

**Avaliação do impacto das medidas de
contenção da transmissão de SARS-CoV-2 na
incidência de infeções respiratórias na época
2020-21**

Carolina de Matos Pombo Afonso

Versão final após defesa
Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Dr. Rui Pedro Antunes Alves Teixeira
Co-orientador: Prof. Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

julho de 2021

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Rui Teixeira, agradeço por ter aceite fazer parte deste projeto e por me ter ensinado e guiado.

Á Dra. Débora Rodrigues, que me ensinou e transmitiu tanto conhecimento, agradeço por toda a ajuda, pelo tempo investido e pela dedicação para tornar este projeto possível.

Á minha coorientadora Professora Ângela Sousa, pelo apoio e por estar sempre disponível para me orientar.

Agradeço à Doutora, Conceição Faria e ao Doutor João Casteleiro pela possibilidade de realizar o projeto e o estágio no Serviço de Patologia Clínica.

Agradeço a todas as pessoas que trabalham no Serviço de Patologia Clínica por toda a ajuda, ensinamentos e disponibilidade durante estes meses

Á minha colega de estágio e amiga, Ana Luísa, agradeço muito por toda a companhia, pelo apoio e pela amizade. Sem ti não teria sido uma experiência tão incrível, vais ser sempre a minha companheira do laboratório e das horas de almoço.

Á minha família, em especial aos meus pais, agradeço por me apoiarem sempre a cada decisão tomada, agradeço a confiança, a força, a coragem, o incentivo e compreensão que me deram durante este estágio e durante a vida toda.

Ao meu namorado, agradeço a paciência, o carinho e o apoio que me deste, mesmo a quilómetros de distância. Obrigada pela felicidade de todos os dias.

Aos meus amigos, agradeço por estarem sempre aqui, desde sempre, para me ouvir, apoiar e ajudar naquilo que podem. São uma das minhas grandes forças.

Resumo

Para o controlo da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, foram adotadas medidas de prevenção da transmissão viral. Fazem parte destas medidas de transmissão viral o uso de máscara, a higienização frequente das mãos, o distanciamento físico de 1,5 a 2 metros, a limpeza rigorosa de superfícies, a higiene respiratória, testagem, rastreamento de contactos e isolamento. Outras medidas como confinamento, teletrabalho e proibição de circulação entre concelhos também foram adotadas.

Foram analisados os testes para diagnóstico de vírus respiratórios, como Influenza, VSR, Parainfluenza, Metapneumovírus, Adenovírus e Enterovírus, desde 1 de janeiro de 2018 a 30 de março de 2021 e as amostras foram submetidas a técnicas de RT-PCR como método de diagnóstico preferencial.

Os dados indicam que a partir do mês de abril de 2020 vírus como Influenza, VSR, Metapneumovírus e Parainfluenza não foram detetados em amostras do CHUCB. Os vírus Adenovírus e Enterovírus foram os únicos vírus detetados.

Podemos concluir que as medidas adotadas para a mitigação do SARS-CoV-2 poderão ter mitigado também a transmissão dos vírus que apresentam vias aéreas de disseminação. Os vírus que apresentam outras vias alternativas á via aérea, como a via de transmissão oral-fecal continuaram a ser detetados. Esta avaliação do impacto das medidas carece de mais estudos, como por exemplo, a avaliação do impacto sem estas medidas na população.

Palavras-chave

SARS-CoV-2;medidas de prevenção;vírus respiratórios;deteção; RT-PCR

Abstract

In order to control the pandemic caused by SARS-CoV-2, which causes de COVID-19 disease, some measures were taken to prevent viral transmission. These measures include wearing mask, hand hygiene, physical distance of 1,5 to 2 meters, strict cleaning surfaces, respiratory hygiene, testing, contact tracking and isolation. Other measures were also taken like confinement, teleworking and forbiding travelling between cities.

Tests for the diagnosis of respiratory viruses, such as Influenza, RSV, Parainfluenza, Metapneumovirus, Adenovirus and Enterovirus, from January 1, 2018 to March 30, 2021 were evaluated and how they were subjected to RT-PCR techniques as the preferred diagnosis. The data indicate that as of April 2020, viruses such as Influenza, RSV, Metapneumovirus and Parainfluenza were not detected by CHUCB. The adenovirus and enterovirus viruses were the only viruses detected. Data indicates that as of April 2020, virus such as Influenza, RSV, Metapneumovirus and Parainfluenza were not detected by CHUCB. Adenovirus and enterovirus viruses were the only viruses detected.

We can conclude that the measures adopted to mitigate SARS-CoV-2 may also mitigated the transmission of viruses that have airways of dissemination. Viruses that present other alternative routes to the airways, such as the fecal-oral route of transmission, continued to be detected. This assessment of the impact of the measures requires further studies, such as, the assessment of the impact without these measures on the population.

Keywords

SARS-CoV-2;preventing measures;respiratory virus;RT-PCR

Índice

Capítulo 1: Avaliação do impacto das medidas de contenção da transmissão de SARS-CoV-2 na incidência de infecções respiratórias na época 2020-21	1
1. Introdução	1
1.1) Infecções Respiratórias	1
1.2) Caracterização dos Agentes Virais Causadores de Infecção Respiratória	1
1.2.1) Coronavírus	1
1.2.1.1) SARS-CoV-2	1
1.2.2) Influenza	2
1.2.3) Vírus Sincicial Respiratório	3
1.2.4) Parainfluenza	4
1.2.5) Enterovírus	4
1.2.6) Adenovírus	4
1.2.7) Metapneumovírus	5
1.3) Citopatogenicidade e Transmissibilidade do SARS-CoV-2	5
1.4) Medidas Preventivas Adotadas para Mitigação da Transmissão de SARS-CoV-2	7
1.5) Teste de Diagnóstico dos Agentes Infeciosos	8
2. Objetivo	10
3. Material e Métodos	11
3.1) Amostra	11
3.2) Desenho do Estudo	11
3.3) Extração dos Ácidos Nucleicos	11
3.4) Detecção dos Ácidos Nucleicos	12
3.4.1) Xpert® Xpress Flu/RSV e Xpert® Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV	12
3.4.2) Allplex™ Respiratory Panel 1, 2 e SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV	12
3.5) Análise de Dados	14
4. Tratamento de Resultados	15
4.1) Distribuição Anual dos Testes Realizados	15
4.2) Distribuição de Testes por Idade do Utente	16
4.3) Caracterização Anual de Testes Positivos e Negativos	19
4.4) Caracterização dos Anual Casos Positivos	24
4.4.1) Influenza	24
4.4.2) Vírus Sincicial Respiratório	25
4.4.3) Parainfluenza e Metapneumovírus	26

4.4.4) Adenovírus e Enterovírus	27
5. Discussão	29
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	32
Capítulo 2: Relatório de Estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário da Beira Interior	35
1. Caracterização do Centro Hospitalar Universitário da Beira Interior	35
2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica	35
3. Microbiologia	35
3.1) Contextualização teórica	35
3.2) Microscopia	36
3.3) Colorações	37
3.3.1) Coloração de Gram	37
3.3.2) Coloração de Zhiel-Neelsen	38
3.3.) Citospin	39
3.4) Meios de Cultura	39
3.5) Amostras Biológicas	45
3.5.1) Urina	45
3.5.2) Fezes	45
3.5.2.1) Testes Rápidos Imunocromatográficos	46
3.5.3) Aparelho Respiratório	50
3.5.3.1) Expetoração e secreções brônquicas	50
3.5.3.2) Lavado Bronco-alveolar e Aspirado Brônquico	50
3.5.4) Hemocultura	51
3.5.5) Cateter	52
3.5.6) Exsudado vaginal e uretral	52
3.5.7) Líquidos biológicos	53
3.5.7.1) Líquido pleural	53
3.5.7.2) Líquido ascítico	53
3.5.7.3) Líquido sinovial ou articular	54
3.5.7.4) Líquido Cefalorraquidiano	54
3.5.8) Pús	55
3.5.9) Esperma	56
3.5.10) Biópsia	56
3.6) Testes de Identificação Microbiana Manual	56
3.6.1) Teste da Catalase	56

3.6.2) Teste da Coagulase	57
3.6.3) Tipagem de <i>Streptococcus β hemolíticos</i>	57
3.6.4) Teste de Inibição à Bacitracina	58
3.6.5) Teste de Resistência à Novobiocina	58
3.6.6) Teste de Resistência à Optoquina	59
3.6.7) Teste dos Fatores X, V, XV	59
3.7) Testes Serológicos	60
3.7.1) Identificação de Antígenos Febris	60
3.7.2) Identificação Serológica de Brucella	60
3.7.3) Diagnóstico Serológicos da Sífilis	60
3.8) Testes de Identificação Automática e Antibiograma	61
3.9) Testes de Biologia Molecular	62
3.9.1) Xpert® Carba-R	63
3.9.2) Xpert® CT/NG	64
3.9.3) Xpert® Flu	64
3.9.4) Xpert® MTB/RIF	65
3.9.5) Xpert® MRSA	65
4. Hematologia	66
4.1) Contextualização teórica	66
4.2) Hematimetria	68
4.3) Colorações Citológicas	70
4.4) Hemoglobina Glicada	73
4.5) Hemostase Primária	74
4.6) Hemostase Secundária	74
4.7) Testes de Biologia Molecular	78
4.7.1) Teste Xpert® HemosIL® FII & FV	78
4.7.2) Teste Xpert® BCR-ABL Ultra	78
4.8) Velocidade de Sedimentação	79
4.9) Citometria de Fluxo	79
5. Imunoquímica	81
5.1) Contextualização teórica	81
5.2) Equipamento Cobas® série 8000	82
5.3) Equipamento Cobas® e411	83
5.4) Equipamento ARCHITECT i2000sSR	84
5.5) Equipamento Phadia™ 250	85
5.6) Equipamento Atellica® NEPH 630 System	86
5.7) Eletroforese de Proteínas	86
5.7.1) Proteinograma	86

5.7.2) Imunofixação	87
5.7.2.1) Imunofixação Sérica	88
5.7.2) Imunofixação Urinária	89
5.8) Análise do Sedimento	90
5.9) Testes de Biologia Molecular	90
5.9.1) Carga Viral do HIV	90
5.9.2) Carga Viral do HBV	90
5.10) Imunoensaios Cromatográficos	91
5.10.1) Testes das Drogas de Abuso	91
5.10.2) Teste de Gravidez	91

