação ao antigénio é limitado. O antigénio de interesse e o antigénio marcado, análogo do antigénio de interesse, são incubados com uma quantidade conhecida de anticorpo e o sinal resultante provém da competição entre ambos para os locais de ligação do anticorpo. Assim, a quantidade de antigénio marcado que se liga ao anticorpo é inversamente proporcional à quantidade do antigénio de interesse presente na amostra. As abordagens mais comuns dos imunoensaios competitivos são as técnicas de adição simultânea ou a sequencial. Na técnica de adição simultânea, tanto o antigénio marcado como a amostra são adicionados simultaneamente à mistura de reação. Por outro lado, a técnica de adição sequencial envolve a incubação da amostra com o anticorpo até alcançar o equilíbrio, seguida da adição do antigénio marcado (22).

Por fim, os imunoensaios não competitivos baseiam-se em reações onde há excesso de reagente. Nestes imunoensaios, o sinal resultante da reação é diretamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra. A técnica mais comum que se utiliza é o imunoensaio do tipo *sandwich*, que recorre a dois anticorpos para detetar o analito. O primeiro anticorpo utilizado na reação é denominado de anticorpo de captura e está adsorvido ou ligado covalentemente a um suporte sólido, sendo usado para extrair o analito presente na amostra. O segundo anticorpo é marcado e vai reagir com o antigénio capturado, sendo utilizado para detetar o analito após a remoção dos outros componentes aquando da lavagem (22).

De seguida são descritos alguns dos principais parâmetros, associados aos diferentes metabolismos e sistemas do organismo, determinados no equipamento Atellica™ Solution.

A. Equilíbrio Hidroeletrólítico

Os eletrólitos são iões presentes nos fluídos biológicos, essenciais para a regulação da distribuição de água, manutenção da pressão osmótica, transmissão nervosa muscular, permeabilidade celular, reações de oxidação-redução e manutenção do pH sanguíneo (21). O sódio (Na^+), o potássio (K^+) e o cloro (Cl^-) são os principais eletrólitos envolvidos na manutenção do equilíbrio de fluídos no corpo, sendo que a sua concentração sérica pode ser determinada através do sistema de Tecnologia de Multisensores Integrados, mencionado anteriormente.

O sódio é o principal catião do líquido extracelular e, por isso, desempenha um papel fundamental na manutenção da pressão osmótica do fluído extracelular. As suas funções incluem, também, o auxílio na transmissão de impulsos nervosos, a facilitação da contração muscular, a manutenção do equilíbrio ácido-base e a manutenção da viscosidade do sangue (21). O potássio é o principal catião do líquido intracelular, apresentando como funções a manutenção do ritmo cardíaco e contribuição para a condução neuromuscular (18). Por último, o cloro é o anião que se encontra em maior concentração no líquido extracelular, permitindo a manutenção da eletroneutralidade. Além disso, contribui também para a manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-base (18).

De acordo com a Norma da Direção Geral da Saúde 070/2011, o ionograma deve ser prescrito tendo em conta o contexto clínico em que ocorre, isto é, se a patologia de base do indivíduo ou a terapêutica instituída justifique a existência de qualquer alteração de um ou mais dos iões supramencionados. Nesse sentido, as principais situações para prescrição do ionograma são as seguintes: doentes graves com perda de consciência; patologias cardíacas, renais ou hepáticas; doentes sob terapêutica com fluídos endovenosos, alimentação parentérica ou com fármacos; doentes com poliúria, oligúria, polidipsia, vômitos, diarreia, ostomias digestivas ou urinárias; e doentes com tonturas, fadiga muscular ou alterações do comportamento (23).

Os valores de referência relativos ao ionograma estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de referência relativos aos iões sódio, potássio e cloro, no soro e urina.

| Analito | Valores de Referência | |
|---------------|-----------------------|------------------|
| | Soro (mmol/L) | Urina (mmol/24h) |
| Na^+ | 136,0-145,0 | 40,0-220,0 |
| K^+ | 3,1-5,1 | 25,0-125,0 |
| Cl^- | 98,0-107,0 | 110,0-250,0 |

B. Metabolismo de Proteínas

As proteínas desempenham um papel crucial em, praticamente, todos os processos biológicos (24). O soro contém uma grande variedade de proteínas e uma quantidade elevada de proteínas totais. Os métodos utilizados para a quantificação de proteínas baseiam-se tanto nas suas propriedades estruturais, como na concentração relativa presente na amostra em análise (18).

Proteínas Totais

A determinação quantitativa das proteínas totais é utilizada no diagnóstico e tratamento de várias patologias que envolvem o fígado ou os rins, bem como de distúrbios metabólicos e nutricionais (25).

A quantificação das proteínas totais é determinada por espectrofotometria e baseia-se no método de Weichselbaum utilizando o reagente de biureto (sulfato cúprico em solução alcalina). Em meio alcalino, as ligações peptídicas das proteínas vão reagir com os íons cúpricos do reagente, formando um complexo roxo cuja absorvência é medida a 545 nm (25).

Os valores de referência relativos às proteínas totais estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de Referência relativos às proteínas totais no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|------------------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (g/dL) |
| Proteínas totais | 5,7-8,2 |

Albumina

A albumina é a proteína que existe em maior abundância no plasma. É sintetizada no fígado e tem como principais funções manter a pressão osmótica coloidal, nos espaços intravascular e extravascular, bem como o transporte de vários compostos. Os níveis de albumina encontram-se aumentados em casos de desidratação aguda (21). Por outro lado, níveis baixos de albumina – hipoalbuminemia- podem ocorrer devido a perdas, a partir do sistema renal ou ainda em casos de queimaduras severas; a um aumento do catabolismo, consequente de danos tecidulares ou processos inflamatórios; a desnutrição; e por patologia hepática (18). Posto isto, a medição de albumina é utilizada para diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias crônicas e disfunções hepáticas e renais (26).

A quantificação da albumina é determinada por espectrofotometria e baseia-se no método de Doumas, Watson e Biggs, que utiliza a solução verde de bromocresol (BCG) como corante de fixação. A albumina presente no soro ou plasma liga-se ao BCG, formando um complexo de albumina-BCG, cuja absorvência é medida a 596/694 nm (26).

Os valores de referência relativos à albumina estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de Referência relativos à albumina no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|----------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (g/dL) |
| Albumina | 3,2-4,8 |

C. Metabolismo dos Glúcidos

As patologias associadas ao metabolismo dos glúcidos podem ser divididas em dois grupos: hiperglicemia e hipoglicemia. O distúrbio mais comum é a diabetes *mellitus*, um grupo

de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia. Os vários tipos de diabetes variam consoante a sua etiologia, sintomas e consequências da patologia (18,27).

Glucose

A glucose é a principal fonte de energia do organismo, pelo que é importante manter os seus níveis dentro do limite. A hipoglicemia traduz-se por níveis de glucose no sangue inferiores aos de jejum e pode ser classificada como reativa ou de jejum. A hipoglicemia reativa pode ocorrer devido a uma administração excessiva de insulina ou a ingestão de álcool. Por sua vez, a hipoglicemia de jejum pode ser resultante de uma resposta a tumores pancreáticos produtores de insulina (insulinomas), disfunção hepática, deficiência de glucocorticoides, sépsis, entre outros (18). Relativamente à hiperglicemia, pode ter como causas a pancreatite crónica, a Síndrome de Cushing, entre outros (28). No entanto, a causa mais comum é a diabetes *mellitus*, um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por defeitos na secreção de insulina ou na sua ação (27).

De acordo com a Norma da Direção Geral da Saúde n.º 002/2011, os critérios para o diagnóstico de diabetes são (29):

- a) Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL;
- b) Sintomas clássicos e uma glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL;
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dL às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75g de glucose;
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Por sua vez, o diagnóstico da diabetes gestacional baseia-se nos seguintes valores para plasma venoso(29):

- a) Glicemia de jejum, a realizar na 1.^a consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL;
- b) Se a glicemia de jejum < 92 mg/dL, realiza-se PTGO com 75 g de glucose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores:
 - i. às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dL;
 - ii. à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dL;
 - iii. às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dL.

Além das alterações acima mencionadas, é também possível fazer o diagnóstico de hiperglicemia intermédia, permitindo a identificação de categorias de risco aumentado para diabetes, com base nos seguintes parâmetros (29):

- a) Anomalia da Glicemia de Jejum: glicemia de jejum ≥ 110 e < 126 mg/dL);
- b) Tolerância Diminuída à Glucose: glicemia às 2 horas na PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dL.

O ensaio para determinação da glucose é realizado por espectrofotometria, baseando-se no método de Slein. Numa primeira fase, a glucose da amostra é fosforilada pelo trifosfato de adenosina (ATP), na presença da hexocinase. A glucose-6-fosfato formada é oxidada na presença da glucose-6-fosfato desidrogenase, resultando na redução do NAD⁺ (nicotinamida-adenina-dinucleótido) a NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzido). A absorvência do NADH é medida a 340/410 nm e é diretamente proporcional à quantidade de glucose presente na amostra (30).

Os valores de referência relativos à glucose estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de Referência relativos à glucose no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) |
| Glucose | 74,0-106,0 |

Insulina

A insulina é uma hormona peptídica produzida pelas células β dos ilhéus pancreáticos de Langerhans. A sua principal função é regular a concentração de glucose na corrente sanguínea. Inicialmente, a insulina encontra-se presente como uma molécula de grandes dimensões, a pré-pró-insulina, e depois é convertida em pró-insulina. Posteriormente, no complexo de Golgi, a pró-insulina sofre proteólise, resultando na formação da insulina e do péptido C. Na membrana celular, ambos são libertados para a circulação em quantidades equimolares (24,31). Normalmente, a determinação da insulina não é utilizada no diagnóstico e/ou monitorização do indivíduo diabético, pois na amostra pode estar presente insulina exógena ou anticorpos dirigidos contra a insulina, e assim, interferir na medição (18,31). No entanto, os valores de insulina podem ser úteis para avaliar indivíduos com hiperglicemia em jejum e, também, para avaliar anomalias na função secretora das células β dos ilhéus pancreáticos de Langerhans (31).

O ensaio para a determinação de insulina é realizado por imunoensaio do tipo *sandwich* com deteção por quimioluminescência (31). Os valores de referência relativos à insulina estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de Referência relativos à insulina no soro.

| Analito | Valores de Referência |
|----------|-----------------------|
| | Soro (μ UI/mL) |
| Insulina | 3,0-25,0 |

Péptido C

Como referido anteriormente, a molécula de pró-insulina sofre proteólise formando a insulina e o péptido C. Nesse sentido, a concentração do péptido C representa a concentração de insulina endógena produzida no pâncreas e a sua determinação não é afetada pelas interferências da insulina exógena e de anticorpos de insulina. Assim, a determinação do péptido C auxilia no diagnóstico diferencial de hipoglicemia, bem como no diagnóstico e tratamento de indivíduos com defeito na produção de insulina endógena (24,32).

O ensaio para a determinação do péptido C é realizado por imunoensaio do tipo *sandwich* com deteção por quimioluminescência (32). Os valores de referência relativos ao péptido C estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de Referência relativos ao péptido C no soro.

| Analito | Valores de Referência |
|-----------|-----------------------|
| | Soro (ng/mL) |
| Péptido C | 0,8-3,9 |

D. Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos desempenham papéis fundamentais para a vida, nomeadamente, atuando como hormonas, servir de fonte de energia, auxiliar na digestão e constituir componentes estruturais nas membranas celulares (24). Apesar de serem muito essenciais para o organismo, os lípidos também estão relacionados a doenças coronárias, doenças cardiovasculares e distúrbios das lipoproteínas (21).

Colesterol total

O Colesterol atua como componente estrutural de todas as células e, ainda, como um precursor na síntese de hormonas esteroides e ácidos biliares (21). Além do papel como fator de risco para a doença coronária, o aumento da concentração de colesterol pode ser devido a hipotireoidismo, patologia hepática, patologia renal ou diabetes. Por outro lado, a diminuição da concentração de colesterol pode ser resultante de hipertireoidismo, má absorção digestiva ou função hepática deficiente (18). A concentração de colesterol no sangue depende de muitos fatores variáveis, nomeadamente, fatores genéticos, idade, género, alimentação e atividade física, porém, a medição do colesterol total é utilizada no diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem excesso de colesterol no sangue e distúrbios do metabolismo de lípidos e lipoproteínas (18,33).

O ensaio para a determinação do colesterol total é realizado por espectrofotometria, com base num método enzimático a ponto final, recorrendo às enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase, por meio da reação de Trinder. Em primeiro, os ésteres de colesterol são hidrolisados, pela enzima colesterol-esterase, em colesterol e ácidos gordos livres. De seguida, ocorre a conversão do colesterol em coles-4-en-3-ona, na presença de oxigénio, para formar peróxido de hidrogénio. Mediante a influência catalítica de peroxidase e a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipitina e do fenol, é formando um composto colorido cuja absorvência é medida a 505/694 nm (33).

Os valores de referência relativos ao colesterol total sérico são descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de Referência relativos ao colesterol total no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|------------------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) |
| Colesterol Total | < 200,0 |

Triglicéridos

Os triglicéridos são constituídos por uma molécula de glicerol e três ácidos gordos. O aumento da sua concentração pode ser resultante de pancreatite, diabetes *mellitus*, consumo excessivo de álcool, algumas patologias hepáticas, hipotireoidismo ou uso de contraceptivos orais. Por outro lado, uma diminuição nos níveis de triglicéridos pode estar associada a hipertireoidismo (21). Neste âmbito, a medição de triglicéridos pode ser utilizada no diagnóstico e tratamento das patologias referidas e também noutras doenças que envolvem o metabolismo de lípidos (34).

O ensaio para a determinação dos triglicéridos é realizado por espectrofotometria, com base na reação enzimática trifásica de Fossati e na reação a ponto final de Trinder. Primeiramente, os triglicéridos são convertidos em glicerol e ácidos gordos livres, por ação da lipase. De seguida, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato por ação do glicerol cinase, que, por sua vez, é convertido em peróxido de hidrogénio pela glicerol-3-fosfato oxidase. Mediante a influência catalítica de peroxidase e a partir do peróxido de hidrogénio, da 4-aminoantipitina e do fenol, é formando um composto colorido cuja absorvência é medida a 505/694 nm (34).

Os valores de referência relativos os triglicéridos são descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de referência relativos aos triglicéridos no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) |
| Triglicéridos | < 150,0 |

Colesterol das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL)

As lipoproteínas, partículas esféricas que contêm triglicéridos, fosfolípidos, colesterol e apoproteínas, são utilizadas no transporte de lípidos pela corrente sanguínea (21,24).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são formadas através da remoção dos triglicéridos das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) durante o metabolismo. A sua principal função é transportar o colesterol pela corrente sanguínea para os vários tecidos (21). Os níveis elevados de LDL são prejudiciais porque podem resultar na sua acumulação na parede arterial e, posteriormente, levar à formação de placas ateroscleróticas. Consequentemente, a deposição destas placas estreitam as paredes arteriais, diminuindo o fluxo sanguíneo e o aporte de oxigénio para os tecidos. Assim, níveis elevados de LDL estão associados não só a um maior risco de aterosclerose, como de doença cardíaca isquémica, enfarte agudo do miocárdio, entre outras patologias (35).

O ensaio para a determinação do colesterol das LDL é realizado por espectrofotometria, sendo composto por dois passos de reação distintos. O primeiro passo da reação consiste na eliminação do colesterol associado às lipoproteínas exceto o colesterol das LDL, através do uso de um surfactante seletivo. Seguidamente, a colesterol esterase e a colesterol oxidase eliminam o colesterol, formando peróxido de hidrogénio que é, depois, eliminado pela ação da catalase. O colesterol das LDL é libertado com recurso a outro surfactante, que contém azida de sódio e, por isso, vai inibir a catalase do primeiro passo. Uma vez inibida a catalase, o peróxido de hidrogénio que se forma não é eliminado e pode ser quantificado através da reação de ponto final de Trinder, cujo composto colorido formado tem absorvência a 596/694 nm (36).

Os valores de referência relativos ao colesterol das LDL estão descritos na Tabela 11, assim como o risco cardiovascular associado (37).

Tabela 11: Valores de referência relativos ao colesterol das LDL no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência | |
|--------------------|-----------------------|----------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) | |
| Colesterol das LDL | < 116,0 | |
| | < 100,0 | |
| | < 70,0 | |
| | < 55,0 | |
| | | Risco Cardiovascular |
| | | Baixo |
| | | Moderado |
| | | Elevado |
| | | Muito elevado |

Colesterol das Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL)

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) podem ser sintetizadas no fígado e no intestino ou através do catabolismo de quilomicras e VLDL (21). As HDL desempenham uma função importante na remoção do colesterol livre presente tecidos periféricos e no seu transporte para o fígado - transporte reverso do colesterol (35). O aumento dos níveis de HDL pode estar associado ao aumento de estrogênio em mulheres e ao aumento da atividade física. Por outro lado, a diminuição dos níveis de HDL pode dever-se ao aumento da progesterona, obesidade, tabagismo e diabetes *mellitus* (18).

O ensaio para a determinação do colesterol das HDL é realizado por espectrofotometria, composto por dois passos de reação distintos, tal como no ensaio para a determinação do colesterol das LDL acima descrito. Contudo, o primeiro passo da reação tem como objetivo eliminar o colesterol das lipoproteínas, exceto o colesterol das HDL. Os valores de referência relativos ao colesterol das HDL estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de referência relativos ao colesterol das HDL no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência | |
|--------------------|-----------------------|------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) | |
| Colesterol das HDL | Gênero Feminino | Gênero Masculino |
| | > 45,0 | > 40,0 |

F. Avaliação da Função Renal

Os rins desempenham uma grande variedade de funções, sendo as mais importantes a eliminação de toxinas e produtos excedentes do metabolismo, a manutenção da homeostasia e a participação na regulação hormonal. No laboratório, existem vários parâmetros bioquímicos que podem ser utilizados para diagnosticar e monitorizar patologias renais (27).

Creatinina

A creatinina é produzida a partir da hidrólise da creatina e da fosfocreatina presentes no tecido muscular. Uma vez que, não se liga às proteínas plasmáticas, é eliminada pelos rins em indivíduos com função renal normal. A creatinina é filtrada pelo glomérulo, mas não é reabsorvida pelos túbulos renais, podendo ser utilizada como indicador da taxa de filtração glomerular. A sua concentração no soro ou no plasma depende também da massa muscular e da

ingestão de proteínas na alimentação (38). Posto isto, a determinação da creatinina pode ser utilizada no diagnóstico e monitorização da função renal (39).

O ensaio para a determinação da creatinina é realizado por espectrofotometria, com base no método de Jaffe. Em meio alcalino, a creatinina vai reagir com o ácido pícrico e forma um complexo avermelhado de creatinina-picrato, cuja velocidade de formação pode ser medida a 505/571 nm e é proporcional à concentração de creatinina (39).

Os valores de referência relativos à creatinina estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de referência relativos à creatinina, no soro e urina.

| | Valores de Referência para a Creatinina | |
|-------------------------|--|-----------------------|
| | Soro/plasma (mg/dL) | Urina (mg/24h) |
| Género Feminino | 0,55-1,02 | 600-1800 |
| Género Masculino | 0,70-1,30 | 950-2490 |

Ureia

A ureia é formada a partir do metabolismo dos aminoácidos e a sua produção diária varia com a ingestão de proteínas, com a função hepática e com o metabolismo (38). A ureia é sintetizada no fígado e transportada pelo sistema circulatório até aos rins, onde é livremente filtrada pelo glomérulo (18). Contudo, 40 a 60% da ureia filtrada move-se passivamente dos túbulos renais, dependendo do fluxo urinário. Comparativamente com a creatinina, a ureia é um indicador menos específico da função renal, no entanto, a sua determinação pode ser utilizada no diagnóstico e monitorização da terapêutica de patologias renais, obstrução do trato urinário e insuficiência renal aguda ou crónica (40).

O ensaio para a determinação da ureia é realizado por espectrofotometria, com base na reação enzimática de Roch-Ramel. Na presença de água e urease, a ureia é hidrolisada, formando amónia e dióxido de carbono. De seguida, a amónia produzida reage com o 2-oxoglutarato, na presença de glutamato desidrogenase e NADH. A oxidação do NADH a NAD é medida a 340/410 nm numa reação de taxa inversa (40).

Os valores de referência relativos à ureia estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de referência relativos à ureia no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|----------------|------------------------------|
| | Soro (mg/dL) |
| Ureia | 19,0-49,0 |

G. Avaliação da Função Hepática

O fígado é o maior e mais complexo órgão do sistema gastrointestinal, englobando três sistemas: o sistema hepatocelular, responsável pela grande maioria das atividade metabólicas, nomeadamente, a síntese de proteínas, o metabolismo de glúcidos, lípidos, proteínas e lípidos, o metabolismo de fármacos, armazenamento de ferro e vitaminas, síntese e eliminação de hormonas, metabolismo de ureia a partir de amónia; o sistema hepatobiliar, envolvido no

metabolismo da bilirrubina e ácidos biliares; e, por último, o sistema reticuloendotelial, composto pelas células de Kupffer e envolvido na defesa imunitária e na degradação da hemoglobina em bilirrubina (41). Neste contexto, a função hepática pode avaliada pela medição das enzimas fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e pela determinação da bilirrubina total e direta, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicéridos, ureia e amônia (18).

Bilirrubina

A bilirrubina é um produto resultante da degradação da porção heme da hemoglobina, apresentando baixa solubilidade. Quando é libertada no sangue, a bilirrubina liga-se covalentemente à albumina para ser transportada para o fígado. Esta forma de bilirrubina denomina-se por bilirrubina não conjugada ou indireta. Uma vez no hepatócito, a bilirrubina liberta-se da albumina e é conjugada na presença da enzima uridina 5'-difosfato glucuroniltransferase, com a transferência de ácido glucorónico para a molécula de bilirrubina, formando a chamada bilirrubina conjugada ou direta. Esta forma de bilirrubina é solúvel e pode ser excretada (18,27). O aumento dos níveis de bilirrubina no sangue pode ser classificado em três categorias: hiperbilirrubinémia pré-hepática, originada pelo aumento da hemólise e da degradação do heme, resultando no aumento da bilirrubina não conjugada; hiperbilirrubinémia hepática, geralmente causada por alterações no transporte para o hepatócito e conjugação da bilirrubina, traduzindo-se num aumento da bilirrubina não conjugada; e hiperbilirrubinémia pós-hepática, resultante de obstrução do fluxo biliar que impede o fluxo da bilirrubina conjugada e leva ao seu aumento (18).

O ensaio para a determinação da bilirrubina total e direta é realizado por espectrofotometria, baseando-se no método vanadato oxidase que utiliza o vanadato como agente oxidante. Na presença de um detergente e do vanadato, tanto a bilirrubina conjugada como a não conjugada são oxidadas, produzindo biliverdina e, assim, determinar os níveis de bilirrubina total. A eliminação do detergente permite a quantificação da bilirrubina conjugada. Esta reação de oxidação resulta na diminuição da absorvência a 451/545 nm, que é proporcional à concentração de bilirrubina total ou conjugada presente na amostra (42–44).

Os valores de referência relativos à bilirrubina total e conjugada estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de referência da bilirrubina total e da bilirrubina conjugada, no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|-----------------------|------------------------------|
| | Soro/Plasma (mg/dL) |
| Bilirrubina Total | 0,3-1,2 |
| Bilirrubina Conjugada | ≤0,3 |

Transaminases

As transaminases são enzimas muito úteis para detetar danos hepatocelulares, na ausência de necrose aguda ou isquemia de outros órgãos. A ALT encontra-se principalmente nos hepatócitos, podendo ser encontrada em menores quantidades no músculo esquelético e nos rins. Por sua vez, a AST encontra-se distribuída, em quantidades aproximadamente iguais, no coração, músculo esquelético e fígado, pelo que, a ALT é considerada um marcador mais específico do fígado comparativamente com a AST. O aumento mais acentuado da atividade de

ambas as transaminases traduz-se em condições agudas, nomeadamente, na hepatite viral, necrose hepática induzida por drogas e toxinas e isquemia hepática. Nestas situações, verifica-se que o aumento da ALT é geralmente superior. No entanto, como as transaminases não são exclusivas do fígado, o seu aumento pode resultar da disfunção ou dano de outro órgão (27).

O ensaio para determinação da atividade da AST e da ALT é realizado por espectrofotometria, baseando-se no método de Karmen e de Wroblewski e LaDue, respetivamente. A AST e a ALT catalisam a conversão de aspartato e alanina em oxaloacetato e piruvato, respetivamente, na presença de α -cetoglutarato. Estas reações produzem malato e lactato, respetivamente, levando à redução de NADH a NAD⁺. A velocidade de redução da absorvência do NADH a 340/410 nm é diretamente proporcional à atividade da AST ou ALT (45,46).

Os valores de referência relativos à AST e ALT estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de referência relativos à AST e ALT no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (U/L) |
| AST | < 34,0 |
| ALT | 10,0-49,0 |

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina apresenta várias isoenzimas que se encontram amplamente distribuídas em todos os tecidos, no entanto, a sua maior atividade observa-se no fígado, osso, intestino, rins e placenta. Na avaliação da função hepática, a ALP é útil como marcador de obstrução biliar extra-hepática ou de colesterase intra-hepática. Contudo, como está também presente no osso, o aumento dos níveis da sua atividade pode estar relacionado com patologias ósseas ou com a fase de crescimento de jovens. Por outro lado, durante a gravidez, ocorre elevação dos níveis da ALP devido à libertação da sua isoenzima placentária. Assim, a interpretação destes resultados torna-se complexa, pois o aumento da sua concentração pode registar-se na ausência de danos hepáticos (27).

O ensaio para determinação da atividade da ALP é realizado por espectrofotometria, baseando-se no método de Bowers e McComb, que permite detetar todas as isoenzimas da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina catalisa a transfosforilação do p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol, na presença de tampão ativador 2-amino-2-metil-1-propanol e íões de magnésio e zinco. A absorvência da formação do p-nitrofenol é medida a 410/478 nm e é diretamente proporcional à atividade da ALP presente na amostra (47).

Os valores de referência relativos à ALP estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de referência relativos à ALP no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (U/L) |
| ALP | 46,0-116,0 |

Gama-Glutamil Transferase

A GGT é uma enzima localizada nas membranas celulares, tendo maior concentração nos rins, fígado, pâncreas, intestino e próstata. É um marcador sensível para detetar obstrução biliar e colesterase causada por ingestão crónica de álcool ou drogas. Por outro lado, como não está presente nos tecidos ósseos, a determinação da GGT permite diferenciar os níveis elevados da ALP, na medida em que os seus níveis apresentam valores normais em patologias ósseas, na gravidez e em jovens e crianças em crescimento (27).

O ensaio para determinação da atividade da GGT é realizado por espectrofotometria, baseando-se no procedimento descrito por Shaw, L.M. *et al.* Na reação com o substrato sintético L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, a glicilglicina atua como recetor de resíduo γ -glutamil, formando-se 5-amino-2-nitrobenzoato, cuja velocidade de formação é medida a 410/478 nm como um ensaio cinético e é diretamente proporcional à atividade da GGT (48).

Os valores de referência relativos à GGT estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Valores de referência relativos à GGT no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência | |
|---------|-----------------------|------------------|
| | Soro/Plasma (U/L) | |
| GGT | Género Feminino | Género Masculino |
| | < 38,0 | <73,0 |

H. Avaliação da Função Tiroideia

A tiroide é responsável pela produção das hormonas tiroxina (T4) e Triiodotironina (T3), sendo esta produção regulada pela hormona estimulante da tiroide (TSH) produzida pela hipófise. Estas hormonas desempenham um papel fundamental na manutenção de um metabolismo saudável e de um crescimento normal, uma vez que, apresentam como função regular o desenvolvimento neurológico, a homeostase, a maturação sexual e o metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono (21).

Hormona Estimulante da Tiroide

A hormona estimulante da tiroide (TSH) é uma glicoproteína sintetizada e segregada pela adenohipófise, em resposta a um mecanismo de *feedback* negativo que envolve a concentração das hormonas T3 livre (FT3) e T4 livre (FT4). Por outro lado, a hormona libertadora de tirotropina (TRH) estimula diretamente (mecanismo de *feedback* positivo) a produção de TSH (24,49). A quantificação dos níveis de TSH na corrente sanguínea constitui um elemento fundamental na avaliação da função tiroideia, na medida em que auxilia a realização de um diagnóstico diferencial de hipotireoidismo primário, secundário e terciário. Os níveis de TSH encontram-se elevados no hipotireoidismo primário, enquanto no hipotireoidismo secundário e terciário são baixos (49).

O ensaio para a determinação da TSH é realizado por imunoensaio do tipo *sandwich* com deteção por quimioluminescência (49).

Os valores de referência relativos à TSH estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19: Valores de referência relativos à TSH no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (mUI/L) |
| TSH | 0,55-4,78 |

Tiroxina e Triiodotironina Livres

A T4 é exclusivamente sintetizada pela tiroide, enquanto apenas 20% da T3 é sintetizada pela tiroide. Isto porque a maioria da T3 é resultante da desiodação da T4 nos tecidos periféricos. Na corrente sanguínea, a maioria das hormonas tiroideias estão ligadas inversamente a proteínas de transporte, pelo que são consideradas metabolicamente inativas. Apenas uma pequena fração de T3 e T4 estão disponíveis na circulação na sua forma livre e metabolicamente ativa. Neste contexto, a medição de FT3 e FT4 torna-se mais relevante para avaliar a função tiroideia, uma vez que os níveis de T3 e T4 totais são influenciados por variações na concentração das proteínas de ligação ocorridas em diferentes estados fisiológicos e patológicos.

O ensaio para a determinação da FT3 e FT4 é realizado por quimioluminescência, através de imunoensaio competitivo. Os valores de referência relativos à FT4 e FT3 estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20: Valores de referência relativos à FT4 e FT3 no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro/Plasma (pmol/L) |
| FT4 | 11,5-22,7 |
| FT3 | 3,5-6,5 |

I. Avaliação da Função Cardíaca

As duas patologias cardiovasculares mais comuns são o enfarte agudo do miocárdio (EAM) e a insuficiência cardíaca(24). Neste âmbito, o laboratório de química clínica desempenha um papel fundamental na determinação de biomarcadores cardíacos, na medida em que estes constituem uma ferramenta para o diagnóstico, identificação de risco, tratamento e monitorização de indivíduos com as patologias acima referidas (50).

Os ensaios para a determinação dos biomarcadores cardíacos mencionados abaixo realizam-se por quimioluminescência, através de imunoensaio do tipo *sandwich*.

Biomarcadores de Enfarte Agudo do Miocárdio

O enfarte agudo do miocárdio define-se, patologicamente, pela necrose das células do miocárdio devido a isquemia prolongada, sendo que a presença de lesão miocárdica aguda pode ser detetada pela alteração de biomarcadores cardíacos (51). O biomarcador ideal de lesão miocárdica deverá apresentar um aumento precoce detetável na circulação e ser específico para a necrose miocárdica. Atualmente, os biomarcadores disponíveis não cumprem estes critérios, no entanto, existe uma variedade de biomarcadores de necrose cardíaca disponíveis como a

mioglobina, a troponina e a isoenzima MB da creatinina cinase (CK-MB) (50). O padrão de liberação na circulação destes marcadores está representado na Figura 3.

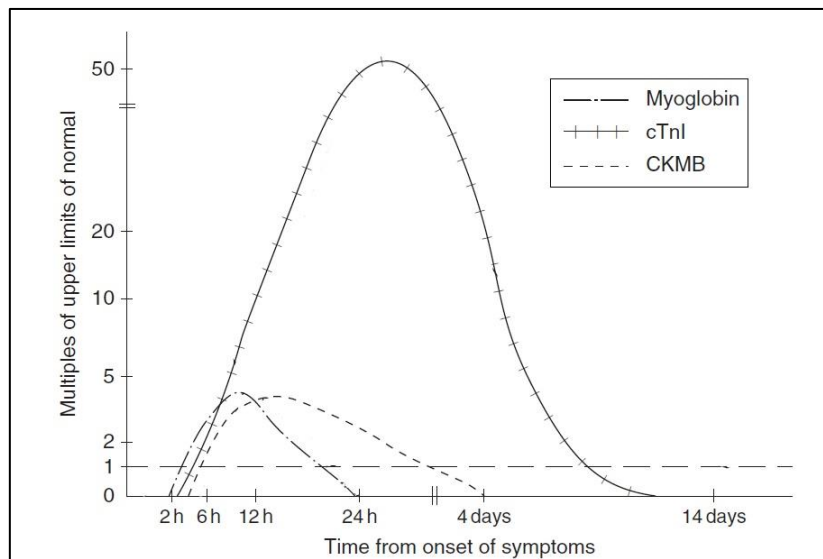


Figura 3: Representação gráfica do padrão de liberação de alguns biomarcadores, após enfarte agudo do miocárdio. [Adaptado de 50]

As troponinas cardíacas constituem um complexo composto por três proteínas reguladoras: a troponina T, a troponina I e a troponina C. Estas proteínas são parte integrante dos filamentos finos do músculo cardíaco e, por isso, desempenham um papel crítico na regulação da atividade muscular cardíaca, nomeadamente, no processo de contração muscular (52). Contudo, a troponina C não é útil como biomarcador cardíaco porque também pode ser encontrada no músculo esquelético. Por outro lado, as isoformas cardíacas da troponina T e da troponina I são altamente específicas para lesões cardíacas, tornando-as biomarcadores muito úteis no diagnóstico precoce de enfarte agudo do miocárdio (41,52). No laboratório central SYNLAB Lisboa é realizada a determinação da troponina cardíaca I (cTnI). A especificidade cardíaca desta isoforma permite melhorar a precisão do diagnóstico em indivíduos com lesão do músculo esquelético e possível lesão do miocárdio concomitante. Em situação de EAM, a cTnI é libertada na circulação, podendo ser detetada 3 a 6 horas após o início dos sintomas, com picos de concentração após 12-16 horas e pode permanecer elevada durante 5 a 9 dias (53).

A mioglobina é uma hemoproteína que pode ser encontrada nos músculos cardíaco e esquelético, sendo rapidamente libertada para a circulação após uma lesão tecidual (54). Nesse sentido, a mioglobina é um biomarcador sensível de lesão muscular cardíaca, mas não é específico pois também se encontra no músculo esquelético (21). A libertação da mioglobina na circulação ocorre 2 a 4 horas após o dano celular, atingindo o seu pico entre 9 a 12 horas e voltando ao normal após 24 a 36 horas. Na ausência de trauma muscular esquelético, a mioglobina tem sido utilizada como um indicador precoce do EAM, e consequentemente, como indicador de exclusão (54).

A creatinina cinase (CK) é uma enzima citoplasmática que se encontra presente em praticamente todos os tecidos. A isoforma CK-MB é predominante no músculo cardíaco, contudo também pode ser encontrada no músculo esquelético (55). Os níveis de CK-MB resultantes de um enfarte do miocárdio podem ser detetados 3 a 8 horas após o aparecimento

dos sintomas, atingindo as concentrações máximas entre 12 a 24 horas. Geralmente, a sua concentração regressa ao limite de referência ao fim de 48 horas (56).

Os valores de referência relativos aos biomarcadores de EAM são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Valores de referência relativos aos biomarcadores de enfarte agudo do miocárdio no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência no Soro/Plasma | |
|-------------------|--------------------------------------|------------------|
| | Género Feminino | Género Masculino |
| cTnI | < 39,0 ng/L | < 54,0 ng/L |
| Mioglobina | < 36,0 µg/L | |
| CK-MB | < 5,0 ng/mL | |

Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca é uma doença progressiva que se define pela perda de capacidade do coração de bombear o sangue para todo o corpo. O seu diagnóstico é feito através de uma combinação de exames, nomeadamente, ecocardiograma, eletrocardiograma, radiografia do tórax e determinação do péptido natriurético cerebral (BNP) (21,57). Em situações de aumento de volume, aumento de pressão e hipertrofia cardíaca, os miócitos libertam pro-BNP. A clivagem deste precursor origina BNP e um segmento inativo N-terminal proBNP (NT-proBNP). Neste âmbito, o NT-proBNP pode ser utilizado como auxiliar no diagnóstico e prognóstico de indivíduos com insuficiência cardíaca (58).

Os valores de referência relativos ao NT-proBNP estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22: Valores de referência relativos ao NT-proBNP no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência no Soro/Plasma (pg/mL) | |
|------------------|--|-----------|
| | < 75 anos | ≥ 75 anos |
| NT-proBNP | 125,0 | 450,0 |

J. Endocrinologia Reprodutiva

O sistema reprodutor é composto por diversos tecidos e vias de sinalização, sendo responsável por uma série de funções fundamentais, nomeadamente, a produção e desenvolvimento adequados de gâmetas, a produção de hormonas e a preparação fisiológica para uma possível gravidez nas mulheres (59). A manutenção do funcionamento normal dos sistemas reprodutivos é assegurada por diversas hormonas, entre as quais, a hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH) e várias hormonas esteroides sexuais (24).

Hormona Luteinizante e Hormona Folículo-Estimulante

As hormonas LH e FSH são hormonas de glicoproteínas, cuja secreção é regulada por um equilíbrio de mecanismos de *feedback* negativo e positivo, que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise, os órgãos reprodutores e as hormonas esteroides sexuais e da hipófise. Nos indivíduos do género masculino, a LH é responsável pela estimulação da secreção da testosterona, enquanto a FSH é responsável pela estimulação da espermatogénese. Nas mulheres, a LH é

responsável pela estimulação da produção de androgénios, da secreção de progesterona e, ainda atua em conjunto com a FSH para estimular a ovulação. Por sua vez, a FSH estimula o desenvolvimento folicular e a produção de estradiol (60,61).

Os níveis de LH e FSH encontram-se elevados na menopausa e na hipofunção primária dos ovários, nas mulheres; e no hipogonadismo primário, nos homens. Por outro lado, níveis baixos de LH e FSH são observados na hiperfunção primária dos ovários, em mulheres; e no hipergonadismo primário, em homens (60,61).

Os ensaios para a determinação da LH e da FSH realizam-se por quimioluminescência, através de imunoensaio do tipo *sandwich* (60,61). Os valores de referência relativos a estas duas hormonas são descritos na Tabela 23.

Tabela 23: Valores de referência relativos à LH e FSH no soro.

| Analito | Valores de Referência | | | | | |
|------------|-----------------------|----------|----------------|----------|---------------|------------------|
| | Soro (mUI/mL) | | | | | |
| | Género Feminino | | | | | Género Masculino |
| | Fase Folicular | Ovulação | Fase Luteínica | Gravidez | Pós-menopausa | |
| LH | 1,9-12,5 | 8,7-76,3 | 0,5-16,9 | < 1,5 | 7,9-53,8 | 1,5-9,3 |
| FSH | 2,5-10,2 | 3,4-33,4 | 1,5-9,1 | < 0,3 | 23,0-116,3 | 1,4-18,1 |

Progesterona

A progesterona, hormona sexual feminina, atua juntamente com os estrogénios na regulação das funções do sistema reprodutor feminino durante o ciclo menstrual. Esta hormona é fundamental na preparação do útero para a implementação do blastocisto e na manutenção da gravidez. Nas mulheres não grávidas, a principal fonte de progesterona é o corpo lúteo, enquanto, durante a gravidez, essa fonte é a placenta. Na fase folicular do ciclo menstrual, os níveis de progesterona são baixos, sendo que aumentam imediatamente após a ovulação e regressam aos níveis de referência, posteriormente, se não ocorrer gravidez. Contudo, durante a gravidez, os níveis de progesterona aumentam continuamente até atingirem os níveis máximos no terceiro semestre. Neste contexto, a determinação de progesterona é útil na avaliação da ovulação e da função lútea em mulheres não grávidas. A produção inadequada de progesterona pode ser indicativa de deficiência na fase lútea, a qual está associada a infertilidade (24,62).

O ensaio para a determinação da progesterona é realizado por quimioluminescência, através de imunoensaio competitivo (62). Os respetivos valores de referência estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24: Valores de referência relativos à Progesterona no soro.

| Analito | Valores de Referência no soro (ng/mL) | | | | | | |
|---------------------|---------------------------------------|----------------|---------------|--------------|--------------|------------------|-----------|
| | Género Feminino | | | | | Género Masculino | |
| | Fase Folicular | Fase Luteínica | Pós-menopausa | Gravidez | | | |
| Progesterona | < 1,40 | 3,34-28,03 | < 0,73 | 1º Trimestre | 2º Trimestre | 3º Trimestre | 0,28-1,22 |
| | | | | 11,22-90,00 | 25,55-89,40 | 48,40-422,50 | |

Testosterona

A testosterona, o principal androgénio em indivíduos do sexo masculino, é produzida nas células de Leydig nos testículos, regulada pela LH. As principais funções da testosterona envolvem a espermatogénese, a regulação da função dos órgãos reprodutores e a promoção e manutenção das características sexuais secundárias. Nas mulheres, as principais fontes de testosterona são os ovários e as glândulas suprarrenais. A determinação da testosterona sérica é útil no diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem as hormonas masculinas, nomeadamente, hipogonadismo primário e secundário e disfunção erétil, nos homens; e a síndrome dos ovários poliquísticos e hiperplasia adrenal, nas mulheres (24,63).