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo de entrada nas células e respetiva citopatogenicidade do SARS-CoV-2.....	6
Figura 2: Medidas de prevenção na mitigação da pandemia.....	7
Figura 3: Etapas da reação PCR.....	9
Figura 4: Etapas do Sistema Allplex™.....	13
Figura 5: Distribuição anual de testes para Influenza .	15
Figura 6: Distribuição anual de testes para VSR.....	16
Figura 7: Distribuição anual de testes para Metapneumovírus, Parainfluenza, Adenovírus e Enterovírus.....	16
Figura 8: Distribuição de testes por idade em 2018.....	17
Figura 9: Distribuição de testes por idade em 2019.....	17
Figura 10: Distribuição de testes por idade em 2020.....	18
Figura 11: Distribuição de testes por idade em 2021.....	18
Figura 12: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para VSR..	19
Figura 13: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para Influenza.....	20
Figura 14: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para Parainfluenza.....	21
Figura 15: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para Metapneumovírus.....	22
Figura 16: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para Enterovírus.....	23
Figura 17: Caracterização das percentagens de testes positivos e negativos para Adenovírus.....	24
Figura 18: Caracterização dos casos detetáveis de Influenza.....	25
Figura 19: Caracterização dos casos detetáveis de VSR.....	26
Figura 20: Caracterização dos casos detetáveis de Metapneumovírus e Parainfluenza.	27
Figura 21: Caracterização dos casos detetáveis de Enterovírus e Adenovírus	28
Figura 22: Parede celular de bactérias Gram negativo e positivo.....	37
Figura 23: Equipamento PREVI® Color Gram.....	38
Figura 24: Equipamento Aerospray® TB Series 2.....	39
Figura 25: Meio de Todd -Hewitt.....	40
Figura 26: Meio de Gelose Sangue.....	41
Figura 27: Meio de Manitol Sal.....	41
Figura 28: Meio Candida.....	41
Figura 29: Meio MacConkey.....	42
Figura 30: Meio MRSA.....	42

Figura 31: Métodos de inoculação.....	43
Figura 32: Procedimento Fecal Ocult Blood Rapid test.....	46
Figura 33: Procedimento do teste Pylori-Strip.....	48
Figura 34: Cassete do teste C. DIFF QUIK CHEK®.....	49
Figura 35: Garrafas de hemocultura.....	51
Figura 36: Câmara de Nageotte.....	55
Figura 37: Teste da catalase.....	57
Figura 38: Teste da coagulase.....	57
Figura 39: Procedimento do teste Remel™ PathoDxtra™ Strep Grouping Kit.....	58
Figura 40: Teste da optoquina.....	59
Figura 41: Equipamento ID/AST VITEK® e cartas de identificação.....	61
Figura 42: Equipamento Gene Xpert® e cartuxo.....	63
Figura 43: Formação das células sanguíneas.....	65
Figura 44: Fluxo de trabalho da secção de hematologia.....	67
Figura 45: Equipamento Unicel DxH 800 Beckman Coulter.....	70
Figura 46: Equipamento Aerospray® TB Series 2 e técnica de esfregaço.....	71
Figura 47: Amostras que sofreram coloração.....	72
Figura 48: Equipamento ADAMS™ A1c HA-8180T e cromatograma.....	74
Figura 49: Componentes da hemostase secundária.....	75
Figura 50: Equipamento Sediplus® S 2000 DESAGA e velocidade de sedimentação.....	79
Figura 51: Configuração ótica do equipamento BD FACSCalibur™.....	80
Figura 52: Diagrama do fluxo de trabalho na secção de Imunoquímica.....	81
Figura 53: Equipamento Cobas® p612.....	81
Figura 54: Equipamento Cobas® 8000.....	83
Figura 55: Equipamento Cobas® e411.....	84
Figura 56: Equipamento ARCHITECT i2000SR.....	84
Figura 57: Teste ELISA para dosear IgE.....	85
Figura 58: Teste ELISA para dosear calprotectina.....	86
Figura 59: Proteinograma.....	87
Figura 60: Diagrama do princípio da técnica de imunofixação.....	88
Figura 61: Géis para imunofixação séria e screening.....	89
Figura 62: Géis para perfil urinário e deteção da proteína Bence-Jones.....	90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Meios de cultura líquidos.....	40
Tabela 2: Meios de cultura sólidos.....	43
Tabela 3: Tipos de ensaios, respetiva descrição e parâmetros analisados no equipamento ACL TOP 500.....	76
Tabela 4: Analitos detetados e quantificados pelos módulos do equipamento cobas® 8000.....	83

Lista de Acrónimos

ACE-2	Enzima conversora da angiotensina 2
ADP	Adenosina difosfato
AL	Anti Lúpico
ALT	Alanina aminotransferase
APTT	Tempo de tromboplastina ativada
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Anti trombina
BAAR	Bactérias ácido-álcool resistentes
C3	Componente 3 do complemento
C4	Componente a do complemento
CA	Antigénio do carcinoma
CoV	Coronavírus
cDNA	DNA complementar
CEA	Antigénio carcinoembrionário
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário da Beira Interior
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CLIA	Quimiluminescência
COVID-19	Doença de coronavírus 2019
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotidos fosfatados
EBV	Vírus Epstein–Barr
ECLIA	Eletroquimoluminescência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FSH	Hormona foliculo-estimulante
FVW	Fator van Willebrand
HÁ	Hemaglutinina
HAV	Vírus da hepatite A
Ig	Imunoglobulina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LH	Hormona luteinizante
LMC	Leucemia Mielóide Crónica
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistentes
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NA	Neuraminidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Proteína C

PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro-BNP	Pré-péptido natriurético do tipo B
PS	Proteína S livre
PSA	Antigénio específico prostático
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da cadeia da polimerase
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SPC	Serviço de Patologia Clínica
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
Tg	Tireoglobulina
TP	Tempo de protrombina
TPO	Tireoperoxidase
TT	Tempo de trombina
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

Capítulo I: Avaliação do impacto das medidas de contenção da transmissão SARS-CoV-2 na incidência de infecções respiratórias na época 2020-21.

1. Introdução

1.1) Infecções Respiratórias

As infecções respiratórias ocorrem frequentemente no trato respiratório superior e nalguns casos estas progridem para o trato respiratório inferior, como a bronquiolite ou pneumonia¹. Este tipo de infecções pode afetar todas as faixas etárias, mas crianças e idosos estão sujeitos a um risco elevado de doença mais grave¹. Vários agentes etiológicos podem causar estas infecções, os mais frequentes são as bactérias, como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza*, e também vírus, como Vírus Sincicial Respiratório (VSR) e Influenza¹. As infecções agudas começam no trato respiratório superior dado que têm como porta de entrada o nariz, a boca ou os olhos¹. A disseminação para o trato respiratório inferior ocorre no intervalo de 2 a 4 dias, em média¹. Os sintomas clínicos podem variar dependendo do agente causador da infecção, e podem ser gripe, faringite, laringobronquite, traqueobronquiolite, bronquiolite e pneumonia¹. A prevenção e tratamento de infecções respiratórias virais incidem na vacinação, no caso do vírus Influenza, no uso de fármacos antivirais e também na aplicação de tratamentos de suporte, como suplementação de oxigénio¹.

1.2) Caracterização dos Agentes Virais Causadores de Infecção Respiratória

1.2.1) Coronavírus

Os coronavírus (CoV) são uma família de vírus de RNA presentes em mamíferos e em aves e que causam infecções respiratórias e intestinais em humanos². Esta família de vírus foi a causa de duas pandemias de larga escala: síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2002 e 2003 na China, e também síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS) em 2012 nos países do Médio Oriente²

1.2.1.1) SARS-CoV-2

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), é um β -coronavírus que foi identificado em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China². A sua caracterização genômica revelou relação próxima com os coronavírus presentes em morcegos e em pangolins, e também foi descrito que a maioria dos doentes apresentava ligação ao mercado Huanan Seafood Wholesale, indicando uma possível origem zoonótica². Este vírus causou uma epidemia de síndrome respiratória aguda grave nesta cidade, e em poucos meses disseminou-se por todo o mundo originando uma pandemia³. Em fevereiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) nomeou a doença como doença de coronavírus de 2019 (COVID-19)³. A transmissão ocorre por exposição direta de gotas ou aerossóis provenientes de uma pessoa infetada, ou pode dar-se por contacto com superfícies contaminadas, tendo como via de entrada as mucosas oral, nasal e oftálmica³.

Os sintomas mais frequentes associados à infeção pelo SARS-CoV-2 são febre, tosse, dores de cabeça ou dores generalizadas no corpo, dificuldade respiratória ou dispneia sem causa atribuível e também perda total ou parcial do olfato, enfraquecimento do paladar ou diminuição de início súbito⁴. Contudo, algumas pessoas não apresentam sintomas e há evidências da transmissão assintomática³.

O diagnóstico para a identificação de pacientes com COVID-19 incide em testes *in vitro*, que têm por base a deteção de ácidos nucleicos característicos do vírus, usando *primers* específicos e a técnica transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-PCR), sendo considerada a técnica de referência². Também podem ser feitos outros testes, como vários imunoenaios serológicos (testes Imunoenzimáticos (ELISA) e testes de quimioluminescência (CLIA))². Estes detetam as proteínas virais do SARS-CoV-2 e detetam anticorpos como IgM e IgG no soro ou no plasma².

1.2.2) Influenza

O vírus Influenza é um vírus de RNA pertencente à família *Orthomyxoviridae* que causa uma das infeções respiratórias mais prevalentes e significantes⁵. Existem três tipos de vírus Influenza que infetam humanos: Influenza A, B e C⁶. O vírus Influenza A infeta várias espécies e é mais suscetível à variação antigénica, e portanto, é a causa das principais pandemias⁶. A superfície do envelope é coberta pelas proteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), proteínas que participam na mudança antigénica através de substituição gradual de aminoácidos, criando novos subtipos de Influenza⁶. Cada subtipo de Influenza A é caracterizado pela numeração das proteínas HA e NA (por exemplo, H1N1, H3N2)⁶.

A transmissão de Influenza atinge o pico nos meses mais frios do ano e acontece através da inalação de partículas respiratórias de uma pessoa infetada. As manifestações clínicas

da infecção são tosse, febre, mialgias e desconforto⁶. Estes sintomas persistem entre dois a oito dias⁶. Pacientes, especialmente adultos mais velhos ou crianças, podem experimentar doença severa devido à infecção viral⁶.

O principal método de prevenção desta infecção é a vacinação da população com risco acrescido e profissionais de saúde⁶. Contudo, há medidas não farmacêuticas individuais que podem ser adotadas, como por exemplo, a lavagem frequente das mãos, etiqueta respiratória e distanciamento físico^{6,7}.

O tratamento de doentes com a infecção por Influenza baseia-se na administração de medicamentos antivirais, como o Oseltamivir, que atua como inibidor da atividade enzimática da proteína viral NA⁷.

O diagnóstico tem como testes referência a detecção de ácidos nucleicos característicos deste vírus com a técnica RT-PCR, através de um método extremamente sensível e específico; ou o isolamento em cultura de células e posterior observação por imunofluorescência ou análise do genoma, essencial para caracterizar o vírus, detetar a sensibilidade deste a medicamentos antivirais e monitorizar “drift” de antigénio⁷. Também existem testes rápidos imunológicos que conseguem detetar antigénios virais na amostra, contudo, são menos sensíveis e suscetíveis a falsos negativos⁷.

1.2.3) Vírus Sincicial Respiratório

O Vírus Sincicial Respiratório da família Pneumoviridae é um vírus de RNA responsável pela maioria das infeções fatais agudas do trato respiratório superior e inferior em bebés e crianças⁸. É um agente que causa epidemias, tendo o seu pico de atividade nos meses de inverno. Geralmente, um dos dois genótipos (A ou B) predomina sazonalmente, e ainda podem alternar ou mesmo co-circular⁸.

A transmissão ocorre através do contacto com as secreções nasofaríngeas de uma pessoa infetada, nomeadamente, gotículas ou aerossóis, tal como os vírus abordados nos pontos anteriores⁸. A apresentação clínica é caracterizada por sintomas gripais, como congestão nasal, febre, tosse e dispneia. Os pacientes podem ser assintomáticos, embora esta condição seja rara em adultos ou idosos⁸.

O diagnóstico preferencial do VSR dá-se por RT-PCR, devido à sensibilidade e especificidade do teste⁸. Contudo, este também pode ser detetado em culturas de células, ensaios de imunofluorescência e também podem ser aplicados testes serológicos⁸. O tratamento da infecção incide na administração de oxigénio e fluidos intravenosos⁸. Recorre-se à terapia passiva de imunização com imunoglobulinas anti-VSR ou anticorpos monoclonais (palivizumab) no caso de crianças com elevado risco de doença grave⁸.

1.2.4) Parainfluenza

Os vírus da Parainfluenza Humana pertencem à família Paramyxoviridae e existem quatro serotipos (1 a 4)⁵. Os serotipos 1 a 3 são associados a infecção no trato respiratório inferior em bebês e crianças, principalmente associada a laringotraqueobronquites, e o serotipo 4 está associado à infecção do trato respiratório superior em crianças e adultos⁵.

O diagnóstico preferencial baseia-se no RT-PCR, embora também se possa considerar a cultura de células e os ensaios de imunofluorescência⁵. Atualmente, ainda não existem agentes antivirais para combater uma infecção por Parainfluenza; quando se trata de uma laringotraqueobronquite podem ser utilizados nebulizadores de ar frio ou quente⁵.

1.2.5) Enterovírus

Os enterovírus, agentes patogênicos exclusivamente para humanos, são vírus de RNA, sem envelope lipídico, que se inserem na família Picornaviridae⁵. Atualmente são classificados de A a D, dependendo da sua estrutura viral⁵.

A sua transmissão dá-se predominantemente por via oral-fecal, quando é ingerido algo contaminado com partículas fecais onde se encontra o agente patogênico, ou então por via respiratória⁵. Os sintomas mais comuns são febre, dor de cabeça, dor de garganta, vômitos e diarreia. A infecção, dependendo do serotipo em questão e da condição do paciente, podem ainda causar meningite asséptica, encefalite, pleurodinia epidêmica e conjuntivite hemorrágica⁵. A técnica de rotina para diagnóstico da infecção causada por este vírus é RT-PCR. Este teste dá-nos a informação da presença do vírus ou permite distinguir o tipo de enterovírus que se encontra presente no paciente⁹.

1.2.6) Adenovírus

Os adenovírus são vírus de DNA, sem envelope lipídico, classificados em sete tipos (A a G) e a sua transmissão ocorre através de aerossóis, via oral-fecal ou contacto com superfícies contaminadas¹⁰. Estes agentes patogênicos afetam principalmente as crianças e tem como principais manifestações clínicas a febre faringoconjuntival, doença respiratória aguda, conjuntivite, ceratoconjuntivite, gastroenterite e diarreia¹⁰.

A sua deteção e diagnóstico dá-se por RT-PCR, contudo também podem ser detetados em amostras de fezes através de ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral¹⁰. A prevenção da disseminação incide em medidas como a etiqueta respiratória e também a cloração das piscinas com o objetivo de prevenir a conjuntivite¹⁰.

1.2.7) Metapneumovírus

O metapneumovírus humano é um vírus de RNA da família Pneumoviridae, tal como o VSR, causando também infecção respiratória aguda, com maior incidência em bebés, crianças e idosos¹¹. Este vírus também é sazonal e o seu pico de incidência é nos meses mais frios, tal como o vírus Influenza e VSR¹¹.

A sua transmissão dá-se por contacto direto com as secreções respiratórias de pessoas infetadas, ou por contacto indireto, através de objetos contaminados com essas secreções. Os sintomas são tosse, rinorreia, febre e dispneia¹¹.

O seu diagnóstico, tal como outros vírus mencionados acima, faz-se pelo método RT-PCR, e o tratamento baseia-se em imunoglobulinas intravenosas com atividade neutralizante contra o vírus¹¹.

1.3) Citopatogenicidade e Transmissibilidade do SARS-CoV-2

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que dependem da maquinaria bioquímica da célula hospedeira para a sua replicação⁵. Conhecimentos sobre a estrutura do vírus (como o tamanho e a morfologia), e a genética (como o tipo e a estrutura do ácido nucleico), providenciam informação acerca da forma como este se replica, como se transmite e que tipo de doença causa⁵.

Estes agentes infecciosos podem entrar no corpo através da pele ou através de membranas mucoepiteliais e replicam-se em células que expressam recetores virais específicos⁵. O reconhecimento e adesão à célula alvo resulta da ligação entre as proteínas virais do envelope ou da cápside e os recetores ancorados na membrana das células⁵. Estes recetores frequentemente são proteínas como proteínas da membrana lipídica, imunoglobulinas, ou mesmo canais e transportadores transmembranares⁵. De seguida dá-se a penetração e internalização do agente patológico dentro da célula alvo⁵.

O SARS-CoV-2 apresenta quatro proteínas estruturais características da família Coronaviridae apresentadas na figura 1, estas são a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E), a proteína da nucleocápside e a proteína do “spike” (S)³. A proteína S permite ao vírus interagir com o recetor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) presente nas células alvo³.

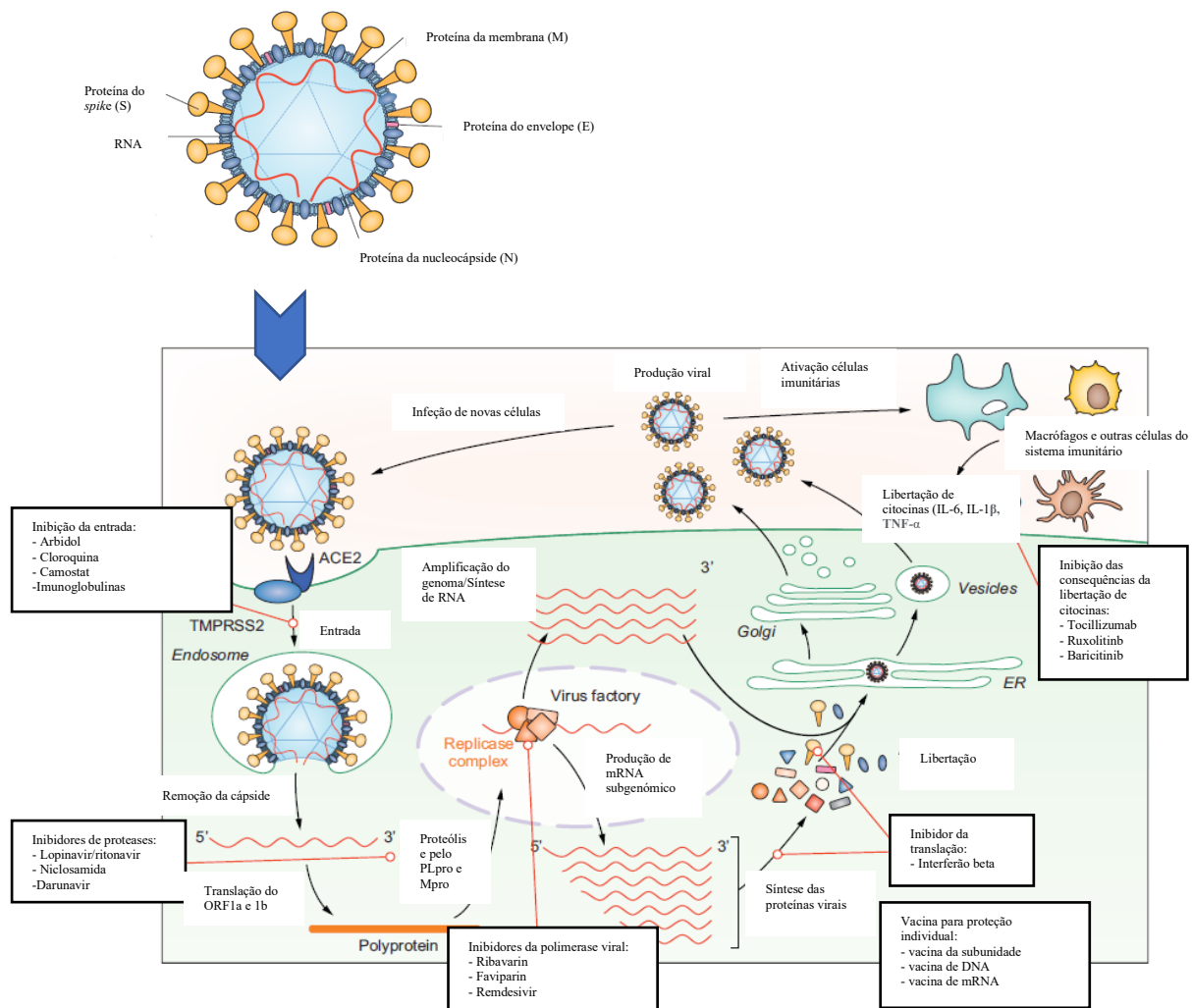


Figura 1: Mecanismo de entrada nas células e respetiva citopatogenicidade do SARS-CoV-2³.

As células epiteliais nasais, células epiteliais das vias aéreas (pneumócitos), células imunitárias dos pulmões, células endoteliais, neurónios, enterócitos, cardiomiócitos, hepatócitos e células dos rins expressam o recetor ACE-2 e a serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), dois fatores importantes da adesão e penetração do vírus³. Desta maneira, o SARS-CoV-2 pode penetrar várias células pertencentes a diversos órgãos, resultando em complicações clínicas³. Quanto maior a expressão destes fatores, maior probabilidade de agravamento de infeção³.

A transmissão deste agente pode ocorrer de forma direta ou indireta. A transmissão direta por gotículas respiratórias é reforçada pela replicação produtiva do SARS-CoV-2 nas células do trato respiratório superior e inferior¹². O número básico de reprodução (R_0) pode ser estimado ao estudar as cadeias de transmissão, focos de infeção ou através da disseminação pela população¹³. O consenso atual estima que o R_0 do SARS-CoV-2 pode atingir valores entre 2 e 3, contudo, a heterogeneidade deste valor pode ser explicada pela variabilidade de transmissão de um indivíduo¹³. O período médio de

incubação, tempo entre a exposição inicial e o desenvolvimento de sintomas, é de 5,7 dias e 99% das infeções ocorrem entre o dia 2 e o dia 14¹³.