O ensaio para a determinação da testosterona é realizado por quimioluminescência, através de imunoensaio competitivo (63). Os respetivos valores de referência estão descritos na Tabela 25.

Tabela 25: Valores de referência relativos à Testosterona no soro/plasma.

| Analito | Valores de Referência no Soro/Plasma (ng/mL) | | |
|--------------|--|---------------|------------------|
| | Género Feminino | | Género Masculino |
| Testosterona | Pré-Menopausa | Pós-Menopausa | |
| | 12,09-59,46 | < 48,93 | 86,50-788,20 |

Gonadotrofina Coriónica Humana

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma glicoproteína produzida pelas células da placenta, estando envolvida na conservação do corpo lúteo durante a gravidez. A sua deteção pode ser feita 1 semana após a conceção, aumentando exponencialmente até ao final do primeiro trimestre. Cerca de 12 semanas após a conceção, a concentração da hCG começa a diminuir. Assim, a determinação da hCG constitui uma ferramenta útil na deteção de gravidez, incluindo uma gravidez ectópica (64).

O ensaio para a determinação da hCG é realizado por quimioluminescência, através de imunoensaio do tipo *sandwich* (64). Os respetivos valores de referência estão descritos na Tabela 26.

Tabela 26: Valores de referência relativos à hCG no soro.

| Analito | Valores de Referência |
|---------|-----------------------|
| | Soro (UI/L) |
| hCG | < 7,0 |

K. Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais podem ser definidos como “qualquer substância de carácter bioquímico, produzida ou induzida pela célula neoplásica, que possa refletir o seu crescimento, a sua atividade, permitindo conhecer a presença, evolução ou resposta terapêutica de um tumor maligno” (65). Estes marcadores são potencialmente úteis no rastreio, confirmação de diagnóstico, prognóstico, monitorização de terapêutica e avaliação ou deteção precoce de recidivas. Atualmente, nenhum dos marcadores disponíveis reúne todas as condições ideais de

sensibilidade e especificidade, pelo que, a sua análise deve ser sempre complementada as informações clínicas e outros testes (21,65).

O ensaio para a determinação dos marcadores tumorais mencionados abaixo realiza-se por quimioluminescência, através de imunoensaio do tipo *sandwich*.

Antigénio Específico da Próstata

O antigénio específico da próstata (PSA), uma glicoproteína produzida principalmente pelas células epiteliais da próstata, tem sido amplamente utilizado na monitorização da recorrência após terapêutica e na resposta à terapêutica em indivíduos com cancro da próstata (24). Contudo, também podem ser observados níveis elevados de PSA em condições benignas como a hiperplasia benigna da próstata e a prostatite, pelo que, não é recomendável a sua determinação isolada como procedimento de diagnóstico (27,66). A medição de PSA em conjunto com o exame retal e ultrassom fornecem um método mais adequado para a deteção do cancro da próstata (66).

Os valores de referência relativos ao PSA total estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27: Valores de referência relativos ao PSA total no soro.

| Analito | Valores de Referência | |
|---------|-----------------------|--|
| | Soro (ng/mL) | |
| PSA | < 4,0 | |

Antigénio Carcino-Embrionário

O antigénio carcino-embrionário (CEA) é uma glicoproteína, normalmente produzida pelo feto, mas também por alguns tumores. O aumento dos níveis deste marcador está associado ao cancro colorretal e a outras neoplasias, como cancro da mama, do pulmão, do ovário, do fígado e do pâncreas. No entanto, os níveis de CEA também podem estar elevados em indivíduos com patologias não malignas, especialmente em indivíduos mais idosos ou fumadores. Assim, a determinação dos níveis de CEA torna-se uma ferramenta útil no prognóstico, na recorrência de tumores após remoção e na avaliação da eficácia da terapêutica (67).

Os valores de referência relativos ao CEA estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28: Valores de referência relativos ao CEA no soro.

| Analito | Valores de Referência | |
|---------|-----------------------|-----------|
| | Soro (ng/mL) | |
| CEA | Não Fumadores | Fumadores |
| | < 2,5 | < 5,0 |

5.1.3. Análise Sumária da Urina

A análise sumária da urina constitui uma ferramenta auxiliar na avaliação da função renal, uma vez que permite o diagnóstico de condições urológicas como infeções do trato urinário (38,68). Por outro lado, fornece informações revelantes para o diagnóstico de patologias sistémicas, nomeadamente, da diabetes *mellitus*, necrose tubular aguda e piolonefrite. A análise sumária da urina permite dessa forma determinar se as alterações verificadas estão relacionadas especificamente com a função renal ou se são indicativas de condições sistémicas (21).

As principais três etapas da análise sumária da urina são os exames físico, químico e microscópico do sedimento urinário. De modo geral, o exame físico permite detetar a cor e o aspecto da urina, enquanto o exame químico permite determinar a densidade, pH, proteínas, glucose, corpos cetónicos, esterase leucocitária, nitritos, bilirrubina, urobilinogénio e hemoglobina (21). O exame químico pode ser realizado com recurso a tiras testes, que são tiras revestidas com diferentes bandas de reagentes direcionadas aos diferentes analitos e ao entrarem em contacto com a urina pode ocorrer mudança de cor que é comparada com uma tabela de cores padrão (21,27). Por último, o exame microscópico do sedimento urinário permite identificar a presença de células (por exemplo, células epiteliais, bactérias, leveduras, eritrócitos ou leucócitos), cilindros e cristais (21).

Para realizar a análise sumária da urina, a amostra preferencial para ser analisada é a primeira urina da manhã, uma vez que corresponde à amostra mais concentrada devido a estar retida na bexiga durante a noite (27).

No Laboratório Central SYNLAB, o exame sumário da urina realiza-se no equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System, da Siemens Healthineers (Figura 3), que constitui um sistema automatizado de elevada precisão e eficiência. Este equipamento é composto por dois módulos: o CLINITEK Novus® e o Atellica™ UAS 800.



Figura 4: Equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System, da Siemens Healthineers. [Carla Narciso, 2021]

O analisador CLINITEK Novus® apresenta uma tecnologia de tiras teste, que utiliza uma câmara colorida com LEDs para capturar o espectro de cores completo para detetar as mudanças de cor para cada parâmetro. Ademais, o módulo também tem sensores óticos, que por refratometria, permite determinar o aspeto e a densidade da amostra. Por sua vez, o analisador Atellica™ UAS 800 é um analisador de sedimento urinário completamente

automatizado com um sistema de imagem de microscopia digital com um mecanismo de foco duplo para gerar imagens nítidas (69).

A. Exame Físico

Cor

A cor normal da urina varia entre o amarelo-pálido e o amarelo-escuro como resultado do pigmento urobilina. A intensidade da cor depende da concentração urinária (38). Existem várias causas que podem resultar numa cor anormal da urina, estando as mais frequentes descritas na Tabela 29.

Tabela 29: Causas mais frequentes da coloração anormal da urina. [Adaptado de 38]

| Cor | Causa |
|--------------------------|--|
| Rosa, vermelho, castanho | Glóbulos vermelhos, hemoglobina, consumo de beterraba e rifampicina. |
| Amarelo, laranja | Bilirrubina, vitaminas e fenazopiridina. |
| Roxo | Porfíria. |
| Branco | Cristais, leucócitos e lípidos. |
| Preto, castanho | Melanina e contaminação fecal. |
| Verde | Infeção por <i>Pseudomonas</i> spp.. |

Aspeto

O aspeto avalia a transparência/turvação da urina. Geralmente, o aspeto normal da urina é límpido, no entanto, um aspeto turvo pode ser indicativo de infeções bacterianas do trato urinário devido à presença de leucócitos, por exemplo. Por outro lado, a turvação pode ser resultado de contaminação por secreções vaginais, material fecal, cristais, células epiteliais, entre outros (38,41).

Densidade

A densidade específica corresponde à razão entre a densidade de uma solução e a densidade da água destilada, nas mesmas condições. Como tal, a densidade de uma amostra indica a concentração das substâncias químicas dissolvidas na amostra (38,41). O intervalo normal para a urina é de 1,005 a 1,030 (38).

A densidade diminuída pode ocorrer na diabetes *insipidus*, na pielonefrite, glomerulonefrite, entre outros. Por sua vez, um aumento da densidade ocorre em casos de desidratação, insuficiência adrenal, hepatopatia e insuficiência cardíaca (41).

B. Exame Químico

pH

A medição do pH da urina tem um papel importante na avaliação do equilíbrio ácido-base e na interpretação de cristais urinários presentes na amostra. O pH da urina pode variar entre os 4,6 e 8,0 (38,41). As medições deste parâmetro devem ser realizadas em amostras frescas, uma vez que, a urina tem tendência a tornar-se alcalina ao ficar em repouso (27).

As urinas ácidas estão associadas, por exemplo, à ingestão de proteínas na dieta e a acidose metabólica. As urinas alcalinas, por sua vez, estão associadas a uma dieta vegetariana, alcalose metabólica ou a infeções bacterianas do trato urinário (38,41).

Proteínas

As proteínas de baixa massa molecular são filtradas pelo glomérulo e depois reabsorvidas, pelo que, a presença de uma quantidade aumentada de proteína na urina é, geralmente, o primeiro indicador de patologia renal. A excreção normal de proteínas na urina não excede a 150mg por dia. A proteinúria pode ser causada por um aumento da quantidade de proteínas plasmáticas filtradas ou pela diminuição da capacidade de reabsorção dos túbulos renais (70).

Glucose

A detecção de glucose na urina ocorre quando a concentração plasmática de glucose ultrapassa o limiar renal de 160 a 180 mg/dL e, conseqüentemente, a sua quantidade no ultrafiltrado excede a capacidade de reabsorção dos túbulos, resultando em glicosúria. A glicosúria pode ser causada por uma condição pré-renal (hiperglicemia) ou por uma condição renal (defeito na absorção tubular). A diabetes *mellitus* é uma patologia que causa hiperglicemia e glicosúria, pelo que, a determinação deste parâmetro torna-se importante na detecção e monitorização do indivíduo diabético (70).

Corpos Cetónicos

Os corpos cetónicos são produtos intermediários do metabolismo dos ácidos gordos que incluem o ácido acetoacético, o ácido β -hidroxibutírico e a acetona. A sua detecção na urina ocorre em casos de diabetes *mellitus* descompensada, jejum prolongado ou durante a gravidez. É de salientar que as tiras teste detetam o acetoacetado através da reação com o nitroprussiado de sódio, em meio alcalino, mas não detetam a acetona e o ácido β -hidroxibutírico. Assim, um resultado negativo não exclui a possibilidade de um caso de cetoacidose (38,70).

Urobilinogénio

O urobilinogénio é produzido no metabolismo da bilirrubina por ação das bactérias intestinais, sendo que a maior parte é reabsorvida e excretada pela bÍlis. Nesse sentido, em caso de patologia hepática ou hemólise, a função hepática pode ser sobrecarregada e o urobilinogénio ser detetado na urina (38).

Bilirrubina

A bilirrubina não é detetada na urina de indivíduos saudáveis. Contudo, a bilirrubinúria pode ocorrer em patologias hepatocelulares e em obstruções pós-hepáticas dos ductos biliares (70).

Nitritos

A determinação de nitritos na urina permite identificar a presença de bactérias redutoras de nitratos, uma vez que, se estas estiverem presentes convertem o nitrato urinário naturalmente presente em nitrito, que não está normalmente presente na urina (38,70). Contudo, a demora na medição está associada a resultados falso positivos (38).

Esterase Leucocitária

A presença de leucócitos na urina é detetada a partir da esterase leucocitária que está presente em neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, mas está ausente nos linfócitos. Um

resultado positivo pode ser observado em situações de infecção do trato urinário, nefrite intersticial ou outras condições inflamatórias (38).

Hemoglobina

A hemoglobina é medida na tira teste através da sua atividade de peroxidase, que catalisa a oxidação de um composto cromogénico cujo produto final é um composto corado. A tira teste é muito sensível à presença de sangue na urina, conseguindo detetar níveis de hemoglobina superiores a 0,015 mg/dL (38). A hemoglobinúria pode ocorrer em qualquer condição que resulte em hemólise intravascular (70).

C. Exame Microscópico do Sedimento Urinário

Células Epiteliais

No sedimento urinário podem ser observados vários tipos de células epiteliais, sendo que algumas dessas células são resultantes do processo de renovação celular, enquanto outras podem representar dano epitelial causado por condições inflamatórias ou patologias renais. A observação de células epiteliais com características morfológicas anormais pode ser indicativa de neoplasia do trato geniturinário ou pode ser consequente de tratamentos, como quimioterapia (70).

As principais células epiteliais observadas no sedimento urinário são células epiteliais escamosas, células epiteliais transicionais (uroteliais) e células tubulares renais. As células mais comuns são as células epiteliais escamosas que se caracterizam por serem células grandes com um núcleo pequeno. A presença de grandes quantidades destas células no sedimento urinário indica, muitas das vezes, contaminação vaginal ou perineal e geralmente não apresentam significado clínico. As células epiteliais transicionais podem ser arredondadas, ovais ou retangulares e são mais pequenas que as células epiteliais escamosas com um núcleo denso. Estas podem estar presentes no sedimento urinário de indivíduos saudáveis devido à descamação do epitélio e podem estar em maior quantidade em infeções e inflamações do trato urinário. Este aumento juntamente com uma morfologia anormal pode ser indicativo de carcinoma das células epiteliais de transição (70). Por fim, as células tubulares renais são células que apresentam um núcleo grande, podendo ser arredondadas ou retangulares. Geralmente, este tipo de células é observado em patologias renais como necrose tubular aguda, glomerulonefrite e nefrite intersticial aguda (38).

Leucócitos

A presença de leucócitos na urina requer interpretação clínica, contudo, pode ser observada em situação de infeções do trato urinário, glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial, entre outras. Os leucócitos mais prevalentes na urina são os neutrófilos, com diâmetro de 7 a 13 µm, citoplasma granular e núcleo segmentado (38).

Eritrócitos

Os eritrócitos apresentam a forma de disco bicôncavo com um diâmetro de 4 a 7 µm e sem núcleo. Podem ser isomórficos ou dismórficos, com forma ou tamanho diferentes. Os eritrócitos isomórficos estão associados a hematuria não glomerular, enquanto os eritrócitos dismórficos estão associados a alterações no pH, osmolaridade e concentração de proteínas, podendo não ser indicativas de patologia renal. No entanto, a presença de esquisócitos, *knizocytes* e codócitos está associada a patologias renais (38).

Cristais

A presença de cristais em amostras de urina é comum, resultando da precipitação de solutos urinários e podendo apresentar estruturas geométricas bem definidas ou material amorfo. A sua formação é influenciada por fatores como a temperatura, a concentração de solutos na urina, o pH e o fluxo urinário através dos túbulos. Em urinas ácidas podem ser encontrados cristais de oxalato de cálcio, ácido úrico, cistina, tirosina, leucina e cristais de uratos amorfos. Por sua vez, em urinas alcalinas podem estar presentes cristais de fosfato de cálcio, fosfato triplo e fosfatos amorfos. A presença de cristais normais em elevado número ou a presença de cristais patológicos (cristais de colesterol, cistina, tirosina e leucina) é clinicamente significativo (38,70).

Cilindros

Os cilindros são estruturas tubulares, formadas nos túbulos renais e compostas pela mucoproteína Tamm-Horsfall e podem conter outros elementos presentes no filtrado (38,70). A presença de certos cilindros está fortemente relacionada com a presença de patologias renais (38). Os cilindros são classificados de acordo com a composição da sua matriz e nos elementos incorporados na mesma. Existem vários tipos de cilindros, sendo que podem ser hialinos ou conter inclusões de grânulos, células ou lípidos. Os mais comuns são os cilindros hialinos (70).

Bactérias e Elementos Leveduriformes

Geralmente, a urina é estéril, isto é, não estão presentes microrganismos. Consequentemente, a presença de bactérias ou elementos leveduriformes na urina pode ser indicativo de infecção ou de contaminação durante o processo de colheita (70).

5.2. Imunologia

A Imunologia é o ramo da ciência que estuda a defesa do organismo perante doenças infecciosas, envolvendo o estudo das moléculas, células, órgãos e sistemas responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de substâncias estranhas, bem como a respetiva resposta (71).

O presente capítulo tem como objetivo abordar algumas das técnicas utilizadas na secção de Imunologia do Laboratório Central SYNLAB Lisboa, nomeadamente o ensaio imunoenzimático (ELISA), eletroforese de proteínas e imunofixação sérica e urinária.

5.2.1. ELISA

O Ensaio Imunoenzimático, também designado como ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), é utilizado para a detetar antígenos ou anticorpos específicos, através de uma reação enzimática com produção de cor, presentes numa dada amostra biológica. Esta determinação pode ser quantitativa ou semiquantitativa (72,73). Atualmente, o ensaio imunoenzimático pode ser realizado por quatro técnicas diferentes: ELISA direta, indireta, do tipo *sandwich* e competitiva (72). Na secção de imunologia do Laboratório Central SYNLAB Lisboa, apenas são realizados os métodos de ELISA indireta e do tipo *sandwich*.

O método de ELISA indireto é o método mais adequado para determinar a concentração total de anticorpos presentes nas amostras(74). Neste método, o antígeno purificado está imobilizado nos poços da microplaca (fase sólida). Num primeiro passo, as amostras diluídas são incubadas nos poços e, se a amostra for positiva, os anticorpos específicos (anticorpos primários) ligam-se aos antígenos presentes na fase sólida. Na etapa seguinte, adiciona-se um anticorpo secundário, específico para o anticorpo primário, conjugado com uma enzima (conjugado enzimático). Após incubação com o substrato apropriado, a enzima converte-o num produto final com cor mensurável (72,73). O método de ELISA indireto apresenta maior sensibilidade, uma vez que, cada anticorpo primário dispõe vários epítomos que se podem ligar ao anticorpo secundário marcado, permitindo a amplificação do sinal (72,74). É, ainda, de referir que este método oferece maior flexibilidade, devido aos diferentes anticorpos primários poderem ser utilizados com um único anticorpo secundário marcado enzimaticamente (74).

O método de ELISA do tipo *sandwich* é mais utilizado para analisar amostras complexas porque o antígeno não precisa de ser purificado antes da realização do ensaio. Este método utiliza anticorpos de captura e deteção, sendo cada anticorpo específico para um epítipo diferente do antígeno. Nesse sentido, os poços da microplaca são revestidos com anticorpos de captura e, caso o antígeno esteja presente na amostra, este ligar-se-á. Depois da adição da amostra, segue-se a adição dos anticorpos de deteção, que estão enzimaticamente marcados. Por fim, com a adição do substrato apropriado, dá-se uma reação enzimática com produção de cor. A principal vantagem deste método de ELISA é a sua elevada sensibilidade, sendo que também apresenta alta especificidade, visto que são utilizados dois anticorpos para detetar o antígeno (74).

Em ambos os métodos, a intensidade da cor do produto resultante da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de anticorpos ou antígenos presentes na amostra. Esta intensidade por ser convertida em concentração, através de uma curva de calibração, nos testes quantitativos; ou numa razão, nos testes semiquantitativos (73). Os controlos positivo e

negativo são sempre incluídos na realização de cada teste, atuando como controlos internos para a fiabilidade do procedimento (75).

A diluição das amostras bem como a execução das técnicas acima mencionadas, são realizadas de forma automática pelo equipamento EUROIMMUN Analyzer I-2P, presente na Figura 5.

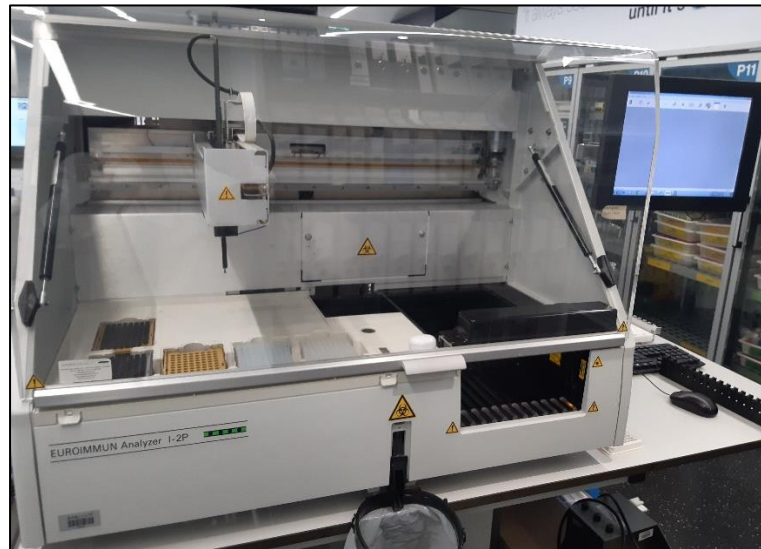


Figura 5: Equipamento EUROIMMUN Analyzer I-2P. [Carla Narciso, 2021]

Na secção de imunologia da SYNLAB faz-se a análise de vários parâmetros por estes métodos de ELISA, nomeadamente, a pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydia trachomatis* (IgG, IgM e IgA), anticorpos anti-*Helicobacter pylori* (IgG e IgA), anticorpos anti-*Mycoplasma pneumoniae* (IgG e IgM), anticorpos anti-SARS-CoV-2 (IgA), anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (IgG e IgM), anticorpos anti-dsDNA (IgG), entre outros.