1.4) Medidas Preventivas Adotadas para Mitigação da Transmissão de SARS-CoV-2

A procura de uma cura ou a obtenção de uma vacina tornou-se uma prioridade devido à disseminação da infeção globalmente. Contudo, o único método de mitigação da COVID-19 (Figura 2) foram as medidas de prevenção adotadas pelos países¹⁴.

Em Portugal, foi decretado estado de emergência pelo Presidente da República face à situação de saúde pública e à proliferação de casos registados de contágio de COVID-19. A principal medida adotada com este estado de emergência foi o confinamento obrigatório, com exceção de execução de funções essenciais e desempenho de atividades profissionais que não permitem o teletrabalho¹⁵.

Nos meses seguintes foram adotadas várias medidas, como fecho de fronteiras com países da União Europeia, a proibição de circulação entre concelhos, entre outras, perante o número de casos ativos, os internamentos e as mortes por COVID-19. Também se deu o desconfinamento, acompanhado de menor número de medidas de contingência. Contudo, medidas como o uso de máscara em situações de maior risco a partir dos 10 anos de idade¹⁶, o distanciamento físico, a desinfeção regular das mãos, limpeza das superfícies e a higiene respiratória foram implementadas e ainda são obrigatórias até aos dias de hoje.

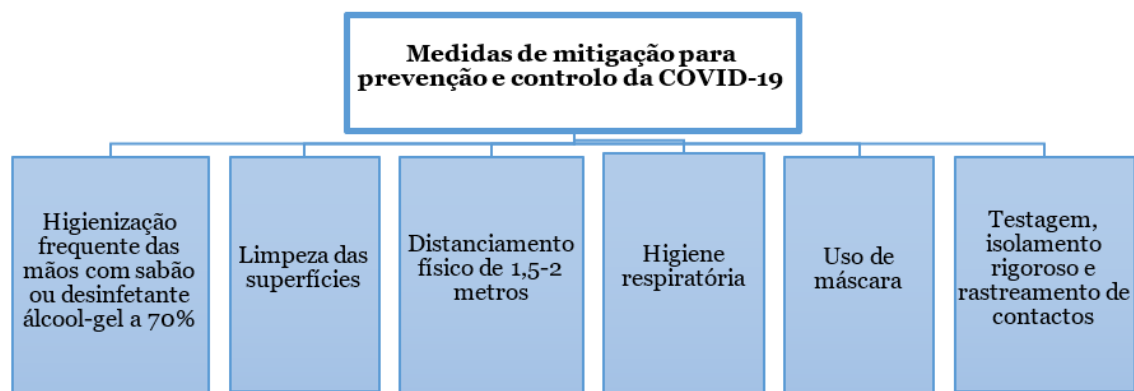


Figura 2: Esquema representativo das medidas de prevenção na mitigação da pandemia¹⁴.

Estas medidas de prevenção individual tornaram-se essenciais até aos dias de hoje para abrandar a transmissão do SARS-CoV-2, este agente etiológico com elevada transmissibilidade por contacto direto ou indireto por indivíduos pré-sintomáticos,

sintomáticos e assintomáticos¹⁷. A formulação de uma vacina tornou-se uma prioridade mundial com o objetivo de aumentar a imunidade humana contra a doença COVID-19¹⁸. Passados onze meses da identificação do agente etiológico SARS-CoV-2 e do seu genoma, a comunidade científica conseguiu desenvolver mais de 300 projetos de vacinas¹⁸. Atualmente, são quatro as vacinas aprovadas pela Agência Europeia do Medicamento (EMA). Comirnaty® e COVID-19 Vaccine Moderna® utilizam ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) veiculado em nanopartículas lipídicas, que entra nas células do hospedeiro induzindo-as a codificar transitoriamente a proteína S (Spike) do vírus SARS-CoV-2¹⁹. As outras duas vacinas, Vaxzevria® e COVID-19 Vaccine Janssen®, possuem um adenovírus recombinante, não replicante, modificado de modo a induzir a expressão local transitória da glicoproteína S do vírus SARS-CoV-2¹⁹.

1.5) Teste de Diagnóstico dos Agentes Infeciosos

A técnica de PCR é uma reação química *in vitro* que permite a síntese de uma determinada sequência de ácidos nucleicos conseguida com a ação da DNA polimerase que, com as condições certas, copia uma cadeia de DNA²⁰. A reação dá-se com dois primers específicos por cada gene pesquisado que se ligam à sequência a detetar, uma DNA polimerase termoestável, uma mistura equimolar de desoxirribonucleotidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), MgCl₂ e tampão Tris-HCl²⁰.

Cada ciclo consiste em três etapas: desnaturação, que é a separação da dupla-hélice do DNA alvo a uma temperatura mais elevada; *annealing*, em que os primers emparelham à sequência alvo a uma temperatura mais baixa; e extensão, onde a DNA polimerase termoestável inicia a síntese da nova cadeia com a mistura de oligonucleotídeos livres (Figura 3)²⁰.

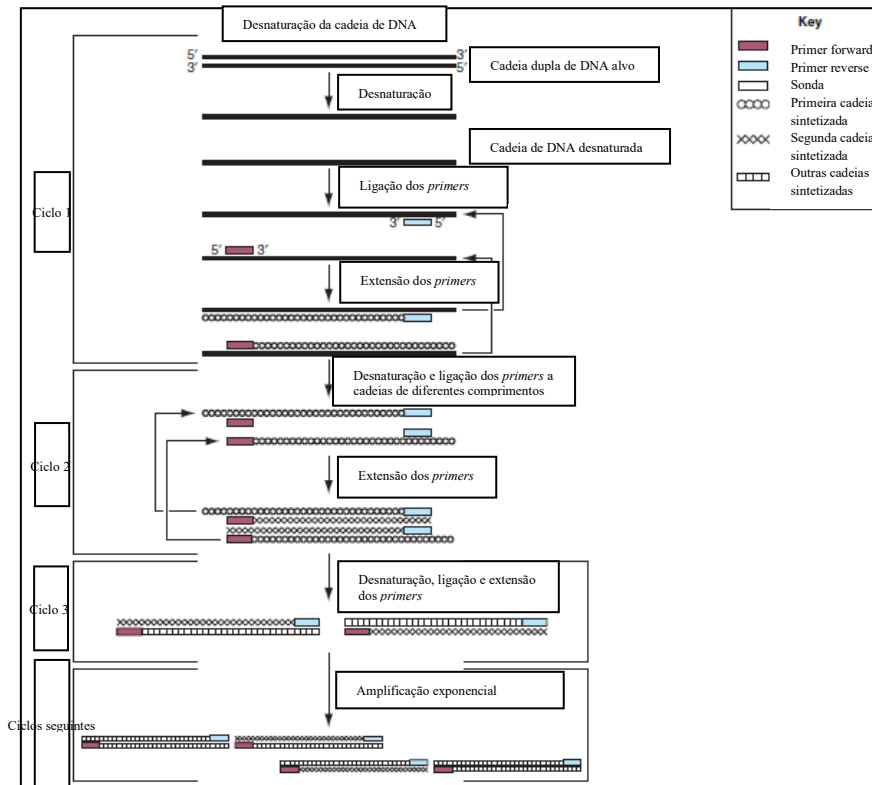


Figura 3: Etapas da reação PCR²⁰.

O método RT-PCR é a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase e foi desenvolvido com o objetivo de amplificar ácidos ribonucleicos (RNA), como por exemplo ácidos nucleicos de vírus²⁰. A amplificação dá-se em duas etapas principais, a primeira é a produção de cDNA a partir do RNA alvo por transcrição reversa, e a segunda etapa é a amplificação do cDNA obtido pela técnica convencional de PCR²⁰. A amplificação do cDNA é realizada com uma enzima termostável, devido às altas temperaturas necessárias nesta etapa do processo²⁰.

Atualmente, o método utilizado para a detecção de ácidos nucleicos virais é a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), um método quantitativo o que permite monitorizar a amplificação de cDNA formado em tempo real por meio do acompanhamento da fluorescência²⁰. Esta fluorescência é conseguida pela adição de corantes fluorescentes, como por exemplo o SYBR Green I, um dos mais utilizados neste método²⁰. É medida após cada ciclo e a intensidade do sinal fluorescente reflete a quantidade de cópias de ácidos nucleicos formados presentes na amostra naquele momento específico²⁰.

2. Objetivo

As infecções virais afetam o trato respiratório e os seus sintomas associados dependem do agente patológico causador da infecção. Vírus como Influenza, VSR, Parainfluenza, Metapneumovírus, Enterovírus e Adenovírus são agentes etiológicos respiratórios que podem provocar síndrome gripal e podem evoluir para quadros de infecção mais graves como pneumonia. A gravidade da doença apresenta variáveis, como por exemplo, a predisposição do paciente e a patogenicidade do agente. Estas infecções respiratórias virais constituem uma das principais causas de morte em todo o mundo, principalmente causadas pelo vírus Influenza.

A transmissão viral destes vírus nos últimos anos segue cursos endêmicos ou epidêmicos, e no caso da estirpe Influenza A H1N1, pandêmico. A transmissão destes vírus ocorre por via aérea, quando partículas ou gotículas respiratórias são expelidas por tosse ou espirros. Os vírus Adenovírus e Enterovírus também se podem disseminar por via oral-fecal, em que é ingerido algo contaminado com partículas fecais.

Em dezembro de 2019 foi identificado um novo coronavírus, posteriormente nomeado SARS-CoV-2, que imediatamente se propagou mundialmente, causando infecções respiratórias. Foi declarada pandemia mundial a 11 de março de 2020 e imediatamente se tomaram medidas preventivas para mitigar a transmissão viral. As principais medidas adotadas foram a etiqueta respiratória, higienização das mãos, uso de máscara, distanciamento físico e também testagem.

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por via aérea, através de partículas respiratórias, á semelhança dos vírus Influenza, VSR, Parainfluenza, Metapneumovírus, Enterovírus e Adenovírus, e por isso, o principal objetivo deste trabalho é verificar se a adoção das medidas de prevenção da transmissão de SARS-CoV-2 influenciaram a transmissão dos restantes vírus respiratórios que normalmente circulam durante o ano. Esta avaliação incidirá na verificação da existência de casos detetados para os vírus no laboratório do CHUCB até ao mês de abril de 2021.