5.2.2. Eletroforese de Proteínas

A eletroforese de proteínas séricas e de outros líquidos biológicos humanos constitui uma análise muito útil na deteção de anomalias no perfil proteico (76). Esta é uma técnica simples, rápida e sensível que permite a separação de moléculas proteicas carregadas quando são sujeitas a um campo elétrico (77).

Nesse âmbito, a eletroforese de proteínas séricas e urinárias é executada, principalmente, para investigar a suspeita de uma gamapatia monoclonal (78). As gamopatias monoclonais constituem condições caracterizadas pela proliferação de um único clone de células plasmáticas, geralmente maligno, produzindo uma única classe de imunoglobulinas intactas, cadeias pesadas, cadeias leves livres ou uma combinação entre estes componentes. Estas proteínas são conhecidas como paraproteínas ou proteínas M e podem ser detetadas no soro, na urina ou em ambos (79).

No Laboratório Central SYNLAB Lisboa, a eletroforese de proteínas é executada no equipamento semiautomático HYDRASYS 2 Scan Focusing, da Sebia (Figura 6). Este equipamento permite a separação, em meio alcalino (pH 9,1), das proteínas humanas no soro e na urina em cinco frações principais, por eletroforese em gel de agarose (76).



Figura 6: Equipamento HYDRASYS 2 Scan Focusing, da Sebia. [Carla Narciso, 2021]

A eletroforese de proteínas é baseada no princípio da eletroforese de zona (76), que consiste na separação de macromoléculas, com diferentes cargas elétricas e massas moleculares, num meio de suporte poroso como o gel de agarose (27). A um pH de 9,1, as proteínas (incluindo as γ -globulinas) apresentam carga negativa (80). A amostra de soro ou urina é aplicada no gel de agarose e, posteriormente, é aplicada uma corrente elétrica, que origina a migração das proteínas presentes na amostra na direção do ânodo, de acordo com a sua carga elétrica e massa molecular (81). As proteínas são separadas em cinco frações de diferente mobilidade: albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas (Figura 7). Estas diferentes frações são compostas por uma ou mais proteínas (76), estando descritas na Tabela 30.

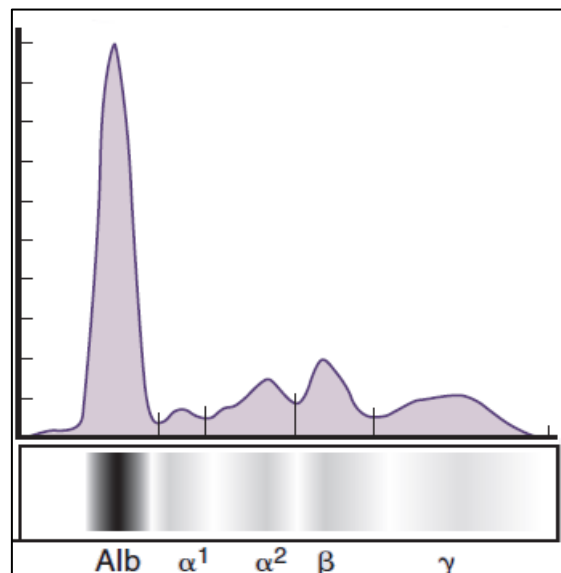


Figura 7: Representação de um perfil normal de eletroforese de proteínas no soro. [Adaptado de 82]

Tabela 30: Principais proteínas de cada uma das frações eletroforéticas e respectivos valores de referência.

| Fração Eletroforética | Proteínas | Valores de Referência (%) |
|-----------------------|---|---------------------------|
| Albumina | Albumina | 53,8-65,2 |
| α 1-globulinas | α 1-antitripsina α -fetoproteína α 1-glicoproteína ácida | 1,1-3,7 |
| α 2-globulinas | α 2-macroglobulina Haptoglobina Ceruloplasmina α -lipoproteína | 8,5-14,5 |
| β -globulinas | Transferrina β -lipoproteína Complemento C3 | 8,6-14,8 |
| γ -globulinas | IgG, IgA, IgM, IgD, IgE | 9,2-18,2 |

Após a separação das proteínas, o gel resultante é corado com negro de amido e os proteinogramas podem ser analisados visualmente, de forma a determinar possíveis alterações no perfil, ou por densitometria, através da quantificação relativa e precisa de cada fração individual (76).

5.2.3. Imunofixação

A técnica de imunofixação permite a detecção de proteínas monoclonais presentes no soro ou na urina humanos. Inicialmente, as imunoglobulinas monoclonais são detetadas por eletroforese das proteínas, apresentando-se sob a forma de bandas anormais situadas, essencialmente, nas zonas das beta ou gama globulinas. A imunofixação vai permitir a identificação da natureza dessas bandas monoclonais, através da utilização de antissoros monoespecíficos. Esta é uma técnica simples, rápida e de fácil interpretação (83).

De modo a identificar a natureza das bandas monoclonais de forma precisa, as amostras são testadas simultaneamente em seis pistas. A pista ELP é utilizada como referência, uma vez que, apresenta o perfil eletroforético das proteínas da amostra. As cinco pistas restantes permitem a caracterização das bandas monoclonais através de anticorpos específicos (83). Para a realização da imunofixação, é utilizado o sistema semiautomático HYDRASYS, da Sebia (Figura 8).



Figura 8: Equipamento HYDRASYS, da Sebia. [Carla Narciso, 2021]

A técnica realiza-se em quatro etapas. A primeira etapa consiste na separação das proteínas por eletroforese em gel de agarose, em meio alcalino (pH 9,2), que são posteriormente fixadas e imunoprecipitadas com antissoros de especificidades diferentes. As proteínas não precipitadas são removidas do gel por lavagem e absorção com papel de filtro, enquanto as proteínas precipitadas ficam retidas no interior da matriz do gel sendo depois coradas com violeta ácido (83).

A. Imunofixação Sérica

A preparação das amostras de soro envolve a sua diluição, com diluente, de modo a evitar fenómenos de zona por excesso de antígeno. Na pista imunológica G utiliza-se uma diluição de 1:6, enquanto nas restantes pistas a diluição é de 1:3. Os antissoros específicos aplicados na imunofixação sérica são os antissoros anti-cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM) e antissoros anti-cadeias leves κ e λ (livres e ligadas) (83).

Uma amostra de soro normal caracteriza-se pela presença de uma zona corada difusa de imunoglobulinas policlonais em todas as pistas. Por sua vez, na presença de uma imunoglobulina monoclonal (gamapatia) observa-se uma banda estreita detetada com um dos antissoros anti-cadeias pesadas (γ , α ou μ) e com um dos antissoros anti-cadeias leves (κ ou λ), sendo que esta banda deve estar localizada ao mesmo nível de migração que banda presente na pista de referência ELP. A ausência de reação com qualquer dos antissoros anti-cadeias pesadas acompanhada pela reação com um dos antissoros anti-cadeias leves pode ser indicativo da presença de uma cadeia leve livre ou de uma gamapatia de IgD ou IgE. Por sua vez, a não reação com qualquer um dos antissoros anti-cadeias leves acompanhada pela reação de um dos antissoros anti-cadeias pesadas pode ser indicativo de uma gamapatia de cadeias pesadas, muito rara (83). Na Figura 9 estão representados vários exemplos de imunofixações séricas em gel de agarose.

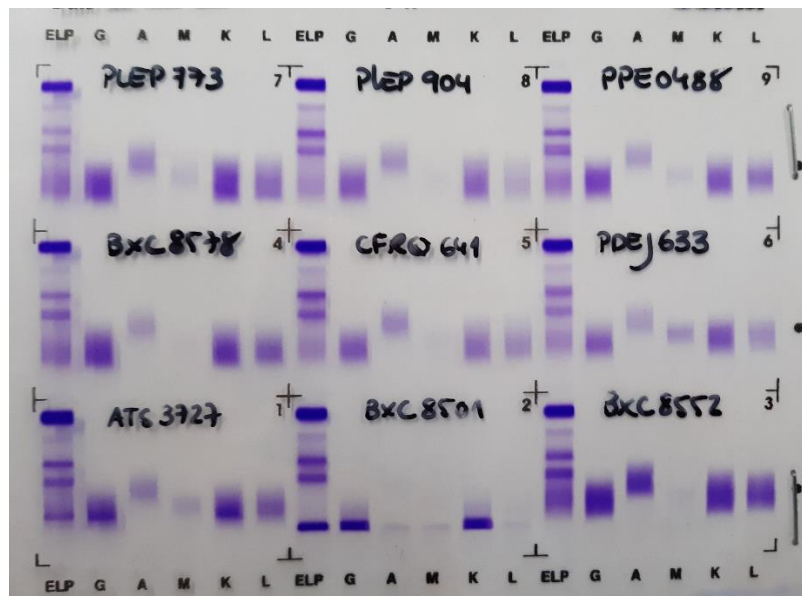


Figura 9: Exemplos de imunofixação sérica em gel de agarose. [Carla Narciso, 2021]

B. Imunofixação urinária

A imunofixação urinária pode ser utilizada para detectar componentes monoclonais, mas também para pesquisar e identificar a proteína de Bence Jones (BJP) na urina. As proteínas de Bence Jones são cadeias leves livres, que quando produzidas em excesso são excretadas na urina, devido à saturação da capacidade de absorção tubular. A produção destas cadeias pode acontecer nas gamopatias monoclonais, sendo que a sua detecção urinária constituiu uma parte da investigação destas patologias (84).

As amostras de urina para imunofixação devem ser concentradas, através de centrifugação, sempre que a proteinúria for inferior a 50mg/dL. Os antissoros específicos aplicados na imunofixação urinária são o antissor trivalente anti-cadeias pesadas γ (IgG), α (IgA) e μ (IgM), antissoros anti-cadeias leves κ e λ (livres e ligadas) e antissoros anti-cadeias leves livres κ e λ (85).

A presença de uma proteína de Bence Jones caracteriza-se pela presença de uma banda monoclonal detetada com um dos antissoros anti-cadeias leves (livres e ligadas) e de uma banda monoclonal, que migrou ao mesmo nível da anterior, detetada com um dos antissoros anti-cadeias leves livres κ e λ , na ausência de uma banda na pista do antissor trivalente. No entanto, pode observar-se a presença de uma paraproteína do soro eliminada na urina, sem estar presente uma proteína de Bence Jones. Essa situação é caracterizada por uma banda monoclonal detetada com o antissor trivalente e uma banda monoclonal, que migrou ao mesmo nível da anterior, detetada com um dos antissoros anti-cadeias leves (livre e ligada), na ausência de banda na pista do antissor anti-cadeia leve livre correspondente (85).

5.3. Patologia Molecular

Na secção de Patologia Molecular realiza-se a pesquisa de DNA/RNA de microrganismos para o diagnóstico e orientação de tratamento de patologias, a partir de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

De acordo com o artigo 19.º da Portaria n.º 166/2014 de 21 de agosto, a secção de patologia molecular está organizada de forma a evitar a contaminação e a garantir a sequência do processo. Nesse sentido, estão definidas áreas laboratoriais onde se executam atividades distintas. O fluxo de trabalho inicia-se na zona de triagem de amostras, onde é realizada a receção e processamento de amostras. Depois, a sala de extração de ácidos nucleicos e a sala de pré-amplificação (dividida numa zona para preparação de reações de amplificação e outra zona de adição do DNA/RNA para amplificação enzimática). Por fim, existe uma sala de amplificação e a sala de pós-amplificação, para eventual manipulação de produtos amplificados.

No Laboratório Central SYNLAB Lisboa, realiza-se a pesquisa de DNA e RNA de diferentes microrganismos, entre os quais: Hepatite B (HBV), Hepatite C (HCV), HIV, Herpes Simplex (HSV), *Mycobacterium*, Parainfluenza (1, 2, 3 e 4), Coronavírus, entre outros. No entanto, no presente capítulo, será abordado a processamento de amostras para pesquisa de SARS-Cov-2 pelo equipamento Alinity M, da Abbott.

5.3.1. COVID-19

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, que surgiu no final de 2019 em Wuhan, na China, e que se disseminou rapidamente por outros países do mundo. Por esse motivo, este surto foi declarado como uma pandemia global a 11 de março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde (86).

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae* e apresenta um genoma de RNA (+) de cadeia simples. A sua transmissão pode ocorrer de forma direta, através da disseminação de gotículas respiratórias, ou de forma indireta, envolvendo o contacto com superfícies contaminadas (87).

O diagnóstico da COVID-19 pode ser feito através de métodos moleculares como a técnica da Transcriptase Reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase - RT-PCR. Esta técnica permite a deteção do SARS-CoV-2 em amostras respiratórias, por meio da amplificação do seu material genético (RNA) (88).

A. Princípio da Polymerase Chain Reaction (PCR) e Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A *Polymerase Chain Reaction*, também chamada de PCR, foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983 e permite amplificar uma sequência específica de DNA a partir de uma pequena quantidade de material inicial.

A técnica de PCR envolve três etapas: desnaturação, hibridação com *primers* e extensão, sendo que o produto resultante de cada etapa serve de modelo para as etapas seguintes de modo a permitir uma amplificação exponencial do alvo. Esta técnica utiliza uma mistura reacional composta pelo eluído de DNA alvo, a Taq polimerase e respetivo tampão de reação, *primers* e

quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), que será submetida a vários ciclos de diferentes temperaturas num termociclador (89).

Na primeira fase, desnaturação, ocorre a separação da cadeia dupla de DNA através do aumento da temperatura (94°C). A temperatura provoca a quebra das pontes de hidrogénio entre as duas cadeias de ácidos nucleicos, originando DNA de cadeia simples (89).

De seguida, o segundo passo é a hibridação que acontece a uma temperatura entre 40 e 70°C. A diminuição da temperatura permite a reconstituição das ligações de hidrogénio e, assim, as cadeias complementares hibridam com os *primers*. Os *primers* são DNAs de cadeia simples complementares às cadeias opostas das cadeias alvo de DNA, que vão flanquear a sequência que se quer amplificar, permitindo uma replicação seletiva (89).

Na fase de extensão, ocorre a síntese da cadeia complementar através de um DNA polimerase (Taq polimerase), à temperatura de 72°C – temperatura de atividade máxima da enzima. A DNA polimerase reconhece o local de ligação dos primers nas sequências de DNA alvo, ligando-se nas suas extremidades 3'. A síntese ocorre exclusivamente no sentido 5'-3', utilizando os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) presentes na mistura reacional. Cada ciclo duplica, teoricamente, a quantidade de DNA presente no ciclo anterior (89).

No caso do SARS-CoV-2, cujo material genético é composto por uma cadeia simples de RNA, é necessária uma etapa adicional de conversão de RNA em DNA complementar (cDNA), uma vez que, a PCR usa apenas DNA como molde. Esta etapa denomina-se transcrição reversa e é realizada por uma DNA polimerase RNA-dependente, a Transcriptase Reversa, dando origem à denominação desta variação da técnica de PCR, a *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, ou RT-PCR (90).

A PCR em tempo real (real time PCR ou q-PCR) é uma variação da técnica de PCR convencional, que permite monitorizar a amplificação do produto em tempo real através da deteção de um sinal fluorescente (91). É uma técnica que apresenta grande sensibilidade e especificidade, constituindo um método preferencial para a deteção e quantificação rápida de ácidos nucleicos em amostras biológicas (92).

B. Triagem de Amostras

De acordo com a Orientação n.º 15/2020 da Direção Geral da Saúde, para o diagnóstico laboratorial de SARS-CoV-2 devem ser usadas como amostras, produtos biológicos do trato respiratório superior e/ou inferior. Para fins de estudo e investigação, estes podem ser complementados por colheita de sangue ou outros produtos biológicos (93).

As amostras recebidas no laboratório são, maioritariamente, amostras do trato respiratório superior, como o exsudado nasofaríngeo e o exsudado orofaríngeo. Ambos os exsudados, são colhidos com zaragatoa e, posteriormente, colocadas em meio de transporte para vírus. O acondicionamento e transporte destes produtos biológicos deve ser feito utilizando o sistema de embalagem tripla (contentor primário que contém o produto biológico; contentor secundário para acondicionar o contentor primário; e contentor exterior para embalagem de transporte externa) (93).

Quando chegam ao Laboratório Central SYNLAB Lisboa, as amostras são encaminhadas para a secção de Patologia Molecular, onde é feita a sua triagem manual de

acordo com a sua origem e urgência. Posteriormente, são feitas listas de trabalho para serem encaminhadas para inativação e processamento. Na secção de Patologia Molecular existem diferentes equipamentos para o processamento das amostras, mas neste relatório será apenas abordado o equipamento Alinity m, da Abbott.

C. Inativação de Amostras

Após a triagem e separação das amostras, segue-se a inativação das amostras para pesquisa de SARS-CoV-2 antes do seu processamento nos equipamentos. Este processo permite inativar o potencial infeccioso das amostras biológicas (94).

A inativação é um processo que promove a destabilização da estrutura viral através do uso de condições altamente desnaturantes, eliminando nucleases celulares e mantendo a estrutura do RNA viral para o posterior processamento. Para tal, pode utilizar-se soluções de lise, normalmente fornecidas pela maioria dos kits de extração de RNA (94). Este procedimento deve ser realizado em laboratório de biossegurança de nível 2 (BSL2) com recurso de uma câmara de segurança biológica de classe II (93).

D. Processamento de amostras

Na secção de Patologia Molecular do Laboratório Central SYNLAB Lisboa, um dos equipamentos utilizados para a deteção de RNA do SARS-CoV-2 é o Alinity m, da Abbott (Figura 10). Trata-se de um equipamento automático que realiza a deteção molecular a partir de amostras biológicas, permitindo a deteção quantitativa e qualitativa de sequências de ácido nucleico para fins de diagnóstico. No caso da pesquisa de SARS-CoV-2, é usado um ensaio de rRT-PCR de alvo duplo para os genes *RdRp* e *N* do vírus (95).



Figura 10. Equipamento Alinity m, da Abbott. [Adaptado de 96]

A preparação da amostra é efetuada automaticamente pelo equipamento e permite extrair e concentrar as moléculas dos ácidos nucleicos alvo, de modo a facilitar a amplificação e remover possíveis inibidores. Nesta etapa, é introduzida, em cada amostra, uma sequência não relacionada à sequência alvo (RNA do gene reductase hidroxipiruvato da abóbora,

Cucurbita pepo), que é simultaneamente amplificada e, por isso, utilizada como controle interno para demonstrar a correta execução do processo para cada amostra e controle (95,97).

As sequências alvo do SARS-CoV-2 e do controle interno são detetadas através do uso de sondas de oligonucleótidos, marcadas com fluoróforos, específicas do alvo. As duas sondas específicas do SARS-CoV-2 são marcadas com um fluoróforo distinto da sonda do controle, de modo a permitir a detecção simultânea de ambos os produtos amplificados (95).

É de salientar que são processados da mesma forma um controle positivo e um controle negativo, de forma a confirmar o desempenho do equipamento e do reagente (95).

Como explicado anteriormente, durante a amplificação, o RNA alvo é convertido em cDNA pela transcriptase reversa. Os *primers* reversos do SARS-CoV-2 e do controle interno emparelham com os respectivos alvos, ocorrendo a sua elongação durante um período de incubação prolongado. Um segundo *primer* liga-se à cadeia de cDNA e é alongado pela ação da DNA polimerase para criar produtos de DNA de cadeia dupla. A amplificação exponencial dos três alvos (SARS-CoV-2 RdRp, SARS-CoV-2 N e controle interno) é obtida através de ciclos repetidos de temperaturas altas e baixas, simultaneamente na mesma reação (95).

A detecção da fluorescência dos produtos de amplificação é feita em tempo real, à medida que as sondas do SARS-CoV-2 e do controle interno se ligam aos respectivos alvos. A fração fluorescente da sonda está ligada covalentemente à extremidade 5' e na extremidade 3' tem uma molécula supressora, pelo que, na ausência de sequências alvo, a fluorescência da sonda é suprimida (95).

E. Interpretação dos resultados

Os resultados dos testes de detecção qualitativa de ácidos nucleicos para SARS-CoV-2 são reportados como positivo ou negativo.

O Ct (do inglês, Cycle threshold) refere-se ao número de ciclos de amplificação necessários para ocorrer a detecção do sinal de fluorescência do RNA alvo. É o cruzamento deste valor limiar (cut-off) que define o resultado como positivo(98). Em cada ciclo de PCR, esse sinal é detetado e registado num gráfico de unidade relativa de fluorescência (RFU) em função do número de ciclos, representado na Figura 11 (99).