3. Material e Métodos

3.1) Amostra

Os dados utilizados para o estudo foram obtidos através da análise de amostras colhidas no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira. Estas amostras provêm do trato respiratório superior em que é efetuado um exsudado nasal (nasofaringe), ou da parte posterior da garganta (orofaringe), ou ambas, usando uma zaragatoa. Também foram utilizadas secreções respiratórias como aspirado nasofaríngeo e lavado broncoalveolar, amostras mais comuns em idade pediátrica. Estas amostras vêm acompanhadas de pedidos de testes de deteção de infeção respiratória pelos vírus Influenza, Vírus Sincicial Respiratório, Parainfluenza, Metapneumovírus, Enterovírus e Adenovírus. O estudo compreende todas as idades e são analisados dados entre 1 de janeiro de 2018 e abril de 2021.

3.2) Desenho do Estudo

O estudo consiste na análise da incidência de infeções respiratórias nos anos 2020 e 2021 através de testes de deteção do agente etiológico causador de infeção em utentes que recorreram à Urgência Geral ou Pediátrica, ou foram internados num serviço hospitalar. Os resultados obtidos são positivos quando há deteção do ácido nucleico viral e negativos quando não se detetam ácidos nucleicos do vírus a testar.

3.3) Extração dos Ácidos Nucleicos Virais

A extração dos ácidos nucleicos das amostras recolhidas é a primeira etapa de qualquer análise, sendo um passo pré analítico essencial no desenvolvimento e na performance do diagnóstico molecular. A extração consiste:

- i. Lise celular pela disrupção de membranas e paredes celulares;
- ii. Desidratação e precipitação das proteínas celulares;
- iii. Separação das proteínas de outros componentes;
- iv. Precipitação, concentração e purificação dos ácidos nucleicos a extrair.

Existem vários métodos como a extração em fenol clorofórmio, extração em fase sólida e também o método das esferas magnéticas, com os passos mencionados acima em comum, independentemente de kits específicos adotados, casas comerciais e protocolos associados. A otimização da extração é crucial com a finalidade de a tornar simples, rápida, com elevada sensibilidade e seletividade, independentemente do método escolhido pelo laboratório. No laboratório do CHUCB foram utilizados os kits QIAamp

DNA Mini Kit (Qiagen), EZ1 DSP Virus Kit (Qiagen) e MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) para a extração de RNA viral durante o período em estudo.

3.4) Detecção dos Ácidos Nucleicos

No SPC, a detecção dos vírus Influenza, Vírus Sincicial Respiratório, Parainfluenza, Metapneumovírus, Enterovírus e Adenovírus é feita através da detecção dos ácidos nucleicos destes vírus pelo método RT-PCR em tempo real. Após o passo de extração, o RNA viral é adicionado a uma mistura de tampão, dNTPs, enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase e também *primers* específicos.

A detecção da amplificação dos ácidos nucleicos em estudo ocorre à medida que a reação decorre dado que o equipamento usado permite a detecção em tempo real de fluorescência produzida pela amostra, proporcional ao número de cópias que vão sendo amplificadas.

3.4.1) Xpert® Xpress Flu/RSV e Xpert® Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV

O ensaio Xpert® Xpress Flu/RSV realiza-se no equipamento GeneXpert ® e é um ensaio automatizado de RT-PCR em tempo real para detecção qualitativa de RNA viral de Influenza A, Influenza B e VSR. As amostras para teste são zaragatoas ou secreções em meio de transporte viral. 300 µL desta suspensão são transferidos para o cartucho e introduzido no equipamento com a devida identificação. Os cartuchos de ensaio integram a extração, purificação e amplificação de ácidos nucleicos, e a detecção das sequências alvo. Os *primers* e as sondas são específicos para amplificação de sequências nos genes que codificam para as proteínas da matriz (M), polimerase básica (PB2) e proteína ácida (PA) de Influenza A; matriz (M) e proteína não estrutural (NS) de Influenza B; e nucleocapsídeo do VSRA e do VSRB.

Com o maior conhecimento sobre o vírus causador da pandemia, o SARS-CoV-2, foi conseguido um ensaio automatizado de RT-PCR em tempo real para detecção qualitativa de RNA viral de Influenza A, Influenza B, VSR e SARS-CoV-2 (Xpert® Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV). Neste ensaio, os *primers* e as sondas são específicos para amplificação de sequências nos genes que codificam para as proteínas mencionadas no cartucho Xpert® Xpress Flu/RSV com adição da detecção dos genes da nucleocápside (N2) e do invólucro (E) do genoma do vírus SARS-CoV-2.

Os resultados são interpretados pelo software GeneXpert a partir de sinais de fluorescência e algoritmos de cálculo integrados.

3.4.2) Allplex™ Respiratory Panel 1, 2 e SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV

Os ensaios Allplex™ são ensaios multiplex de RT-PCR de etapa única prontos para detetar agentes patogénicos dependendo do painel escolhido. Este ensaio permite a amplificação e deteção simultâneas de vários ácidos nucleicos virais. Para este estudo foram utilizados os painéis:

- Allplex™ Respiratory Panel 1 para deteção única ou múltipla de vírus Influenza A, vírus Influenza B, VSR A e B, vírus Humano Influenza A subtipo H1 (Gripe A-H1), vírus Humano Influenza A subtipo H3 (Gripe A-H3), e vírus Humano Influenza A subtipo H1pdm09 (Gripe A-H1pdm09).
- Allplex™ Respiratory Panel 2 para deteção única ou múltipla de adenovírus humano, metapneumovírus humano, enterovírus humano, vírus parainfluenza humano 1, vírus parainfluenza 2 humano, vírus parainfluenza humano 3, e vírus parainfluenza humano 4.
- Allplex™ SARS-CoV-2/ FluA/ FluB/ RSV Assay para deteção única ou múltipla de vírus Influenza A, vírus Influenza B, VSR A e B, SARS-CoV-2 (gene N, RdRP e S).

A visão geral do procedimento está descrita na figura 4, onde os ácidos nucleicos das amostras são extraídos, sendo depois adicionados a uma MasterMix One-step de RT-PCR constituída por uma mistura MuDT Oligo Mix (reagente de amplificação e deteção), água livre de RNase, tampão contendo dNTPs e mistura de enzimas para a reação. A reação dá-se em tubos de PCR, posteriormente colocados no equipamento CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad).

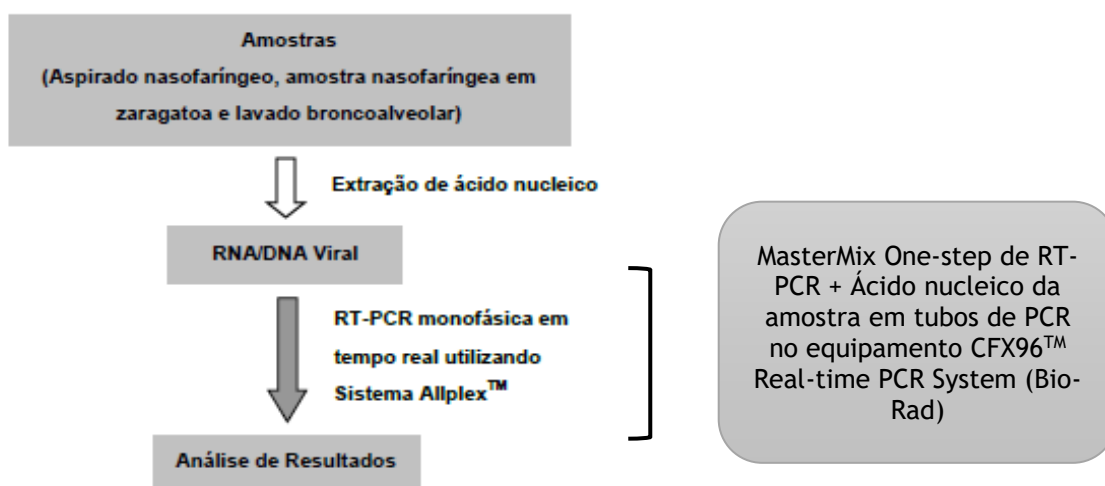


Figura 4: Esquema representativo das etapas efetuadas com o Sistema Allplex™.

A detecção única ou múltipla de vírus em apenas uma reação RT-PCR em tempo real é possível devido à especificidade dos *primers*, das sondas e de fluorocromos previamente atribuídos à sequência alvo a amplificar.

3.5) Análise de Dados

A análise de dados foi realizada no software *Microsoft Office 365 Excel*® na versão Professional Plus 2019.

4. Tratamento de Resultados

No período de estudo, de 1 de janeiro de 2018 a 30 de abril de 2021, foram obtidos e recolhidos os dados sobre os testes realizados para os vírus respiratórios em análise.

4.1) Distribuição Anual dos Testes Realizados

A testagem nas épocas gripais de outubro de 2018 a maio de 2019 e de outubro de 2019 a maio de 2020 segue um padrão homogêneo de testes (Figura 5). Na época gripal 2020-2021, até março, sofreu um aumento quase exponencial da testagem, atingindo o número de máximo de 2085 testes efetuados num mês. No mês de abril do atual ano de 2021 a testagem diminuiu.

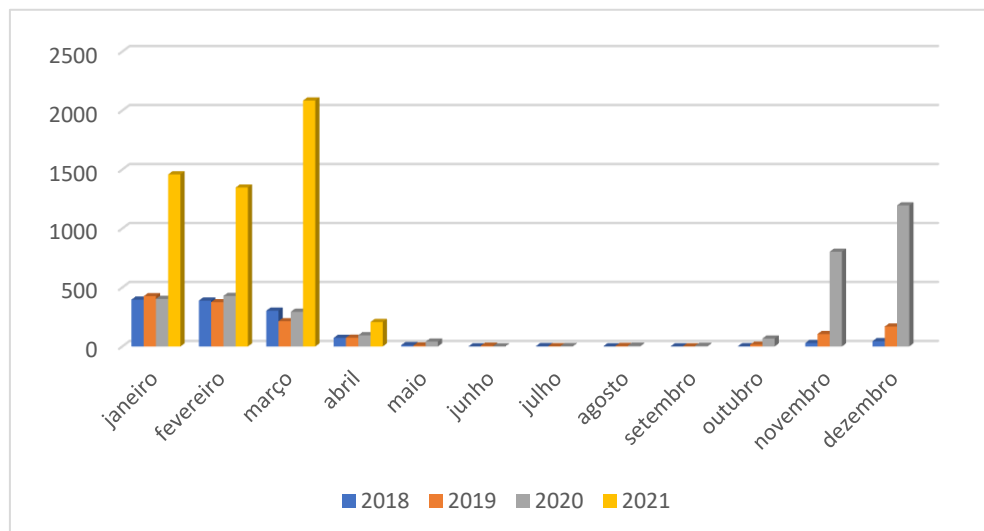


Figura 5: Distribuição anual de testes realizados para Influenza em 2018, 2019, 2020 e 2021.

Para a testagem do VSR (Figura 6), tal como a testagem de Influenza, nas épocas gripais de outubro de 2018 a maio de 2019 e de outubro de 2019 a maio de 2020 segue um padrão homogêneo. Também se pode observar um número crescente de testes de outubro de 2020 a março de 2021, seguido de um decréscimo do número de testes em abril.

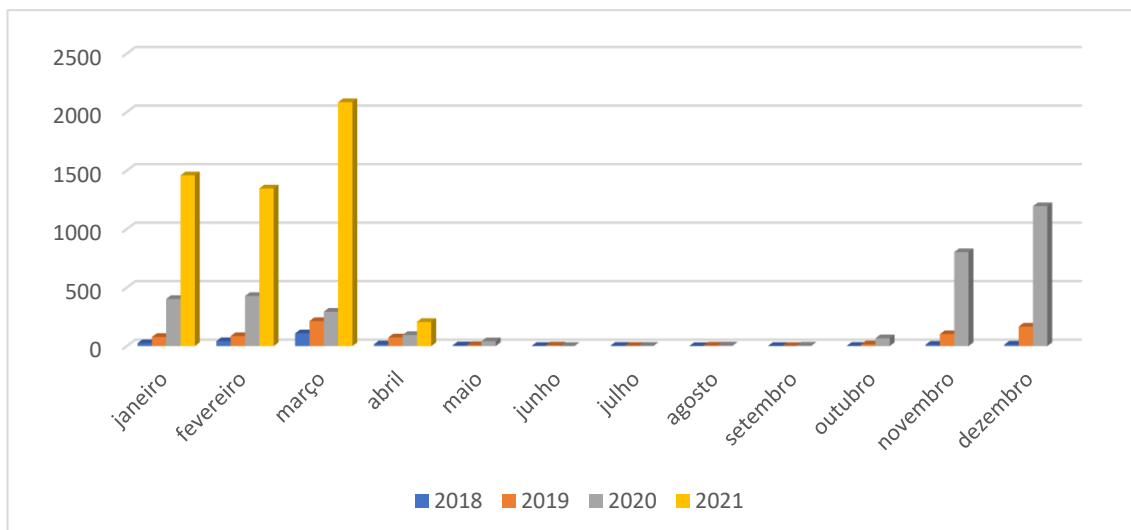


Figura 6: Distribuição anual de testes realizados para VSR em 2018, 2019, 2020 e 2021.

A testagem para os vírus Metapneumovírus, Parainfluenza, Adenovírus e Enterovírus segue um padrão heterogéneo ao longo dos anos em estudo (Figura 7), contudo a maior percentagem de testes efetuados situa-se durante os meses janeiro a junho e de setembro a dezembro.

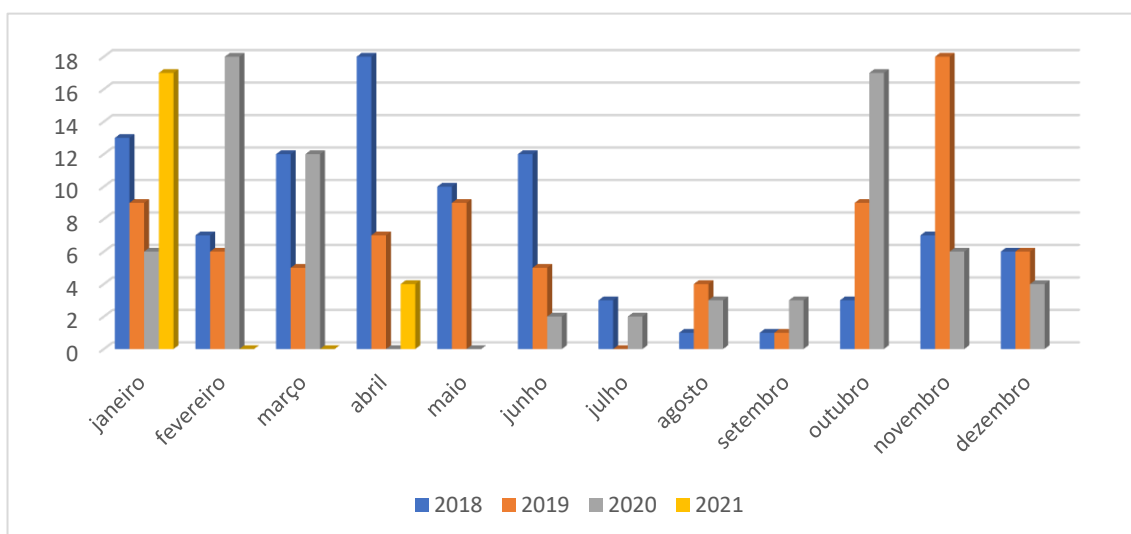


Figura 7: Distribuição anual de testes realizados para os vírus Metapneumovirus, Parainfluenza, Adenovirus e Enterovirus em 2018, 2019, 2020 e 2021.

4.2) Distribuição de Testes por Idade do Utente

Em 2018, os utentes com idades entre os 70 a 89 anos correspondem aos utentes com maior número de testes feitos para vírus respiratórios, como se pode observar na figura

8. A menor incidência de testagem encontra-se nos utentes com 10 a 19 anos. Também é possível observar que o maior número de testes feitos incide nos meses de novembro a abril, meses que se incluem na época gripal.

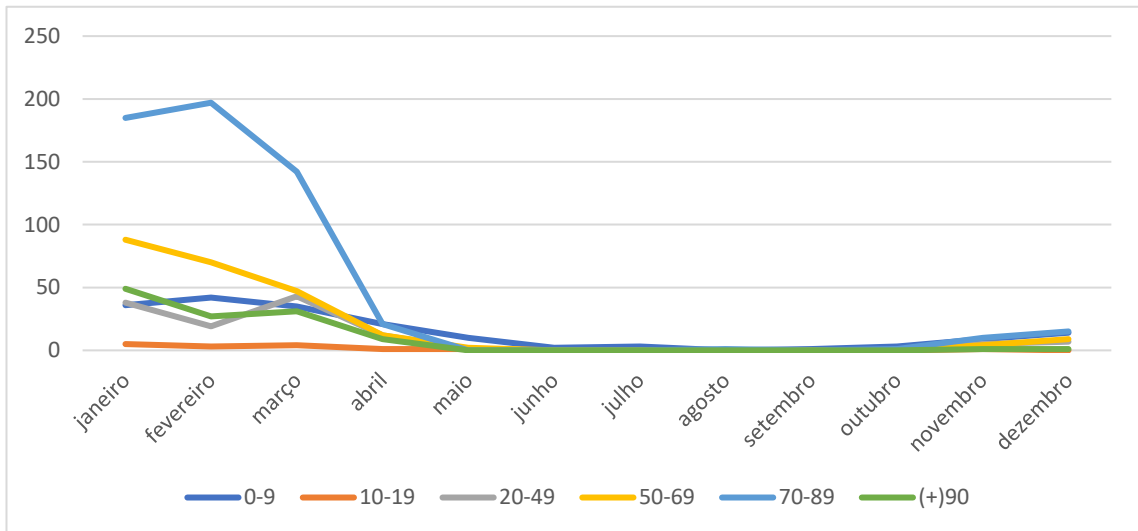


Figura 8: Distribuição da testagem por idade do utente em 2018.

Em 2019, o padrão de testagem por idades é semelhante ao do ano anterior em que os utentes com idades entre 70 e 89 anos representam a maior percentagem de testes, e os utentes com idades entre os 10 e 19 anos representam a menor quantidade de testes efetuados (Figura 9).

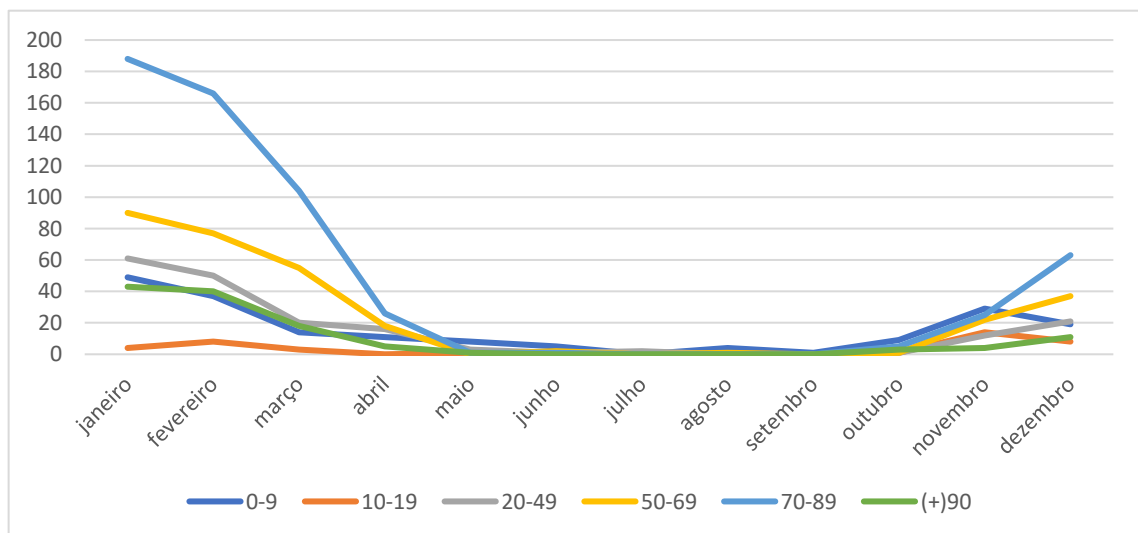


Figura 9: Distribuição da testagem por idade do utente em 2019.

De igual forma, no ano de 2020, observa-se que o maior número de testes efetuados corresponde aos utentes com intervalo de idades 70 a 89 anos (Figura 10). O intervalo de idades que efetua menos testes corresponde as idades de 10 a 19 anos. Neste gráfico

pode também observar-se que a distribuição de testes aumenta significativamente em outubro, contudo o padrão de incidência de testes efetuado por intervalo de idades é idêntico ao que é observado no início do ano.