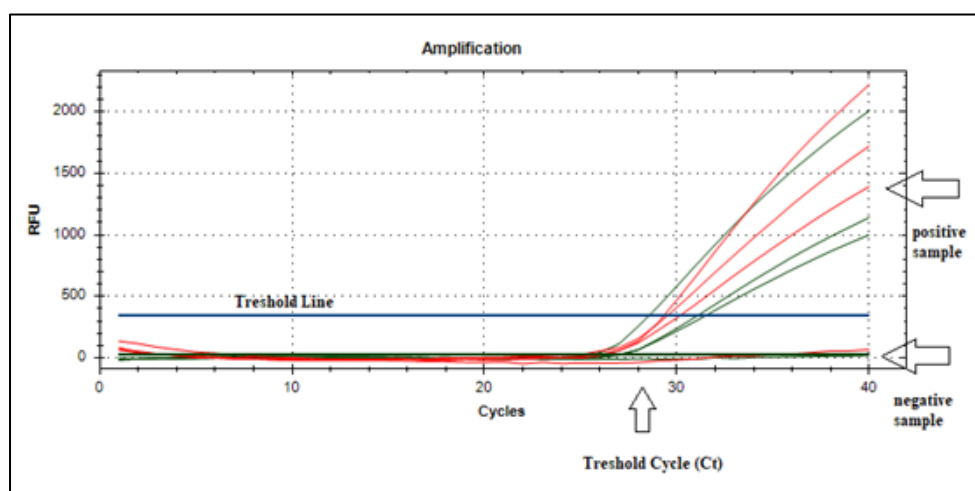


Figura 11: Gráfico de amplificação do método RT-PCR em tempo real [Adaptado de 99].

De acordo com a Norma n.º 004/2020, em vigor durante o período de estágio, todos os resultados de testes laboratoriais para SARS-CoV-2 devem ser notificados na plataforma SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) para investigação epidemiológica e implementação de medidas de prevenção e controlo (100).

6. Fase Pós-Analítica

A fase pós-analítica corresponde à etapa final do processo laboratorial e inclui a avaliação e interpretação dos resultados analíticos, a decisão da transmissão destes resultados, a preparação e emissão do boletim de resultados e a transmissão dos resultados ao utente ou ao médico (101).

É da responsabilidade dos Especialistas em Análises Clínicas ou em Patologia Clínica assegurar a exatidão da entrada dos resultados laboratoriais no boletim analítico e garantir a compatibilidade e a coerência do conjunto de resultados das análises efetuadas pelo utente, de acordo com a informação clínica disponível e resultados anteriores conhecidos (102).

O boletim de análises consiste no relatório dos exames laboratoriais executados e constitui o elemento fundamental na comunicação do laboratório clínico com o cliente. O boletim deve incluir a identificação do laboratório e do respetivo diretor técnico, a identificação do médico prescriptor, a identificação do especialista responsável pela validação biopatológica, a identificação inequívoca do utente em todas as páginas do relatório, a data e hora da emissão do relatório, a identificação clara e sem ambiguidades dos exames, resultados obtidos e valores de referência biológica ou de decisão clínica, o tipo de amostra biológica, o método laboratorial utilizado e a identificação dos exames realizados por laboratórios subcontratados. Quando aplicável, o boletim deve ainda conter comentários relativos à qualidade da amostra (como lipémica, hemolizada) ou outros comentários pertinentes na validação e interpretação dos resultados (102).

7. Controlo de Qualidade

O Despacho n.º 10009/2019, de 5 de novembro, define a qualidade como a “aptidão de um produto ou serviço para satisfazer as necessidades expressas ou implícitas do utilizador” (3). No contexto das Análises Clínicas, a qualidade laboratorial tem de assegurar a precisão dos resultados analíticos, bem como a credibilidade e fidedignidade de todas as partes integrantes do processo laboratorial, de modo a estes resultados poderem ser úteis em contexto clínico ou de saúde pública. Nesse sentido, a emissão de resultados imprecisos pode ter consequências muito significativas, nomeadamente, a realização de tratamentos desnecessários; tratamento não adequado ao utente; atraso no diagnóstico correto; e a execução de exames adicionais e desnecessários. Existe sempre algum nível de imprecisão associado, mas o objetivo é reduzir ao máximo esse nível (103). É essencial o desenvolvimento de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) para uma atividade adequada e para o correto exercício profissional do laboratório, de modo a alcançar o mais alto nível de precisão, credibilidade e desempenho de todos os processos e procedimentos laboratoriais (3,103).

No Laboratório SYNLAB Lisboa, a implementação, manutenção e melhoria do SGQ cumpre os requisitos das normas NP EN ISO 9001:2015 e NP EN ISO 15189:2014. Os processos técnicos são todos validados por sistemas de Controlo de Qualidade Interno (CQI) e pela Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), garantindo a qualidade da precisão e exatidão dos resultados obtidos, respetivamente (104).

7.1. Controlo de Qualidade Interno

O Controlo de Qualidade Interno é definido como o “conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico”. Em todos os parâmetros analíticos realizados no laboratório é indispensável o uso de CQI adaptado à especificidade de cada método (3). O objetivo do CQI compreende a deteção, avaliação e correção de erros devido a falhas dos sistemas analíticos, condições ambientais ou desempenho do operador (103).

No Laboratório SYNLAB Lisboa, todos os ensaios, acreditados ou não, são sujeitos a um controlo de qualidade que permita monitorizar os métodos e definir a precisão e incerteza analítica associada a cada ensaio. De salientar que os valores quantitativos são registados em cartas de controlo, por meio de um programa informático de gestão de dados de CQI (104).

7.2. Avaliação Externa da Qualidade

A Avaliação Externa da Qualidade permite a avaliação da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório executada por um organismo exterior (3). A participação em programas de AEQ permite avaliar o desempenho, por comparação do desempenho de um grupo de laboratórios de referência ou de um laboratório de referência; detetar erros sistemáticos; reconhecer as áreas que requerem melhoria; e identificar a necessidade de formação (103).

O Laboratório SYNLAB Lisboa participa em diversos programas de AEQ, como por exemplo, o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade PNAEQ, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e o *National External Quality Assessment Scheme* (NEQAS), do Reino Unido.

8. Conclusão

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, a realização do estágio laboratorial no Laboratório Central SYNLAB Lisboa permitiu a aplicação e consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo da vertente curricular. Por outro lado, este estágio permitiu ainda a integração no meio profissional, bem como o contacto com equipas multidisciplinares, tornando-o num complemento de aprendizagem.

O estágio possibilitou a aquisição de competências nas várias áreas analíticas das Análises Clínicas, nomeadamente, na Fase Pré-Analítica, Química Clínica, Imunologia, Microbiologia e Patologia Molecular, contribuindo para o desenvolvimento de um espírito crítico e para a obtenção de experiência apenas possível de alcançar em contexto real de trabalho.

Em suma, o estágio laboratorial foi uma experiência enriquecedora não só a nível profissional, como também pessoal.

Parte II: Monografia

Materiais e Métodos

A presente monografia foi elaborada com base na análise, interpretação e síntese de diversos artigos científicos originais e de revisão e também através da consulta de páginas na *internet*, com data de publicação compreendida entre 2014 e 2024.

As plataformas utilizadas para a obtenção de bibliografia eletrónica foram PubMed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), ScienceDirect (www.sciencedirect.com/), National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/), Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov/), Nature (www.nature.com/), Direção-Geral da Saúde (www.dgs.pt/) e HPV World (www.hpvworld.com/), sendo que a pesquisa decorreu entre julho e outubro de 2024.

Para a realização da pesquisa foram utilizadas palavras-chave, nomeadamente, *HPV, Cervical Cancer, HPV Vaccination, Screening and Treatment of Cervical Cancer, HPV Prevention, SARS-CoV-2, COVID-19, COVID-19 Pandemic, Plano Nacional de Vacinação, Impacto of COVID-19 Pandemic on HPV vaccinations.*

1. Introdução

O Vírus do Papiloma Humano, também denominado por HPV, é responsável por uma das infeções sexualmente transmissíveis mais comum a nível mundial. Constitui um problema de saúde pública com elevada morbidade e mortalidade no sexo feminino, estando associado a 99,7% dos casos de cancro de colo do útero(1). A prevenção da infeção por HPV é feita através de vacinação e de programas de rastreio. Em Portugal, a vacina contra o HPV é contemplada pelo Programa Nacional de Vacinação, com a administração recomendada a partir dos 10 anos de idade para ambos os géneros(2).

Em dezembro de 2019, foi identificado um novo coronavírus, o SARS-CoV-2 que rapidamente se disseminou mundialmente, resultando numa pandemia. A COVID-19 consiste na doença respiratória aguda causada por esse vírus (3). Uma vez que ainda não era conhecido o tratamento e vacina eficaz para a infeção por SARS-CoV-2, foram implementadas diversas estratégias de modo a tentar conter a disseminação do vírus, nomeadamente, o isolamento físico, distanciamento social, restrições de deslocações, encerramento de escolas, entre outros(3,4). Nesse âmbito, durante os períodos de confinamento, muitos dos serviços de saúde de rotina foram interrompidos, onde se incluem os programas de vacinação infantil. Quando os programas de vacinação são interrompidos por algum motivo, pode observar-se futuramente um aumento do número de casos de infeções e mortes causados por estas doenças evitáveis por vacinação(3). Relativamente à infeção por HPV, atrasos ou falhas na vacinação podem resultar em casos evitáveis de verrugas genitais, lesões cervicais, cancro do colo do útero e outras doenças relacionadas com o HPV.

Neste contexto, o principal objetivo desta monografia é avaliar o impacto na vacinação de crianças com a vacina contra o HPV durante o período de pandemia causada por SARS-CoV-2 em Portugal.

2. Infecção por HPV

2.1. Estrutura da partícula viral

O Vírus do Papiloma Humano pertence à família *Papillomaviridae* e é um vírus de DNA de cadeia dupla, que não possui invólucro. Apresenta uma cápside icosaédrica, com aproximadamente 60 nm de diâmetro(5). O genoma é circular e pode ser dividido em 3 regiões: E(*early*), L(*late*), conhecidas como ORFs (*open read frames*), e LCR (*long control region*), também denominada de URR (*upstream regulatory region*)(5,6). Os genes E1, E2 e E4 da região E são responsáveis pela replicação do DNA, sendo que o E2 também funciona como repressor transcricional de E6 e E7; o gene E5 é responsável pela transformação e proliferação celular; e os genes E6 e E7 regulam o ciclo celular. Esta região é, assim, essencial para a replicação viral, síntese de partículas virais, libertação e transformação celular. Por sua vez, a região L codifica para as proteínas estruturais da cápside, L1 e L2. Por fim, a região LCR constitui 10% do genoma do HPV e é uma região não codificante constituída pela origem de replicação e pelos locais de ligação ao fator de transcrição, que participam na regulação da transcrição do genoma viral(6). A Figura 1 representa, de forma geral, a organização genómica do HPV.

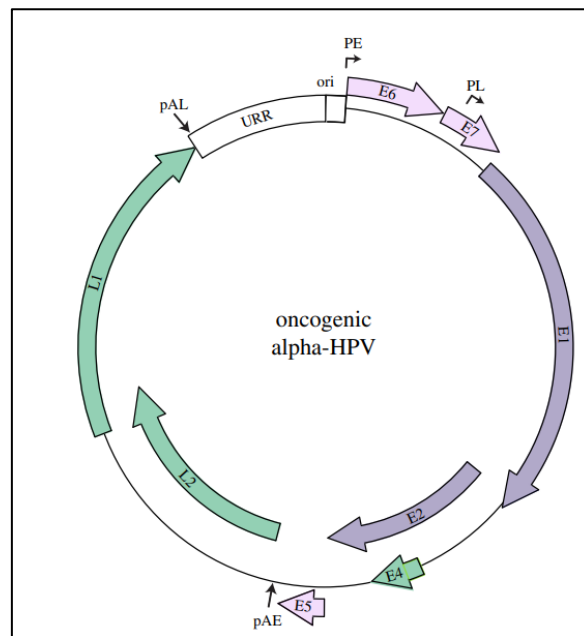


Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV. [Adaptado de 7]

Existem mais de 200 genótipos de HPV, que dependendo da estrutura do seu genoma e do seu tropismo para as células epiteliais humanas encontram-se agrupados em cinco géneros diferentes: Alfa, Beta, Gama, Mu e Nu (6). O maior grupo corresponde ao grupo Alfa que engloba os tipos de HPV com tropismo para o epitélio mucoso. O segundo maior grupo é o grupo Beta, onde se encontram os tipos de HPV responsáveis, principalmente, pela infecção do epitélio cutâneo. Os HPVs que pertencem aos restantes grupos, normalmente, estão associados a patologias benignas(8).

De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC), os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 estão classificados como Vírus do Papiloma Humano de alto risco e os HPV HPV 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 como Vírus do

Papiloma Humano de baixo risco. Os HPV 16 e 18 são os mais prevalentes e são responsáveis não só pelo cancro do colo do útero, como também por uma fração variável de cancro da vulva, da vagina, do pénis, do ânus e da orofaringe. Por sua vez, os HPV de baixo risco do tipo 6 e 11 causam, principalmente, por lesões cervicais, da vulva e da vagina de baixo grau, sendo responsáveis por cerca de 90% das verrugas anogenitais ou condilomas acuminados(9).

2.2. Dados epidemiológicos

A infeção por HPV é a principal causa de cancro do colo do útero. Pode ainda ser considerado um fator contribuinte para outros cancros anogenitais, nomeadamente, do ânus, vagina, vulva e pénis e também da cabeça e pescoço(10).

Tabela 1: Taxa de incidência bruta por 100.000 habitantes e por ano, em Portugal. [Adaptado de 11]

| | Homens | Mulheres |
|--------------------------------|---------------|-----------------|
| Cancro do colo do útero | - | 16,10 |
| Cancro Anal | 1,89 | 1,66 |
| Cancro da Vulva | - | 3,72 |
| Cancro Vaginal | - | 0,91 |
| Cancro do Pénis | 2,47 | - |
| Cancro orofaríngeo | 7,44 | 0,39 |

A nível mundial, o cancro do colo do útero é o 4º mais comum no sexo feminino, com cerca de 604.127 novos casos diagnosticados e 341.831 mortes em 2020. Em Portugal, estima-se um total de 865 novos casos diagnosticados em 2020, constituindo o 8º cancro mais comum na população feminina portuguesa e o 3º mais frequente diagnosticado em mulheres com idades compreendidas entre os 15 e 44 anos(11). Estes dados podem ser analisados nas Figuras 2 e 3.

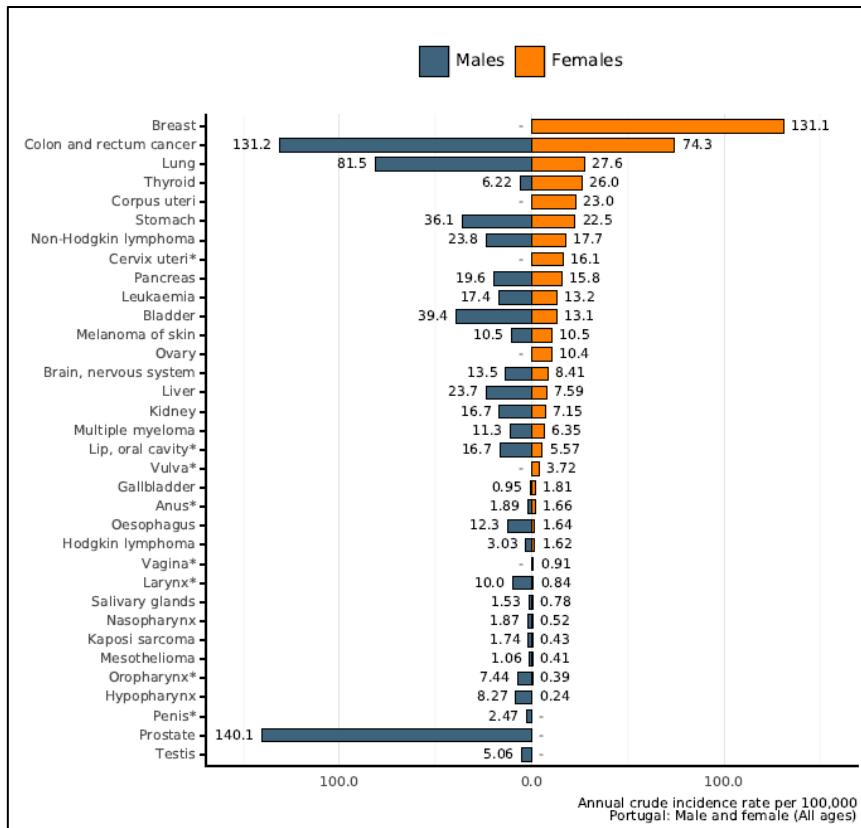


Figura 2: Comparação entre a taxa de incidência do cancro do colo do útero com outros cancros em mulheres de todas as idades em Portugal. [Adaptado de 11]

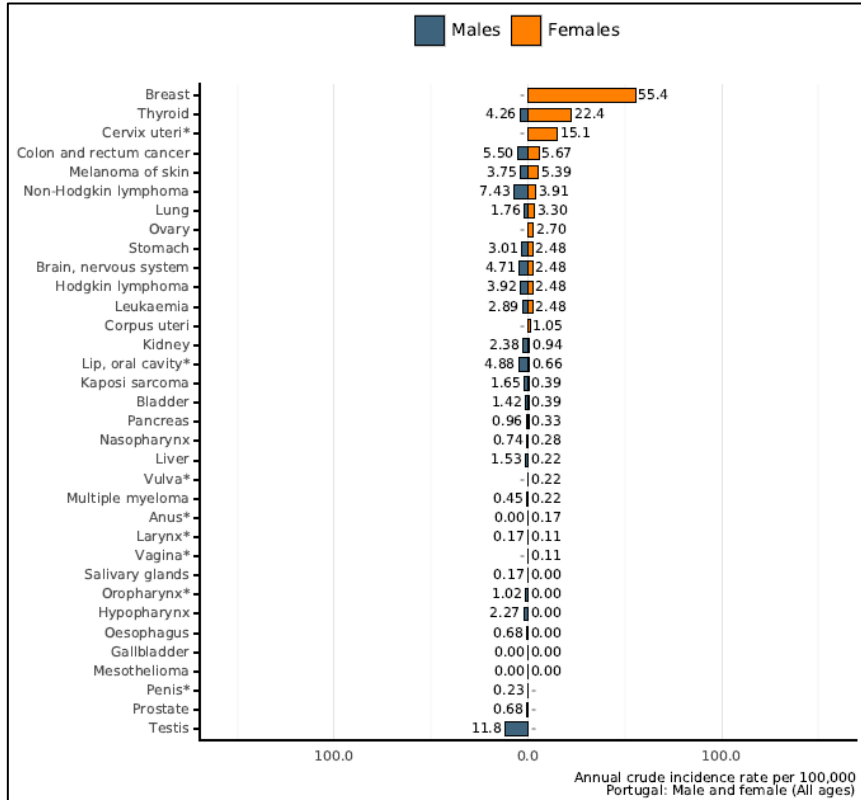


Figura 3: Comparação entre a taxa de incidência do cancro do colo do útero com outros cancros em mulheres, com idades compreendidas entre 15 e 44 anos, em Portugal. [Adaptado de 11]

Em 2011, foi realizado o estudo “*The CLEOPATRE Portugal Study*”, em que um dos objetivos era determinar a prevalência geral e estratificada por idade da infecção por HPV no colo do útero em mulheres residentes em Portugal Continental. Neste estudo, estimou-se que a prevalência da infecção por HPV na população portuguesa feminina com idades compreendidas entre os 18 e 64 anos é de 12,7%, sendo o grupo etário entre os 20 e 24 anos que regista a prevalência mais elevada, de 28,8% (1,12).

2.3. Ciclo replicativo

O Vírus do Papiloma Humano infeta células epiteliais estratificadas e o seu ciclo de vida depende do processo de diferenciação celular. A infecção ocorre através de microlesões no epitélio que expõem as células das camadas basais(13). Uma vez que entra em contacto com estas células, a proteína L1 da cápside liga-se aos recetores de proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPGs), promovendo uma alteração conformacional na cápside viral. A alteração conformacional da cápside resulta na exposição da região N-terminal da proteína L2, que sofre clivagem pela enzima furina, uma proteína com atividade proteolítica, capaz de interagir com diferentes fatores de crescimento e recetores celulares e virais. Esta clivagem é necessária para induzir uma segunda alteração conformacional na cápside viral que permite ao vírus ligar-se aos recetores celulares (6,14). A Figura 4 representa, esquematicamente, este processo de ligação.