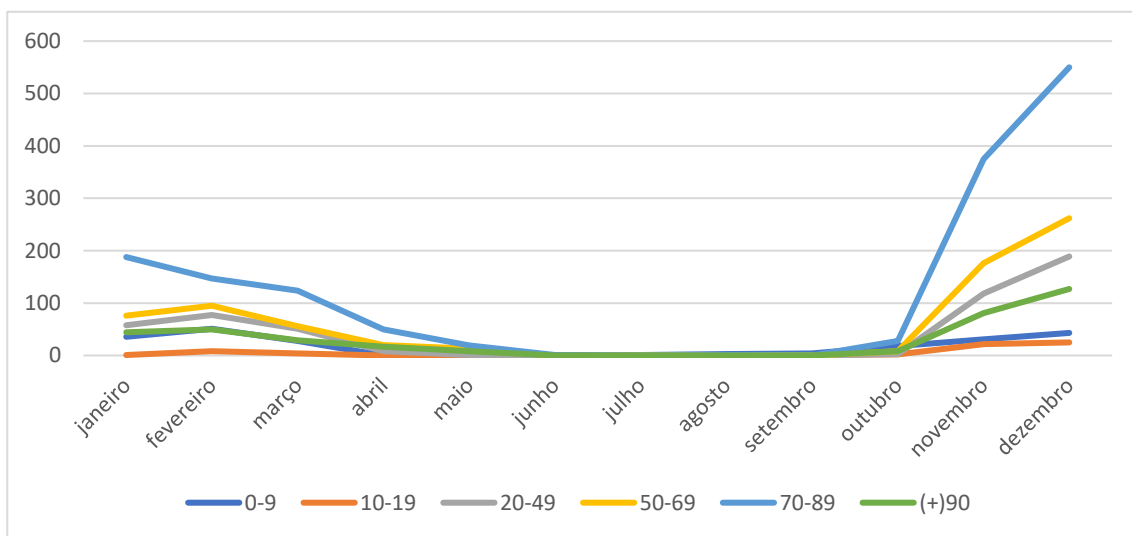


Figura 10: Distribuição da testagem por idade do utente em 2020.

Nos meses de janeiro a abril do ano de 2021, assim como nos gráficos anteriores, os utentes com idades de 70 a 89 anos correspondem aos utentes com mais testes efetuados (Figura 11). Os utentes com idades entre 10 a 19 anos representam os utentes com menos testes realizados.

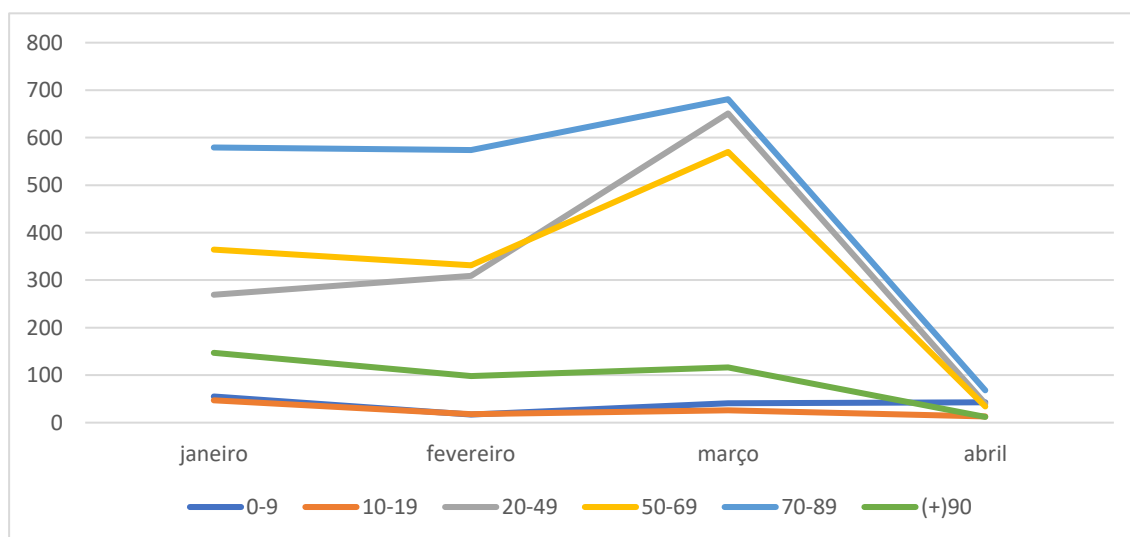


Figura 11: Distribuição da testagem por idade do utente em 2021.

4.3) Caracterização Anual de Testes Positivos e Negativos

Na testagem para o vírus VSR, é possível verificar que a percentagem de testes positivos diminui de ano para ano. Em comparação com os anos 2018 e 2019, o número de testes positivos aumenta em 2020, contudo, os 135 testes positivos representam 4% dos testes totais. Como observado na figura 12, a testagem a partir do mês de outubro de 2020 aumentou até ao mês de março de 2021. Em 2021, foram realizados 5098 testes, e nenhum foi positivo.

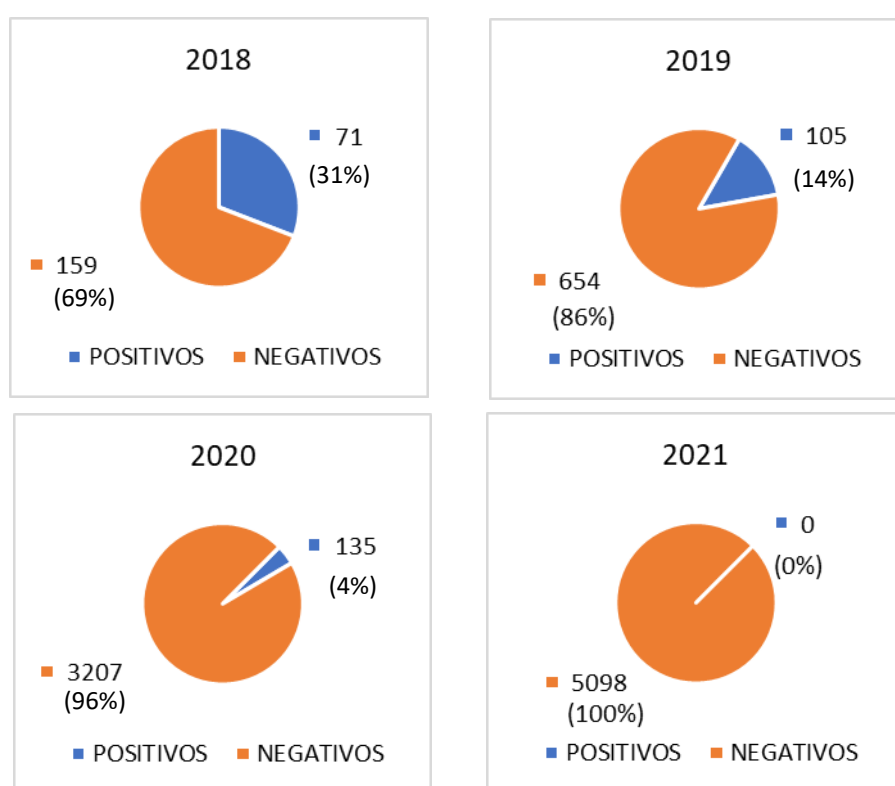


Figura 12: Caracterização da testagem para VSR para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respetivas percentagens de testes positivos e negativos.

Na deteção de vírus Influenza, o número de testes efetuados mantém-se nos anos 2018 e 2019, assim como as percentagens de positivos e negativos (Figura 13). No ano de 2020, foram detetados 200 testes positivos, correspondendo a 6% de positivos em relação a testes totais. Nos meses de janeiro a abril, não foram detetadas infeções por Influenza. O ano de 2020 e os meses em análise de 2021 correspondem ao período da amostra com maior número de testes realizados.

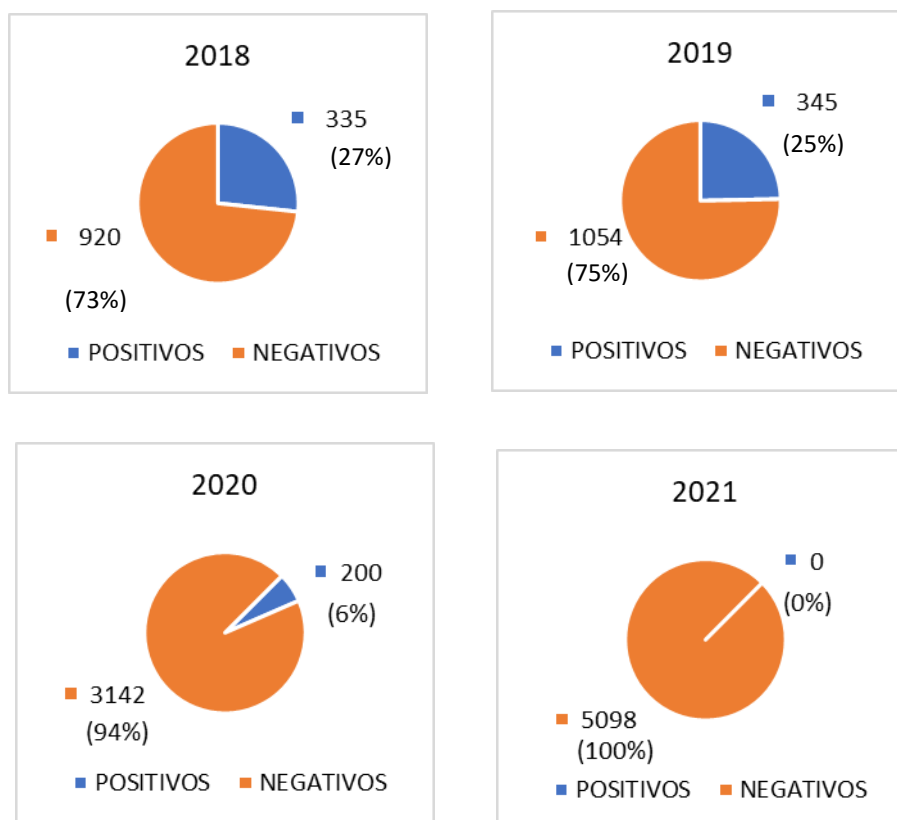


Figura 13: Caracterização da testagem para Influenza para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respectivas percentagens de testes positivos e negativos.

Os gráficos de percentagens relativos aos testes de deteção de Parainfluenza (Figura 14) revelam que ao longo dos anos o número de testes não oscila muito, contudo a nível de percentagem de positivos, 2019 foi o ano com maior percentagem de positivos. Em 2020 apenas 3% dos testes feitos foram positivos. Nos meses analisados do presente ano de 2021 foram realizados 17 testes e todos apresentaram resultado negativo.