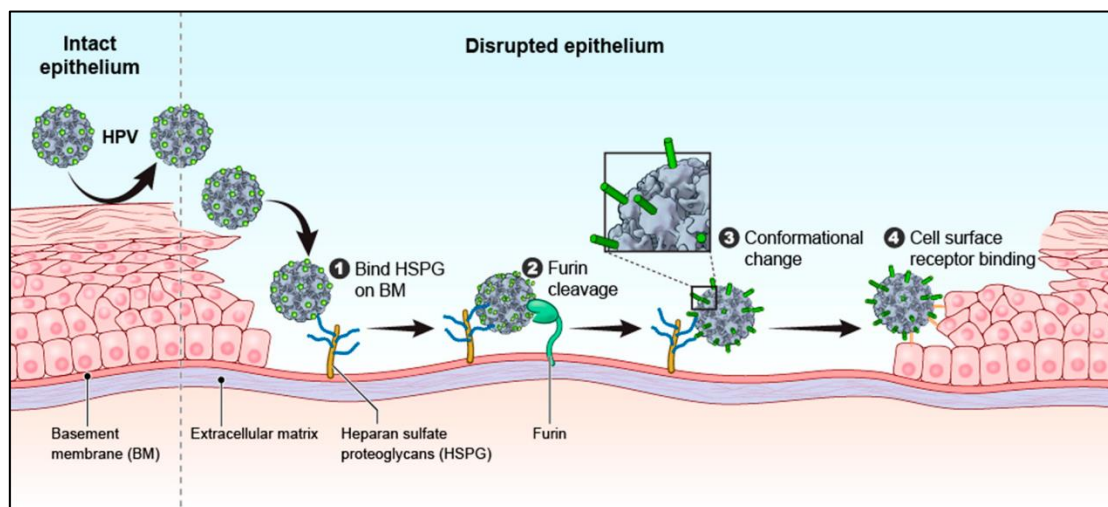


Figura 4: Ligação do HPV às células das camadas basais do epitélio. [Adaptado de 15]

De seguida, o vírus é internalizado através de um mecanismo de endocitose, semelhante à macropinocitose, percorrendo os componentes citoplasmáticos ligados à membrana, complexo de Golgi e retículo endoplasmático por meio de endossomas. Por fim, o genoma viral episossomal é transportado até ao núcleo, onde entra através de poros nucleares ou após rutura da membrana nuclear durante o processo de mitose. O vírus chega ao núcleo, aproximadamente, 24 horas após a ligação celular que corresponde ao momento em que a cápside se desintegra e a proteína L2 associada ao genoma viral se liga aos corpos nucleares de PML (do inglês, *promyelocytic leukaemia*), de modo a estabelecer a infecção nuclear e iniciar a transcrição viral (8,16).

Os primeiros genes do HPV a serem expressos são os genes E1 e E2 que levam à ativação da replicação do DNA viral(17). A proteína E1 tem atividade de helicase e juntamente com a proteína E2 formam um complexo com o DNA viral de modo a recrutar a DNA polimerase da célula hospedeira. Nas células infetadas da camada basal, apenas se produz um pequeno número de cópias do genoma do HPV, sendo que essas cópias são duplicadas durante a divisão celular. Isto porque quando as células basais infetadas se dividem, produzem duas células-filhas igualmente infetadas, permanecendo uma na camada basal enquanto a outra se diferencia e migra para as camadas superiores do epitélio. O aumento do número de cópias do vírus é atingido à medida que as células epiteliais se diferenciam nas camadas superiores do epitélio(17,18).

A proteína E2 atua ainda na regulação da expressão dos genes virais, principalmente dos genes E5, E6 e E7. A expressão destes três genes na camada basal e na camada superior a esta cria as condições favoráveis para a replicação do HPV, pois são responsáveis por estimular a proliferação celular, inibir a apoptose celular e evadir a resposta imunológica do hospedeiro. Estas condições podem também promover o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e cancro(17).

As proteínas L1 e L2 são sintetizadas apenas nas células terminais diferenciadas nas camadas superiores do epitélio e são responsáveis pela encapsidação do DNA viral(17,18). Por fim, a libertação das partículas virais é mediada pela proteína E4, expressa abundantemente nas camadas mais superiores do epitélio, que promove a rutura das ligações de queratina do citoplasma da célula hospedeira e interrompe a divisão celular, permitindo a proliferação e libertação das partículas (16). O ciclo de vida do HPV é demonstrado na Figura 5.

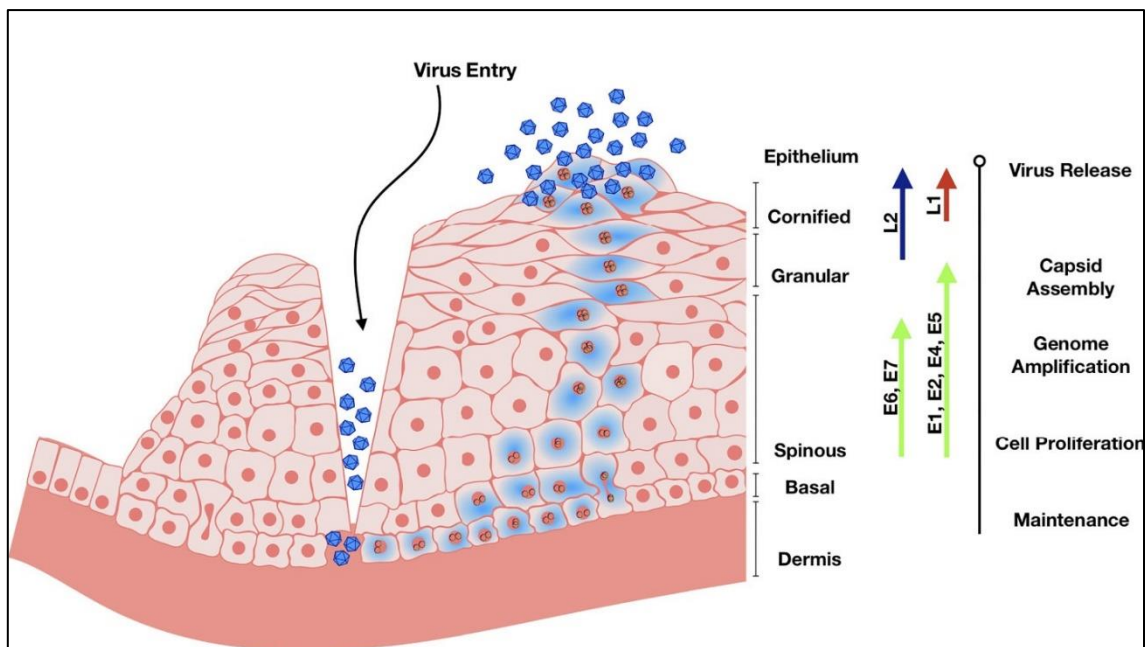


Figura 5: Esquema do ciclo replicativo do HPV. [Adaptado de 18]

2.4. Patogénese da infeção

A infeção por HPV é, geralmente, transmitida por via sexual ou oral, através do contacto com lesões da pele ou mucosa genital infetada. Por outro lado, a transmissão

pode ser indireta, por exemplo, através do contacto com instrumentos médicos contaminados. Em ambas as situações, é necessário existir microlesões epiteliais que favoreçam a entrada do vírus nas células basais respetivas. Existe ainda a possibilidade de o vírus ser transmitido aquando do parto, apesar de ser menos frequente(2,19).

Na maioria dos casos de infeção por HPV, a infeção desaparece espontaneamente(20). Contudo, ao longo do tempo, a infeção pode tornar-se persistente e evoluir para uma lesão pré-cancerosa. Se este tipo de lesão não for diagnosticado e tratado em tempo útil, existe a possibilidade de progredir para cancro, ao fim de alguns anos e, só então, surgirem sintomas(8,20).

As lesões pré-cancerosas nas células do colo do útero acima referidas são denominadas de Neoplasia intraepitelial cervical (CIN, do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*), estando classificadas de 1 a 3 consoante a estimativa de células displásicas presentes no colo do útero. A CIN1 corresponde a uma neoplasia cervical de baixo grau, caracterizada por menos de um terço do epitélio apresentar displasia e apenas algumas deformações nucleares. A CIN2 corresponde a uma neoplasia moderada, em que dois terços do epitélio está afetado e, por fim, a CIN3 corresponde a uma neoplasia cervical de alto grau por mais de dois terços do epitélio apresentar células displásicas (21,22). Em CIN1, o HPV estabelece uma infeção persistente nas células cervicais e a sua transição para cancro leva, pelo menos, 10 a 12 anos. As lesões de CIN1 que não regredem podem desenvolver-se em CIN2/3 num período de 2 a 3 anos após a infeção(22). A Figura 6 representa esquematicamente a progressão da infeção por HPV para cancro do colo do útero (23).

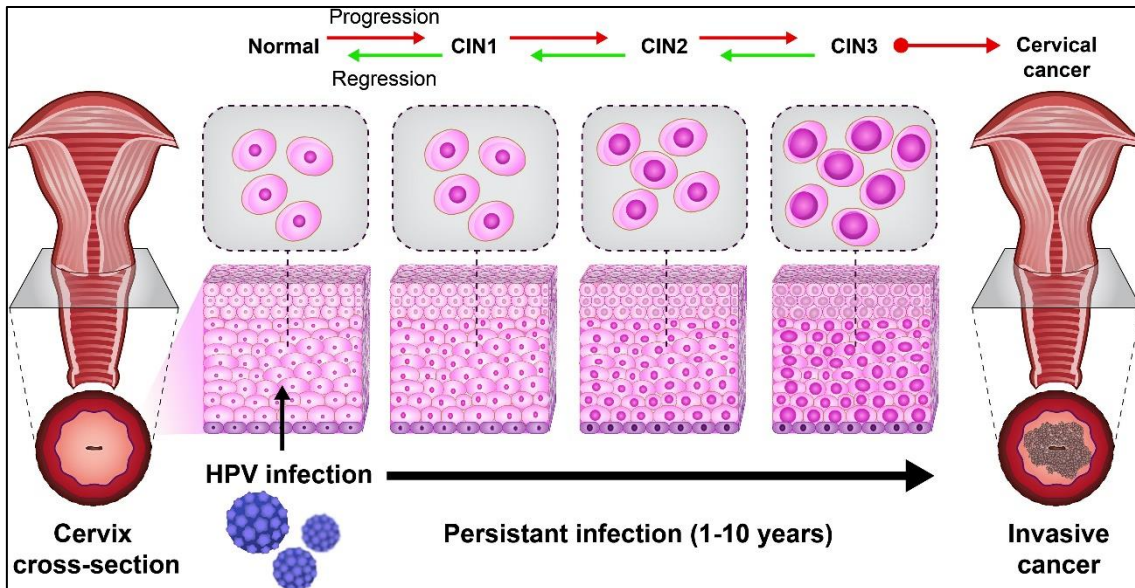


Figura 6: Etapas da progressão da infeção natural por HPV para cancro invasivo [Adaptado de 23].

A progressão das células epiteliais infetadas por HPV para cancro do colo do útero invasivo é um processo a longo prazo e está associado a alterações no DNA da célula hospedeira que envolvem mudanças epigenéticas e genéticas nos oncogenes e genes supressores de tumores. Como já foi mencionado anteriormente, o HPV entra nas células basais escamosas através de microlesões, levando à ocorrência de uma série de eventos

genéticos nas células epiteliais basais de modo a permitir a replicação viral. Estes eventos criam um ambiente permissivo à progressão neoplásica(22).

As oncoproteínas do HPV, nomeadamente a E6 e E7, desempenham um papel importante na alteração da função celular do hospedeiro, sendo que a progressão para a malignidade se dá com o aumento da expressão destas oncoproteínas nas células infetadas. Estas proteínas têm a capacidade de desregular o controlo dos pontos de verificação do ciclo celular por meio da degradação do supressor tumoral p53 e do supressor tumoral retinoblastoma, pRb (18,22). A degradação de p53 é promovida pela oncoproteína E6 e resulta na inibição da apoptose celular e na continuidade da replicação celular. Por sua vez, a oncoproteína E7 é responsável pela degradação da pRb, que uma vez inibida a sua ação leva à ativação do fator de transcrição E2F fazendo com que a célula infetada entre na fase S (fase de replicação do DNA) e promovendo a proliferação celular(17,22). Ademais, a proteína E7 pode também inibir a diferenciação dos queratinócitos, culminando na sua multiplicação contínua (17). Assim, o aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 pode estimular o crescimento celular, inibir a diferenciação e induzir instabilidade cromossômica, resultando em carcinogénese (8).

2.5. Diagnóstico

O método tradicional de diagnóstico de cancro do colo do útero tem sido a citologia, também conhecida como teste de Papanicolau. No início dos anos 2000, foi desenvolvido o método da citologia em meio líquido como alternativa ao método tradicional. Consistem na recolha de células da superfície externa do colo do útero com uma espátula ou escovilhão específicos para “raspagem” dos tecidos, sendo realizado um esfregaço lâmina de vidro posteriormente fixado (citologia convencional) ou colocadas num meio de armazenamento líquido (citologia em meio líquido). Esta análise laboratorial permite identificar qualquer alteração nas células do colo do útero. Quando os resultados são positivos, o diagnóstico é confirmado por colposcopia(24).

Por outro lado, existem testes moleculares para a deteção de tipos de HPV de alto risco, nomeadamente, testes moleculares de amplificação de ácidos nucleico baseados no DNA e no mRNA do HPV(25).

2.6. Prevenção

A vacinação profilática consiste no método de prevenção primário mais eficaz para o controlo de infeções por HPV, a longo prazo(26). Atualmente, existem três vacinas desenvolvidas contra o HPV: Gardasil®, Cervarix® e Gardasil®9. Todas estas vacinas são produzidas por tecnologia de DNA recombinante e compostas por partículas tipo-vírus (VLPs) constituídas apenas pela proteína L1 da cápside do HPV. As VLPs são muito semelhantes aos viriões do HPV, no entanto, não contêm o genoma do DNA viral, pelo que não são infecciosas nem oncogénicas(23,26,27). A sua administração é feita por via intramuscular e tem como objetivo ativar a imunidade humoral e a produção de anticorpos neutralizantes do vírus, inibindo a entrada deste nas células hospedeiras e induzindo uma proteção eficaz contra a infeção por HPV. Ademais, as vacinas contêm adjuvantes que permitem aumentar a imunogenicidade das VLPs, que por sua vez, permite prolongar a resposta imunológica por um período mais longo. Vários estudos identificaram que a vacinação contra o HPV gera títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra os antígenos do HPV 10 a 100 vezes superiores aos obtidos pela infeção natural (23).

A vacina Gardasil® foi a primeira a ser comercializada, em 2006. É uma vacina tetravalente que protege contra os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18. Por sua vez, a vacina Cervarix® é uma vacina bivalente que confere proteção contra HPV 16 e 18. No que diz respeito à vacina Gardasil®9, atualmente administrada em Portugal, é uma vacina nonavalente que protege contra os tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58.

Atualmente, todas as vacinas podem ser administradas a partir dos nove anos de idade, independentemente do sexo, com o objetivo de prevenir lesões anogenitais pré-cancerosas, cancro do colo do útero, da vulva e da vagina e cancro do ânus (relacionadas com os tipos de HPV contidos nas vacinas). As vacinas Gardasil® e Gardasil®9 também são indicadas na prevenção das verrugas genitais (relacionadas com os tipos de HPV contidos nas vacinas)(27). A administração da vacina é recomendada antes do início da atividade sexual, isto é, antes da exposição ao HPV, de modo a atingir o máximo benefício potencial.

Apesar da vacinação estar implementada em muitos países, as gerações mais antigas de mulheres não são beneficiadas pela vacinação, pelo que, é importante definir uma estratégia de prevenção secundária, nomeadamente, através do rastreio de cancro do colo do útero regular para detetar precocemente alterações do colo uterino(26,28). O teste deve ser realizado por todas as mulheres, sexualmente ativas, com idades entre os 25 e 65 anos de idade com uma periodicidade de 5 anos(28).

2.7. Plano de vacinação

Em Portugal, a vacina contra o HPV está incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV) desde 2008, sendo inicialmente administrada a mulheres com 13 anos de idade, em três doses, segundo o esquema de 0, 2 e 6 meses. Posteriormente, entre 2009 e 2011, as mulheres que completavam 17 anos nesse período foram abrangidas pelo PNV. Em 2014, a vacinação foi antecipada para os 10 anos de idade, em duas doses, segundo o esquema vacinal de 0 e 6 meses. No início de 2017, a Direção-Geral da Saúde introduziu no PNV a vacina nonavalente, em vez da tetravalente, mantendo o esquema vacinal (1).

Em outubro de 2020, o Plano Nacional de Vacinação passou a incluir no esquema vacinal recomendado, a vacinação contra o HPV no sexo masculino, aos 10 anos de idade, nascidos a partir do ano de 2009 (29).

2.8. Tratamento

Na maioria das infeções por HPV, o próprio sistema imunitário consegue eliminar o vírus. No entanto, as lesões provocadas pela infeção por HPV, podem ser tratadas através de medicamentos de aplicação local, eletrocirurgia laser, crioterapia e excisão cirúrgica, de acordo com a orientação médica (2).

3. Infecção por SARS-CoV-2

3.1. Estrutura da partícula viral

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* e género *Betacoronavirus*. É um vírus com invólucro e com um genoma de RNA (+) de cadeia simples (30). O genoma do SARS-CoV-2 possui, aproximadamente, 30.000 pares de bases com CAP na extremidade 5' e cadeia Poli-A na extremidade 3'(31). Na sua estrutura, o SARS-CoV-2 contém várias ORFs que vão codificar para proteínas não estruturais, proteínas estruturais, como a proteína S (*Spike*), E (*Envelope*), M (*Membrane*) e N (*Nucleocapsid*), e proteínas acessórias (32). Na Figura 6 está representada a estrutura genómica do SARS-CoV-2.

A proteína *Spike* é uma glicoproteína transmembranar que medeia a ligação do coronavírus ao recetor de superfície da célula hospedeira durante a fusão do invólucro viral com a membrana celular, iniciando assim o ciclo replicativo do vírus(33). Apresenta duas subunidades funcionais, S1 e S2, que facilitam a fixação à superfície da célula hospedeira, através do domínio de ligação ao recetor *Receptor Binding Domain* (RBD) responsável por mediar o contacto com o recetor celular ACE2 (do inglês, *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) e a fusão das membranas viral e celular, respetivamente(34).

A proteína M é uma das proteínas estruturais mais abundante e define a forma do invólucro viral. Por sua vez, a proteína E é a menor das proteínas estruturais e interage com outras proteínas estruturais, nomeadamente, com a proteína M de modo a manter a forma da partícula viral. Apresenta também um papel importante na promoção da libertação da partícula viral(35).

A proteína da nucleocápside é uma das proteínas mais abundantes nas células infetadas por SARS-CoV-2. A sua principal função é estabilizar o genoma viral, pois interage tanto com o genoma viral como com a proteína de membrana. É uma proteína imunogénica que é expressa abundantemente durante a infeção por SARS-CoV-2, pelo que, pode apresentar um papel relevante no diagnóstico e desenvolvimento de vacinas(36).

O RNA genómico apresenta, na extremidade 5', duas grandes ORFs, que ocupam dois terços do genoma: ORF1a e ORF1b. Estas ORFs são responsáveis pela codificação de 15 a 16 proteínas não estruturais, onde se inclui o complexo de replicação e transcrição viral (RTC, do inglês *Replication and Transcription Complex*). Neste complexo estão incluídas as enzimas necessárias para a replicação e correção do RNA, sendo esta última função necessária para manter a integridade do genoma(37). É importante salientar que a ORF1a apresenta, ainda, uma região codificante para a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp, do inglês *RNA dependente RNA polymerase*), proteína que assegura a replicação do genoma e transcrição dos genes(37,38).

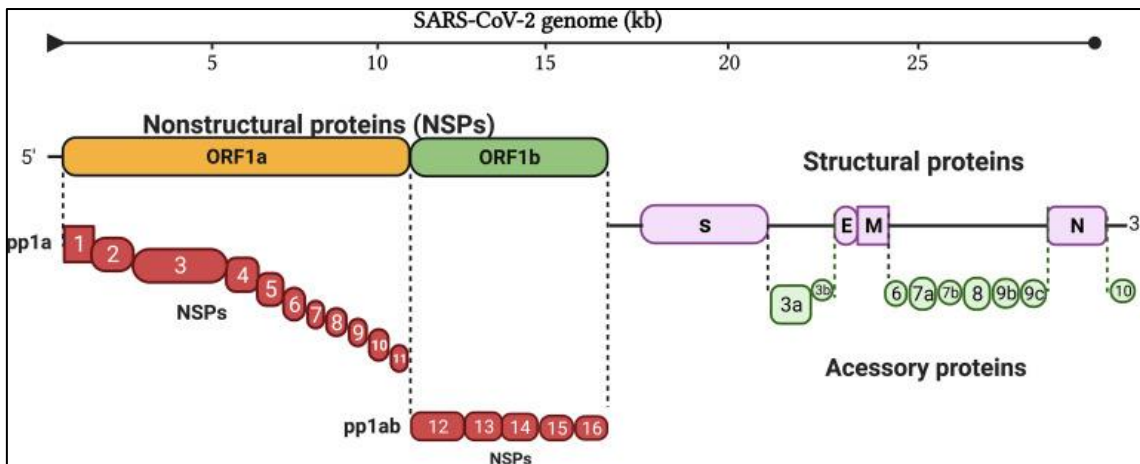


Figura 7: Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2. [Adaptado de 31]

3.2. Dados epidemiológicos

O primeiro caso de COVID-19 foi registado a 8 de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China. O SARS-CoV-2 foi considerado um vírus de rápida disseminação e, nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde declarou oficialmente, a 11 de março de 2020, a infeção por SARS-CoV-2 como uma pandemia global de risco elevado(39). Na Figura 7 estão representados os principais eventos ocorridos durante a pandemia causada pelo SARS-CoV-2.

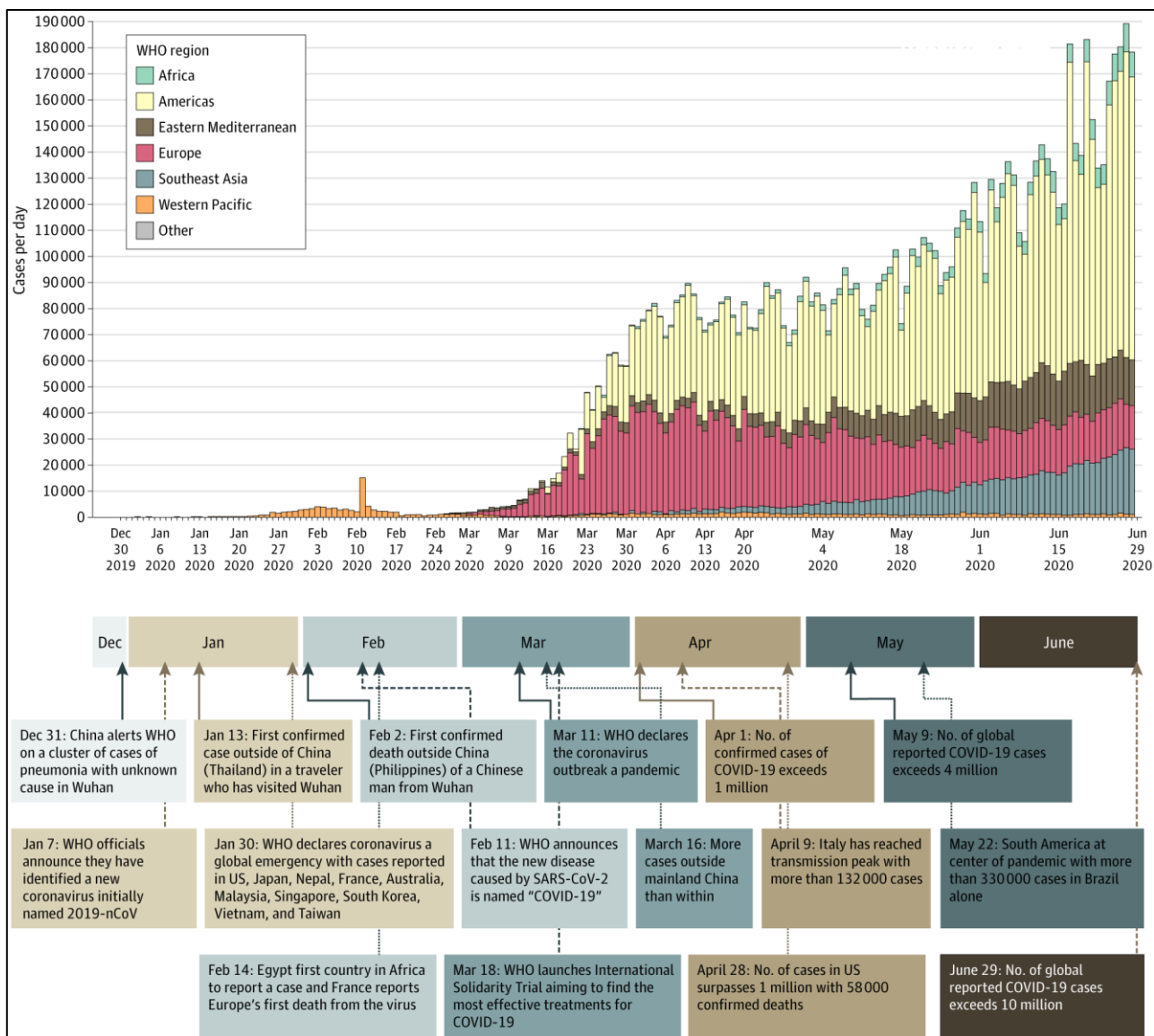


Figura 8: Principais eventos ocorridos no período de pandemia causada por SARS-CoV-2. [Adaptado de 40]

Até ao dia 8 de setembro de 2024, foram reportados à Organização Mundial da Saúde um total de 776.205.140 casos confirmados de COVID-19 e um total de 7.064.380 mortes. No mesmo período, registaram-se em Portugal um total de 5.667.254 casos confirmados de COVID-19 e 28.942 mortes (41).

3.3. Ciclo replicativo

O ciclo replicativo do SARS-CoV-2 dá-se em cinco passos: adesão celular por meio de ligação aos recetores, penetração/entrada na célula hospedeira, biossíntese, maturação e libertação da partícula viral(42).

A entrada da partícula viral nas células hospedeiras é mediada pela proteína *spike*, uma vez que, esta proteína tem um domínio de ligação que faz contacto direto com o recetor celular ACE2. Por outro lado, as duas subunidades, S1 e S2, que surgem após clivagem proteolítica pela TMPRSS2 (do inglês, *Transmembrane Protease Serine 2*) e

3.4. Patogénese da infeção

O SARS-CoV-2 é transmitido, essencialmente, através de gotículas respiratórias, mas também o pode ser por contacto direto com superfícies contaminadas e/ou aerossóis de indivíduos infetados assintomáticos ou sintomáticos(43,48). A patogénese da infeção por SARS-CoV-2 varia de sintomas leves a graves, como insuficiência respiratória grave(49). Na maioria dos indivíduos sintomáticos, os sintomas têm início após um período de incubação de 1 a 14 dias depois da exposição ao vírus, apresentando como sintomas mais comuns febre, cefaleia, tosse seca, mialgia, dispneia(50). Por outro lado, sintomas mais graves podem evoluir para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), pneumonia, insuficiência renal e morte(43).

Após ligação às células epiteliais do trato respiratório, o vírus começa a replicar-se e migra pelas vias aéreas, atingindo as células epiteliais alveolares nos pulmões. A rápida replicação do vírus pode desencadear uma resposta imunológica intensa, como a síndrome da tempestade de citocinas que causa síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória, considerada a principal causa de morte em doentes com COVID-19(49).

3.5. Diagnóstico

Atualmente existem três tipos de testes que podem ser realizados para fazer o diagnóstico e rastreio de infeção por SARS-CoV-2: testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos, considerados como método de referência e onde se incluem os testes de RT-PCR em tempo real que apresentam elevada sensibilidade e especificidade na deteção de RNA viral; testes rápidos de antígeno, que detetam a presença de proteínas virais, são menos sensíveis mas mais fáceis de executar e o tempo de resposta é menor; e testes serológicos, que são testes que avaliam a resposta imunológica à infeção por SARS-CoV-2(51,52).

3.6. Prevenção

A estratégia mais segura e económica de prevenção da doença e morte por COVID-19 é a vacinação preventiva, constituindo, ainda, a melhor opção no combate de futuras variantes virais. Existem outros vírus, como o Vírus Influenza, em que se faz anualmente a vigilância das principais estirpes e variantes em circulação, de modo à vacina do ano seguinte ser eficaz contra essas mesmas variantes. Por esse motivo, uma estratégia semelhante pode ser adotada globalmente para prevenir e minimizar a prevalência da COVID-19 e futuras variantes do SARS-CoV-2(53). Assim, a vacinação consiste no método mais eficaz de prevenção e controlo da infeção por SARS-CoV-2, a longo prazo(49).

As vacinas desenvolvidas utilizam uma variedade de plataformas diferentes, baseadas nos componentes virais, onde se incluem as subunidades proteicas, DNA, mRNA em nanopartículas lipídicas, vetores virais não replicantes, vetores virais replicantes e partículas semelhantes a vírus; ou baseadas no vírus inteiro, recorrendo ao vírus inativado ou vírus vivo atenuado(49,54). As vacinas aprovadas pela Infarmed e administradas em Portugal são apresentadas na Tabela 2. As vacinas desenvolvidas pela Pfizer/BioNTech e pela Moderna, denominadas “Comirnaty” e “COVID-19 Vaccine Moderna”, respetivamente, utilizam mRNA codificante para a proteína Spike do vírus

SARS-CoV-2, encapsulado por uma nanopartícula lipídica que o protege da degradação. A proteína Spike é posteriormente reconhecida pelo sistema imunológico, levando à produção de anticorpos. Por sua vez, as vacinas da AstraZeneca/Oxford e da Janssen são vacinas de vetor viral não replicante, ou seja, utilizam outro vírus como vetor para introduzir genes do outro vírus e replicar o seu antigénico. No caso do SARS-CoV-2, é utilizado um vetor de adenovírus tipo 26 (Ad26), que contém os genes da proteína Spike levando, assim, à ativação da resposta imunológica (54). Por fim, a vacina desenvolvida pela Novavax utiliza nanopartículas da proteína spike do SARS-CoV-2 recombinante adjuvada com Matrix-M(55).

Tabela 2: Vacinas contra a COVID-19 aprovadas e administradas em Portugal. [Adaptado de 56,57]

| Vacina | Tipo de Vacina | Doses | Eficácia |
|---------------------------|-----------------------|--------------|-----------------|
| Pfizer/BioNTech | mRNA | 2 | 95% |
| Moderna | mRNA | 2 | 94,5% |
| Oxford/AstraZeneca | Vetor viral | 2 | 82,4% |
| Janssen | Vetor viral | 1 | 72% |
| Novavax | Subunidade proteica | 2 | 95,6% |

Antes da aprovação e distribuição das vacinas, a prevenção da COVID-19 envolvia comportamentos preventivos pessoais, como o distanciamento social e uso de máscaras, e medidas de saúde pública que abrangiam a testagem ativa, o rastreamento de casos, isolamento, quarentena e restrições de aglomerações sociais e deslocamentos(30,49).

3.7. Plano de vacinação

O desenvolvimento de vacinas eficazes tornou-se um ponto de viragem relevante no combate à infeção por SARS-CoV-2, reduzindo a morbilidade e mortalidade relacionadas com a COVID-19, protegendo os sistemas de saúde e permitindo a retoma das atividades socioeconómicas. Após vários meses de pesquisa e desenvolvimento intensivos, as campanhas de vacinação contra a COVID-19 começaram a ser estruturadas no final de 2020 por todo o mundo. De um modo geral, as campanhas de vacinação foram planeadas e implementadas mundialmente de forma a garantir a imunização prioritária das populações com maior risco de morbilidade e mortalidade, onde se incluem idosos e indivíduos com doenças crónicas e autoimunes. Neste grupo foram incluídos também os profissionais de saúde, com o intuito de manter os sistemas de saúde e assistência social operacionais(58).

Em Portugal, a primeira vacina foi administrada a 3 de dezembro de 2020(58) e, inicialmente, o plano de vacinação foi dividido em três fases. A primeira fase teve como destino pessoas com 50 anos ou mais com patologias associadas; residentes e profissionais em lares e unidades de cuidados continuados; profissionais de saúde; profissionais das forças armadas, forças de segurança e serviços críticos. Numa segunda fase, foram vacinados indivíduos com 65 ou mais anos com ou sem patologias associadas e indivíduos entre os 50 e 64 anos com patologias associadas. A terceira fase de vacinação destinou-se à restante população(59).

A OMS declarou o fim da pandemia de COVID-19 a 5 de maio de 2023, contudo, o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) mantém a indicação para a vacinação sazonal contra a COVID-19, com vacinas adaptadas às estirpes do vírus em circulação(60). Atualmente, o plano de vacinação é sazonal, no período de outono-inverno, sendo recomendada uma dose de reforço sazonal com vacinas de mRNA da vacina Comirnaty® aos grupos elegíveis desde que tenham executado o esquema vacinal primário com qualquer uma das vacinas contra a COVID-19. É de referir que nesta campanha de vacinação, é possível a coadministração da dose de reforço da vacina contra a COVID-19 com a vacina inativada contra a gripe. Por outro lado, a vacinação de indivíduos elegíveis que não realizaram o esquema vacinal primário decorre durante todo o ano (61).

4. Impacto da pandemia COVID-19 na vacinação do HPV a nível Mundial

A pandemia causada por SARS-CoV-2 apresentou múltiplos desafios, afetando não só a saúde pública, mas também a economia, os padrões socioculturais e as instituições políticas. O impacto da pandemia nos programas de vacinação é um tema importante, no sentido em que atrasos ou interrupções desses programas podem resultar em surtos e epidemias de outras doenças infecciosas. Vários países impuseram o isolamento social, o distanciamento físico e a quarentena. Os programas de vacinação para controlar e eliminar outras doenças que podem ser prevenidas por vacina foram significativamente afetados pela resposta à Covid-19, a nível global. As principais razões para os programas de vacinação serem interrompidos prendem-se com o facto da necessidade de cumprir o isolamento físico e os períodos de quarentena essenciais para interromper a cadeia de transmissão do vírus; e, por outro lado, os sistemas de saúde estavam sobrecarregados no combate à COVID-19, estando a maioria dos profissionais de saúde envolvidos ativamente na pandemia em curso(62).

A 15 de julho de 2020, a Organização Mundial da Saúde e a UNICEF alertaram para um declínio no número de crianças vacinadas com vacinas essenciais, a nível global(63). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as interrupções nos programas de vacinação de rotina afetaram mais de 80 milhões de crianças em todo o mundo. Um dos programas de vacinação de rotina que enfrentou interrupções significativas foi o da vacina contra o HPV, resultando num número substancial de adolescentes que perderam a oportunidade de se vacinar. A principal consequência da não vacinação contra o HPV constitui o aumento do número de casos de cancro do colo do útero. Nos Estados Unidos, foi realizado um estudo para estimar o impacto da pandemia na vacinação contra o HPV que demonstrou uma redução da cobertura vacinal, sendo a taxa de vacinação em abril de 2020 aproximadamente um quarto da taxa em abril de 2018 e 2019(64).

Em vários países europeus também se observou uma lacuna da vacinação de rotina durante a pandemia de COVID-19. A Suíça e a Grécia são dois desses países, onde se observou uma redução do número de doses administradas da vacina contra o HPV no período de pandemia, embora em diferentes graus. No caso da Suíça, em 2020, a administração da vacina contra o HPV sofreu uma redução de 14,8% em comparação com 2019, contudo, em 2021, a redução foi menor (7,9%), indicando já uma recuperação no défice de doses comparativamente a 2020. Relativamente à Grécia, o défice de vacinação contra o HPV foi mais significativo na segunda vaga da pandemia, em 2021, observando-se uma redução de 12,3% no número de doses de vacina administrada(65). Na Itália também se registou uma redução da administração da vacina contra o HPV, onde 42% e 52% das coortes de crianças nascidas entre 2005 e 2009, respetivamente, não foram vacinadas(66).

O Brasil é outro exemplo onde ocorreu a diminuição do número de vacinas administradas contra o HPV, registando um decréscimo de 11,24% entre 2019 e 2022(67).

5. Impacto da pandemia COVID-19 na vacinação do HPV em Portugal

Após o início do primeiro período de confinamento em Portugal e perante a necessidade de adotar estratégias excepcionais e temporárias na prevenção da transmissão da infeção por SARS-CoV-2, a Direção Geral da Saúde definiu medidas de exceção no cumprimento do PNV durante a pandemia de COVID-19. No comunicado publicado a 25 de março de 2020, definiu-se como prioritária a vacinação recomendada até aos 12 meses de idade, inclusive, que confere proteção contra onze doenças potencialmente graves; a vacinação BCG das crianças com risco identificado de tuberculose grave; a vacinação de doentes crónicos e outros grupos de risco compreendidos no PNV; e, por fim, a vacinação de grávidas(68).

De acordo com o Boletim n.º.4 do Programa Nacional de Vacinação, observaram-se “diminuições ténues” em algumas coberturas vacinais, nomeadamente, na vacinação atempada aos 12 meses de idade e na vacinação de adolescentes e adultos no ano de 2020. A não priorização da vacinação de adolescentes e adultos está relacionada com o facto de os serviços de saúde estarem focados em adaptar-se rapidamente na resposta à pandemia de COVID-19 e, também pelo facto do risco destas doenças não ser imediato(69).

Apesar de tudo, o mesmo boletim refere que a vacinação com a vacina HPV de adolescentes do sexo feminino mantém-se muito elevada ($\geq 91\%$ a partir dos 12 anos de idade)(69). No entanto, não existem dados epidemiológicos suficientes e disponíveis para avaliar o verdadeiro impacto que a pandemia causada por SARS-CoV-2 teve na vacinação contra infeções por HPV.

6. Conclusão

A pandemia causada por SARS-CoV-2 em 2020 teve um grande impacto não só na saúde pública, como na economia, educação e bem-estar social, a nível mundial. No contexto da saúde pública, a pandemia sobrecarregou os sistemas de saúde, uma vez que, estes tiveram de concentrar a maioria dos recursos e serviços para combater a COVID-19, limitando a capacidade de providenciar os serviços de rotina como os programas de vacinação, rastreios preventivos, consultas de rotina e tratamento e acompanhamento de doentes crónicos. Como tal, destes atrasos significativos podem resultar implicações a longo prazo na saúde pública, nomeadamente, no que diz respeito à vacinação contra o HPV, aumentando o risco de cancro relacionados com a infeção por este vírus.

No âmbito desta realidade, é crucial e urgente a realização de um estudo epidemiológico da vacinação do HPV durante o período de pandemia causada por SARS-CoV-2 em Portugal, de modo a compreender e reconhecer o possível impacto causado. Este estudo é importante para identificar lacunas na cobertura vacinal neste período e para desenvolver estratégias no sentido de reverter e/ou minimizar os efeitos consequentes nas gerações futuras, garantido a sua proteção e prevenção contra as doenças causadas pelo HPV.

Referências Bibliográficas

Parte I

1. SYNLAB. Europe's Number One Medical Diagnostics Provider [Internet]. [citado 3 de Agosto de 2024]. Disponível em: https://www.synlab.pt/media/PDF/SYNLAB.PT/brochura_synlab_quemsomos.pdf
2. SYNLAB. Política da Qualidade.
3. Assembleia da República. Despacho n.º 10009/2019. Diário da República n.º 212/2019, 2.ª série de 2019-11-05. 2019.
4. Assembleia da República. Lei n.º102/2009 de 10 de setembro. Diário da República. 2009;1.ª série(176):6167–92.
5. Ministério da saúde. Portaria n.º166/2014. Diário da República. 21 de Agosto de 2014;1.ª série(160):4372–82.
6. SYNLAB. Manual de Higiene e Segurança. 2017.
7. Presidência do Conselho de Ministros. Decreto-Lei n.º 102-D/2020, de 10 de dezembro. Diário da República. 2020;1.ª série(239):25(2)-25(269).
8. Ministério da Saúde. Despacho nº 242/96 13 de agosto. 1996.
9. Sonmez C, Yıldız U, Akkaya N, Taneli F. Preanalytical Phase Errors: Experience of a Central Laboratory. *Cureus* 12. 20 de Março de 2020;
10. SYNLAB. Colheita, Transporte e Receção de Amostra. 2019.
11. Majkić-Singh N, Šumarac Z. Quality indicators of the pre-analytical phase. *J Med Biochem*. Julho de 2012;31(3):174–83.
12. Instituto Português da Qualidade. ISO 15189:2012 Laboratórios clínicos Requisitos para a qualidade e competência. 2014.
13. SYNLAB. Receção e Triagem de Amostras. 2021.
14. Beckman Coulter. AutoMate 2500 Family Sample Processing Systems [Internet]. 2021 [citado 15 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/en/products/automation/automate-2500-family-sample-processing-systems?id=A99171&index=0#/overview>
15. Muflih M, Alrashidi O, Saud A, Alharbi W, Saad A, Saleh M, et al. Analyzing Errors In Laboratory Testing: Causes And Prevention Strategies. *Migration Letters* [Internet]. 2022;19:1552–62. Disponível em: www.migrationletters.com
16. Hammerling JA. A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today. *Lab Med*. Fevereiro de 2012;43(2):41–4.
17. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM. Uses of biochemical data in clinical medicine. Em: *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 2014. p. 1–5.

18. Arneson W, Brickell J. *Clinical Chemistry: A Laboratory Perspective*. F. A. Davis Company; 2007.
19. Siemens Healthineers. Atellica® Solution Immunoassay & Clinical Chemistry Analyzers [Internet]. [citado 31 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/integrated-chemistry/systems/atellica-solution-analyzers>
20. Anwar-Ul Azim M, Hasan M, Ansari H, Nasreen F. Chemiluminescence Immunoassay: Basic Mechanism and Applications. *Bangladesh J Nucl Med* [Internet]. 2015;18:171–8. Disponível em: www.siemens.diagnostics
21. Larson DL. *Clinical Chemistry: Fundamentals and Laboratory Techniques*. Elsevier/Saunders; 2017.
22. Clarke W, Sokoll LJ, Rai AJ. Immunoassays. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* [Internet]. 1 de Janeiro de 2020 [citado 20 de Setembro de 2024];201–14. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128154991000120>
23. Direção Geral da Saúde. Norma n.º 070/2011 de 30/12/2011: Indicações para Prescrição do Ionograma [Internet]. 2011. Disponível em: www.dgs.pt
24. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Saunders; 2015.
25. Siemens Healthineers. Proteína Total II (TP). 2017.
26. Siemens Healthineers. Albumina (Alb). 2017.
27. Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry Principles, Techniques, and Correlations*.
28. Michelle Mouri A, Badireddy Affiliations M. Hyperglycemia [Internet]. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/?report=printable>
29. Direção Geral da Saúde. Norma n.º002/2011: Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus [Internet]. 2011. Disponível em: www.dgs.pt
30. Siemens Healthineers. Glicose hexoquinase_3 (GluH_3). 2017.
31. Siemens Healthineers. Insulina (IRI). 2017.
32. Siemens Healthineers. Péptido C (CpS). 2017.
33. Siemens Healthineers. Colesterol_2 (Chol_2). 2017.
34. Siemens Healthineers. Triglicéridos (concentrado) (Trig). 2017.
35. Elshourbagy NA, Meyers H V., Abdel-Meguid SS. Cholesterol: The Good, the Bad, and the Ugly - Therapeutic Targets for the Treatment of Dyslipidemia. Vol. 23, *Medical Principles and Practice*. S. Karger AG; 2014. p. 99–111.
36. Siemens Healthineers. Colesterol LDL Direto (DLDL). 2017.
37. Sociedade Europeia de Cardiologia. *Dislipidemias. Recomendações para o Tratamento De Dislipidemias: Modificação dos Lípidos para Redução do Risco*. 2021.

38. Turner NN, Lameire N, Goldsmith DJ, Winearls CG, Himmelfarb J, Remuzzi G. Oxford Textbook of Clinical Nephrology [Internet]. Oxford University Press; 2016. Disponível em: www.oxfordmedicine.com
39. Siemens Healthineers. Creatinina_2 (Crea_2). 2017.
40. Azoto Ureico (UN_c).
41. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 23.^a ed. Elsevier; 2017.
42. Siemens Healthineers. Bilirrubina total_2 (TBil_2). 2017.
43. Siemens Healthineers. Bilirrubina direta 2 (DBil_2). 2017.
44. Ameri M, Schnaars H, Sibley J, Honor D. Comparison of the vanadate oxidase method with the diazo method for serum bilirubin determination in dog, monkey, and rat. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23:120–3.
45. Siemens Healthineers. Aspartato Aminotransferase (AST). 2017.
46. Siemens Healthineers. Alanina Aminotransferase (ALT). 2017.
47. Siemens Healthineers. Fosfatase alcalina, concentrada (ALP_2c). 2017.
48. Siemens Healthineers. Gama-glutamil transferase (GGT). 2017.
49. Siemens Healthineers. Hormona Estimulante da Tireoide 3-Ultra (TSH3-UL). 2017.
50. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM. Clinical biochemistry of the cardiovascular system. Em: *Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 2014. p. 737–66.
51. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 13 de Novembro de 2018;138(20):e618–51.
52. Omran F, Kyrou I, Osman F, Lim VG, Randeva HS, Chatha K. Cardiovascular Biomarkers: Lessons of the Past and Prospects for the Future. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
53. Siemens Healthineers. Troponina I de Alta Sensibilidade (TnIH). 2017.
54. Siemens Healthineers. Mioglobina (MYO). 2017.
55. Henriques S, Lélis M, Jesus H, Araújo JN. Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas. 2006;13.
56. Siemens Healthineers. Creatina Quinase MB (CKMB). 2017.
57. Sociedade Europeia de Cardiologia. Insuficiência Cardíaca: Recomendações de 2021 para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca aguda e crónica [Internet]. 2021. Disponível em: www.spc.pt
58. Siemens Healthineers. NT-proBNP (PBNP). 2017.

59. McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrinology of Reproduction. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition. 1 de Janeiro de 2019;1-24.e8.
60. Siemens Healthineers. Hormona luteinizante (LH). 2017.
61. Siemens Healthineers. Hormona folículo-estimulante (FSH). 2017.
62. Siemens Healthineers. Progesterona (PRGE). 2017.
63. Siemens Healthineers. Testosterona II (TSTII). 2017.
64. Siemens Healthineers. hCG Total (ThCG). 2017.
65. Magro AM, Bento RS. Marcadores tumorais. Med Interna (Bucur). 1997;4:189–96.
66. Siemens Healthineers. Antígeno Específico da Próstata (PSA). 2017.
67. Siemens Healthineers. Antígeno Carcinoembrionário (CEA). 2017.
68. Dasgupta A, Wahed A. Renal Function Tests. Em: Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control [Internet]. Elsevier; 2014. p. 197–212. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124078215000115>
69. Siemens Healthineers. Atellica 1500 Automated Urinalysis System [Internet]. [citado 8 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/urinalysis/systems/atellica-1500-automated-urinalysis-system>
70. Brunzel NA. Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis. 4.^a ed. Elsevier; 2018.
71. Turgeon ML. Immunology & Serology in Laboratory Medicine [Internet]. 4.^a ed. Elsevier Inc.; 2009. Disponível em: <http://evolve.elsevier.com/Turgeon/immunology/>
72. Thermo Fisher. Overview of ELISA [Internet]. [citado 16 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
73. EUROIMMUN. EUROIMMUN ELISAs [Internet]. [citado 16 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/elisa/>
74. Bio-Rad. ELISA Basics Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc.;
75. EUROIMMUN. Anti-dsDNA-NcX ELISA (IgG) Instruções do Teste. 2015.
76. Sebia. HYDRAGEL 54 PROTEIN(E). 2020.
77. Thermo Fisher. Overview of Protein Eletrophoresis [Internet]. [citado 18 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html>
78. Dasgupta A, Wahed A. Protein Electrophoresis and Immunofixation. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. 1 de Janeiro de 2014;391–406.

79. Vavricka SR, Burri E, Beglinger C, Degen L, Manz M. Serum protein electrophoresis: An underused but very useful test. Vol. 79, Digestion. 2009. p. 203–10.
80. Keren, David F. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. Hodder Arnold; 2003.
81. Silva RO de P e, Lopes A de F, Faria RMD de. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Revista Médica de Minas Gerais. 2008;18(2):116–22.
82. Rajkumar SV, Dispenzieri A. Multiple Myeloma and Related Disorders. Em: Abeloff's Clinical Oncology. 6.^a ed. Elsevier Inc.; 2020. p. 1884–910.
83. Sebia. HYDRAGEL 1, 2, 4 & 9 IF. 2021.
84. Beetham R. Detection of Bence-Jones protein in practice. Ann Clin Biochem. 2000;37(5):563–70.
85. Sebia. HYDRAGEL 1, 2, 4 & 9 BENICE JONES. 2021.
86. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nat Rev Microbiol. 1 de Março de 2021;19:141–54.
87. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2020.
88. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. Nat Mater. 1 de Maio de 2021;20(5):593–605.
89. Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Em: Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science. IntechOpen; 2020.
90. Chittoor-Vinod V. Molecular Biology of PCR Testing for COVID-19 Diagnostics. Em: Biotechnology to Combat COVID-19. IntechOpen; 2022.
91. Buckingham L, Flaws ML. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. F. A. Davis Company; 2007.
92. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. Vol. 13, Genes. MDPI; 2022.
93. Direção Geral da Saúde. Orientação n.º 015/2020. COVID-19: Diagnóstico Laboratorial. 2020.
94. Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. COVID-19: diagnóstico molecular de infeção por SARS-CoV-2 [Internet]. 2020 [citado 23 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.ihmt.unl.pt/covid-19-diagnostico-molecular-de-infecao-por-sars-cov-2/>
95. Abbott. SARS-CoV-2 AMP Kit [Internet]. [citado 25 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/137979/download>
96. Abbott. Discover Alinity [Internet]. [citado 20 de Agosto de 2024]. Disponível em: <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/alinity.html>

97. Perchetti GA, Pepper G, Shrestha L, LaTurner K, Yae Kim D, Huang ML, et al. Performance characteristics of the Abbott Alinity m SARS-CoV-2 assay. *Journal of Clinical Virology*. 1 de Julho de 2021;140.
98. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat KH, et al. COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. Vol. 12, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022.
99. Ribeiro E, Brito M. COVID-19 laboratory diagnosis: the whole truth, so far. *Saúde & Tecnologia* [Internet]. 22 de Julho de 2022 [citado 27 de Agosto de 2024]; Disponível em: <https://journals.ipl.pt/stecnologia/article/view/524>
100. Direção Geral da Saúde. Norma n.º 004/2020. Abordagem das Pessoas com suspeita ou confirmação de COVID-19.
101. Krleza JL, Honovic L, Tanaskovic JV, Podolar S, Rimac V, Jokic A. Post-analytical laboratory work: National recommendations from the working group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Vol. 29, *Biochemia Medica*. Biochemia Medica, Editorial Office; 2019.
102. Ordem dos Farmacêuticos, Associação Portuguesa de Análises Clínicas. Normas para o Laboratório Clínico. Sistema de gestão da qualidade para os laboratórios clínicos. 2016.
103. World Health Organization. Laboratory Quality Management System : Handbook. World Health Organization; 2011.
104. SYNLAB. Manual do Sistema de Gestão da Qualidade. 2019.

Parte II

1. Rocha R, Grupo de Estudo da Vacina do HPV, Verdasca N. Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano (HPV) numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa [Internet]. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I, editor. Vol. 18. *Boletim Epidemiológico Observações*; 2017. p. 4–9. Disponível em: www.insa.pt
2. SNS 24. Vírus do papiloma humano (HPV) [Internet]. [citado 16 de Outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/virus-do-papiloma-humano-hpv/>
3. Dinleyici EC, Borrow R, Safadi MAP, van Damme P, Munoz FM. Vaccines and routine immunization strategies during the COVID-19 pandemic. Vol. 17, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 400–7.
4. Habas K, Nganwuchu C, Shahzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Vol. 18, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 1201–11.
5. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. Vol. 772, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 3–12.

6. Jain M, Yadav D, Jarouliya U, Chavda V, Yadav AK, Chaurasia B, et al. *Epidemiology, Molecular Pathogenesis, Immuno-Pathogenesis, Immune Escape Mechanisms and Vaccine Evaluation for HPV-Associated Carcinogenesis*. Vol. 12, *Pathogens*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
7. McBride AA. *Oncogenic human papillomaviruses*. Vol. 372, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing; 2017.
8. Graham S V. *The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review*. Vol. 131, *Clinical Science*. Portland Press Ltd; 2017. p. 2201–21.
9. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. *Consenso Nacional sobre Vacinas contra HPV*. 2017.
10. IARC Information Centre. *Human Papillomavirus and Related Diseases Report in the World* [Internet]. 2023 Mar. Disponível em: www.hpvcentre.net
11. IARC Information Centre. *Human Papillomavirus and Related Diseases Report in Portugal* [Internet]. 2023 Mar. Disponível em: www.hpvcentre.net
12. Pista A, De Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O. *Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Stud*. *International Journal of Gynecological Cancer*. Agosto de 2011;21(6):1150–8.
13. Langsfeld E, Laimins LA. *Human Papillomaviruses: Research Priorities for the Next Decade*. *Trends Cancer*. Maio de 2016;2(5):234–40.
14. Roden RBS, Stern PL. *Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer*. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:240–54.
15. Kines RC, Schiller JT. *Harnessing Human Papillomavirus' Natural Tropism to Target Tumors*. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
16. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda GA, Zhou Y, et al. *Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation*. *Front Public Health*. 20 de Janeiro de 2021;8.
17. Mlynarczyk-Bonikowska B, Rudnicka L. *HPV Infections—Classification, Pathogenesis, and Potential New Therapies*. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
18. Zayats R, Murooka TT, McKinnon LR. *HPV and the Risk of HIV Acquisition in Women*. Vol. 12, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
19. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, et al. *HPV infection in the oral cavity: Epidemiology, Clinical Manifestations and Relationship with Oral Cancer*. Vol. 3. *ORAL & Implantology*; 2017. p. 209–20.
20. Liga Portuguesa Contra o Cancro. *Cancro do Colo do Útero* [Internet]. [citado 8 de Outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.hpv.pt/cancro-do-colo-do-utero/>

21. Molina MA, Steenberg RDM, Pompe A, Kenyon AN, Melchers WJG. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. Vol. 30, Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2024. p. 890–902.
22. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. Vol. 55, Medicina (Lithuania). MDPI AG; 2019.
23. Yousefi Z, Aria H, Ghaedrahmati F, Bakhtiari T, Azizi M, Bastan R, et al. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. Front Immunol. 27 de Janeiro de 2022;12.
24. World Health Organization. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention : use of dual-stain cytology to triage women after a positive test for human papillomavirus (HPV) [Internet]. 2.^a ed. World Health Organization; 2024 [citado 24 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091658>
25. WHO. Human papillomavirus (HPV) nucleic acid amplification tests (NAATs) to screen for cervical pre-cancer lesions and prevent cervical cancer. World Health Organization; 2022. p. 51.
26. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. Nat Rev Dis Primers. 1 de Dezembro de 2016;2.
27. Comissão de Vacinas da SIP-SPP. Recomendações sobre Vacinas Extra Programa Nacional de Vacinação [Internet]. 2020 Set [citado 26 de Julho de 2024]. Disponível em: <https://www.sip-spp.pt/agenda/noticias/recomendacoes-sobre-vacinas-extra-programa-nacional-de-vacinacao/>
28. Centro Hospitalar de Entre Douro e Vouga. Rastreamento do Cancro do Colo do Útero – RCCU [Internet]. [citado 22 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.chedv.min-saude.pt/gineobstetricia/ginecologia-2/patologia-do-colo-do-utero/rccu/>
29. Direção-Geral da Saúde. Norma n.º. 018/2020. Programa Nacional de Vacinação 2020. [Internet]. 2020 Set. Disponível em: www.dgs.pt
30. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. Expert Rev Clin Pharmacol. 2021;14(5):601–21.
31. Rashid F, Xie Z, Suleman M, Shah A, Khan S, Luo S. Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. Front Immunol. 8 de Agosto de 2022;13.
32. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. Journal of Gene Medicine. 1 de Fevereiro de 2021;23(2).
33. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural

- genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1 de Outubro de 2020;1866(10).
34. Meirson T, Bomze D, Markel G. Structural basis of SARS-CoV-2 spike protein induced by ACE2. *Bioinformatics* [Internet]. Março de 2021;37(7):929–36. Disponível em: <https://github.com/Grantlab/bio3d>
 35. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci* [Internet]. 13 de Junho de 2021;30(6):1114–30. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.4075>
 36. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses.* Junho de 2021;13(6).
 37. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* Março de 2021;19(3):155–70.
 38. Hillen HS. Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase. *Curr Opin Virol.* 1 de Junho de 2021;48:82–90.
 39. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Krishnan UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. Vol. 179, *Biochimie.* Elsevier B.V.; 2020. p. 85–100.
 40. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* Julho de 2020;324(8):782–93.
 41. WHO. WHO COVID-19 Dashboard [Internet]. [citado 25 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=o>
 42. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. Vol. 215, *Clinical Immunology.* Academic Press Inc.; 2020.
 43. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 1 de Dezembro de 2020;41(12):1100–15.
 44. Murgolo N, Therien AG, Howell B, Klein D, Koeplinger K, Lieberman LA, et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathog.* 17 de Fevereiro de 2021;(2).
 45. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Janeiro de 2022;23:3–20.
 46. Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P, et al. Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Mol Cell.* 3 de Setembro de 2020;79(5):710–27.

47. Pizzato M, Baraldi C, Boscato Sopetto G, Finozzi D, Gentile C, Gentile MD, et al. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. *Frontiers in Virology*. 12 de Janeiro de 2022;1.
48. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. 2021;13.
49. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. Março de 2021;19(3):141–54.
50. Chilamakuri R, Agarwal S. Covid-19: Characteristics and therapeutics. *Cells*. Janeiro de 2021;10:1–29.
51. Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *The Lancet*. 19 de Fevereiro de 2022;399(10326):757–68.
52. Direção Geral da Saúde. Norma n.º19/2020. Estratégia Nacional de Testes para SARS-CoV-2 [Internet]. 2020. Disponível em: www.dgs.pt
53. Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 1 de Março de 2021 [citado 27 de Setembro de 2024];170:1–25. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7759095/>
54. Krittanawong C, Maitra N, Kumar A, Hahn J, Wang Z, Carrasco D, et al. COVID-19 and preventive strategy. *Am J Cardiovasc Dis* [Internet]. 2022 [citado 27 de Setembro de 2024];12(4):153–69. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9490164/>
55. Yadav T, Kumar S, Mishra G, Saxena SK. Tracking the COVID-19 vaccines: The global landscape. *Hum Vaccin Immunother*. 2023;19(1).
56. Mahase E. Covid-19: Where are we on vaccines and variants? *BMJ*. 2 de Março de 2021;372.
57. Infarmed. COVID-19 Vacinas aprovadas (quadro-resumo) [Internet]. [citado 26 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/vacinas-aprovadas>
58. Guimarães M, Correia R, Vargas S, Froes F. COVID-19 Vaccination in the Portuguese Medical Community: An Unprecedented Campaign Coordinated by the Portuguese Medical Association. *Acta Med Port*. 1 de Março de 2023;36(3):149–52.
59. Direção Geral da Saúde. Plano de Vacinação contra a COVID-19 [Internet]. 2020 Dez [citado 27 de Setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2020/12/04/plano-de-vacinacao-contr-a-covid-19/>
60. Diário da República. Portaria n.º 201/2024/1, de 4 de setembro [Internet]. Diário da República n.º 171/2024, Série I de 2024-09-04 Set 4, 2024. Disponível em: Diário da República n.º 171/2024, Série I de 2024-09-04
61. Direção Geral da Saúde. Norma n.º 08/2024. Estratégia de Vacinação contra a COVID-19. 2024.

62. Ali I. Impact of COVID-19 on vaccination programs: adverse or positive? *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(11):2594–600.
63. World Health Organization. WHO and UNICEF warn of a decline in vaccinations during COVID-19 [Internet]. [citado 11 de Outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/15-07-2020-who-and-unicef-warn-of-a-decline-in-vaccinations-during-covid-19>
64. Daniels V, Saxena K, Roberts C, Kothari S, Corman S, Yao L, et al. Impact of reduced human papillomavirus vaccination coverage rates due to COVID-19 in the United States: A model based analysis. *Vaccine.* 6 de Abril de 2021;39(20):2731–5.
65. Gountas I, Favre-Bulle A, Saxena K, Wilcock J, Collings H, Salomonsson S, et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on HPV Vaccinations in Switzerland and Greece: Road to Recovery. *Vaccines (Basel).* 25 de Janeiro de 2023;11.
66. Mennini FS, Silenzi A, Marcellusi A, Conversano M, Siddu A, Rezza G. HPV Vaccination during the COVID-19 Pandemic in Italy: Opportunity Loss or Incremental Cost. *Vaccines (Basel).* 16 de Julho de 2022;10.
67. Lima SL de, Divino AKC do A, Silva TM, Carneiro VMS. A possível influência da pandemia da COVID-19 com a oscilação no número de casos de infecção por HPV no Brasil. *Research, Society and Development.* 15 de Janeiro de 2024;13(1).
68. Direção Geral da Saúde. Comunicado n.º. C160_80_v1. Cumprimento do Programa Nacional de Vacinação durante a epidemia de COVID-19 - Medidas de exceção. Mar 25, 2020.
69. Direção-Geral da Saúde. Boletim n.º.4 Programa Nacional de Vacinação. 2021.