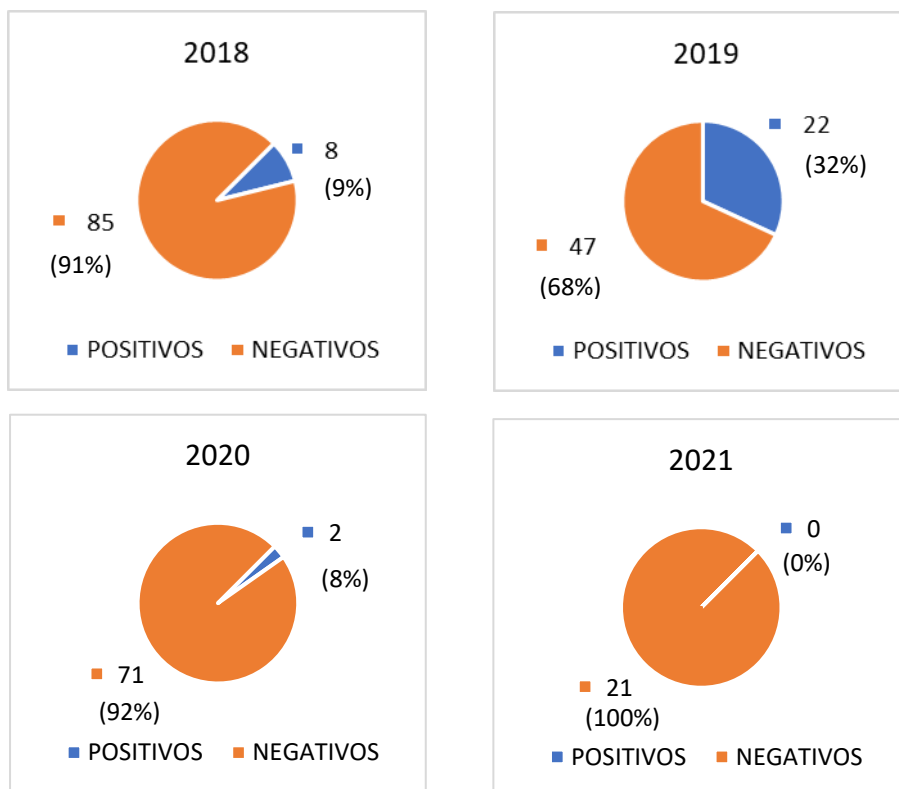


Figura 14: Caracterização da testagem para Parainfluenza para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respectivas percentagens de testes positivos e negativos.

Ao analisar os dados relativos à testagem para Metapneumovírus (Figura 15) podemos observar que o número de testes se manteve ao longo dos anos, ao contrário da percentagem de positivos e negativos, que em 2019 se encontrou baixa (6%), comparativamente com os anos 2018 e 2020. Nos meses em análise de 2021 não foram detetadas infeções por Metapneumovírus nos 21 testes realizados.

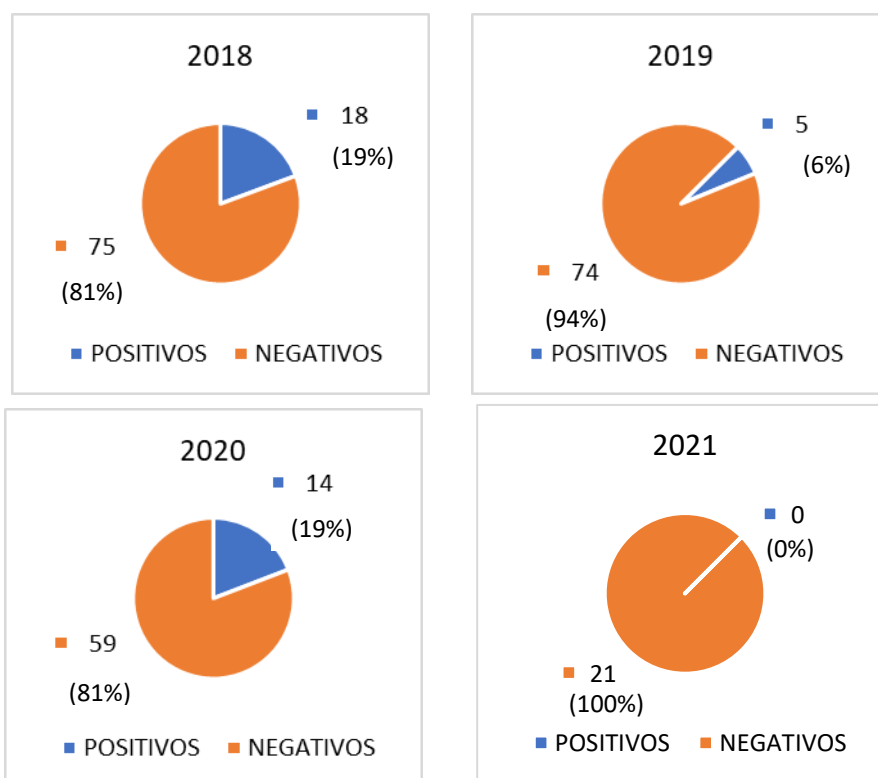


Figura 15: Caracterização da testagem para Metapneumovírus para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respectivas percentagens de testes positivos e negativos.

Observa-se também uma testagem constante ao longo dos anos para o vírus Enterovírus (Figura 16), contudo há uma tendência decrescente na percentagem de positivos. Em 2020 a percentagem de positivos é apenas 6%, o que representa 5 casos detetáveis neste ano. Nos meses janeiro a abril de 2021, não foram detetados testes positivos para Enterovírus nos 21 testes totais.

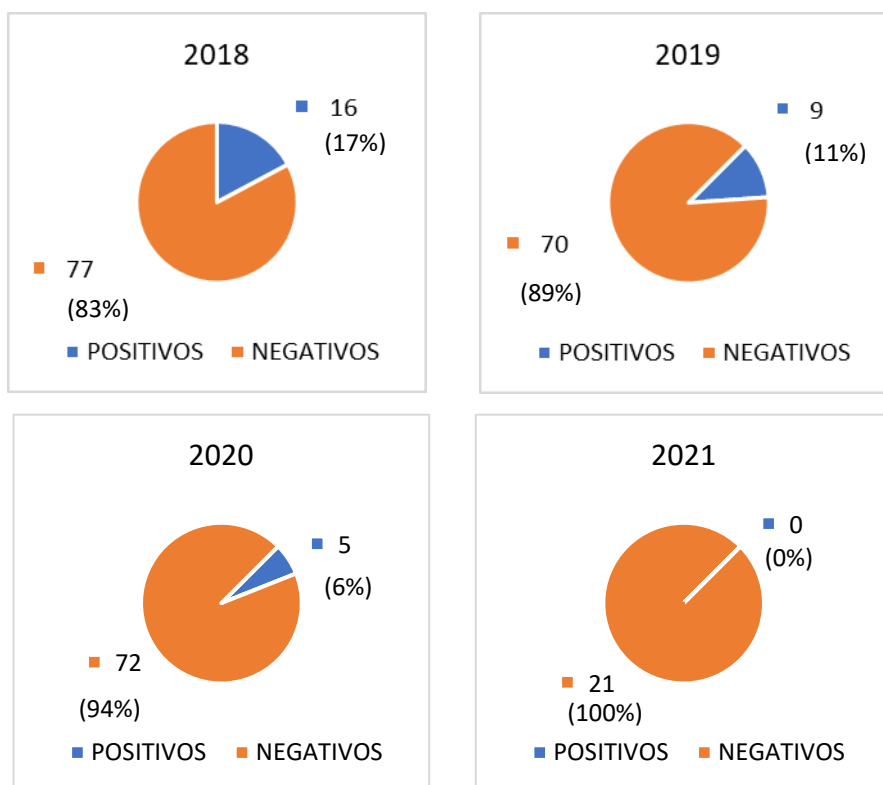


Figura 16: Caracterização da testagem para Enterovírus para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respectivas percentagens de testes positivos e negativos.

Na deteção de Adenovírus (Figura 17) ao longo dos anos 2018, 2019 e 2020, os dados revelam que a infeção por Adenovírus apresenta números semelhantes de testes feitos, tal como números de testes positivos e negativos e percentagens associadas. Nos meses analisados de 2021, foram detetados 2 casos de infeção por Adenovírus nos 21 testes totais realizados.

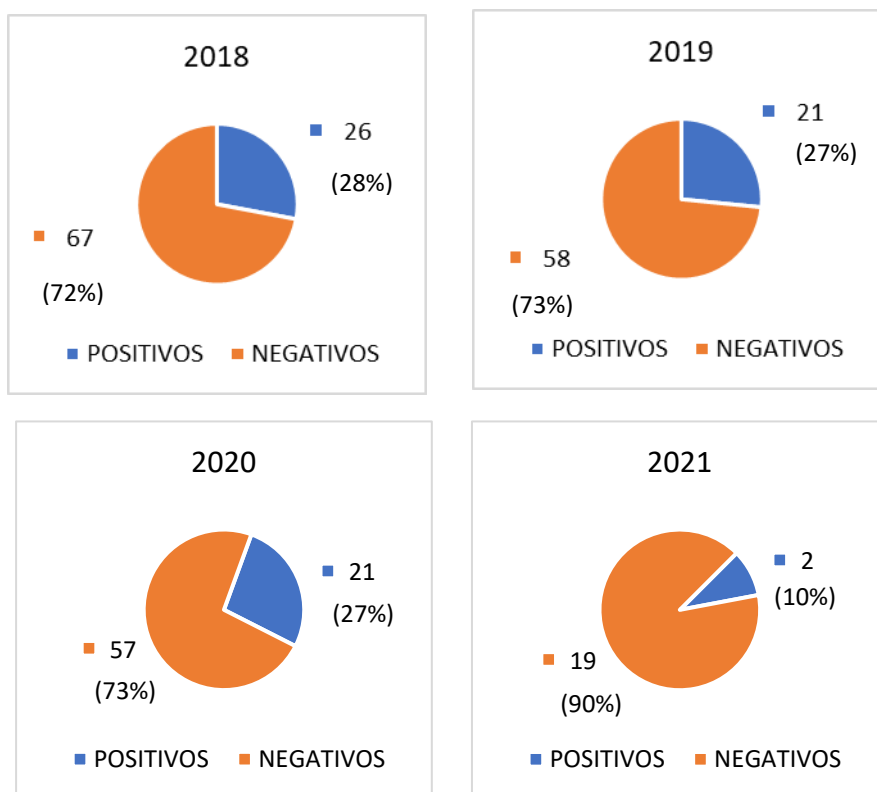


Figura 17: Caracterização da testagem para Adenovírus para os anos 2018, 2019, 2020 e 2021 com as respetivas percentagens de testes positivos e negativos.

4.4) Caracterização Anual dos Casos Positivos

A 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde declarou pandemia internacional pela doença COVID-19, a partir da declaração, os países tomaram medidas preventivas. Em Portugal, a dia 18 de março de 2020, pelo Decreto do Presidente da República nº 14 A/2020, foi declarado estado de emergência com as leis de confinamento ao domicílio. Nos meses seguintes foram adotadas medidas como o uso de máscara, higienização das mãos, e testagem e rastreamento de contactos de risco.

4.4.1) Influenza

Os gráficos da distribuição anual de positivos para Influenza (Figura 18) em 2018 e 2019 mostram que os testes positivos se encontram nas épocas gripais associadas de cada ano, ou seja, entre os meses de outubro a maio. Em 2020, a partir do mês de março, não houve testes positivos para o vírus a detetar. Também se pode observar que a distribuição de positivos para Influenza A e B é diferente nos anos em estudo.

Em 2018, houve 10 testes positivos para Influenza A H1N1; em 2019, houve 9 testes positivos para Influenza A H1N1 e 3 positivos para Influenza H3N1; em 2020, foram detetados 3 testes positivos para Influenza A H3N1. Nos meses em análise do presente ano de 2021, não foram detetados testes positivos.

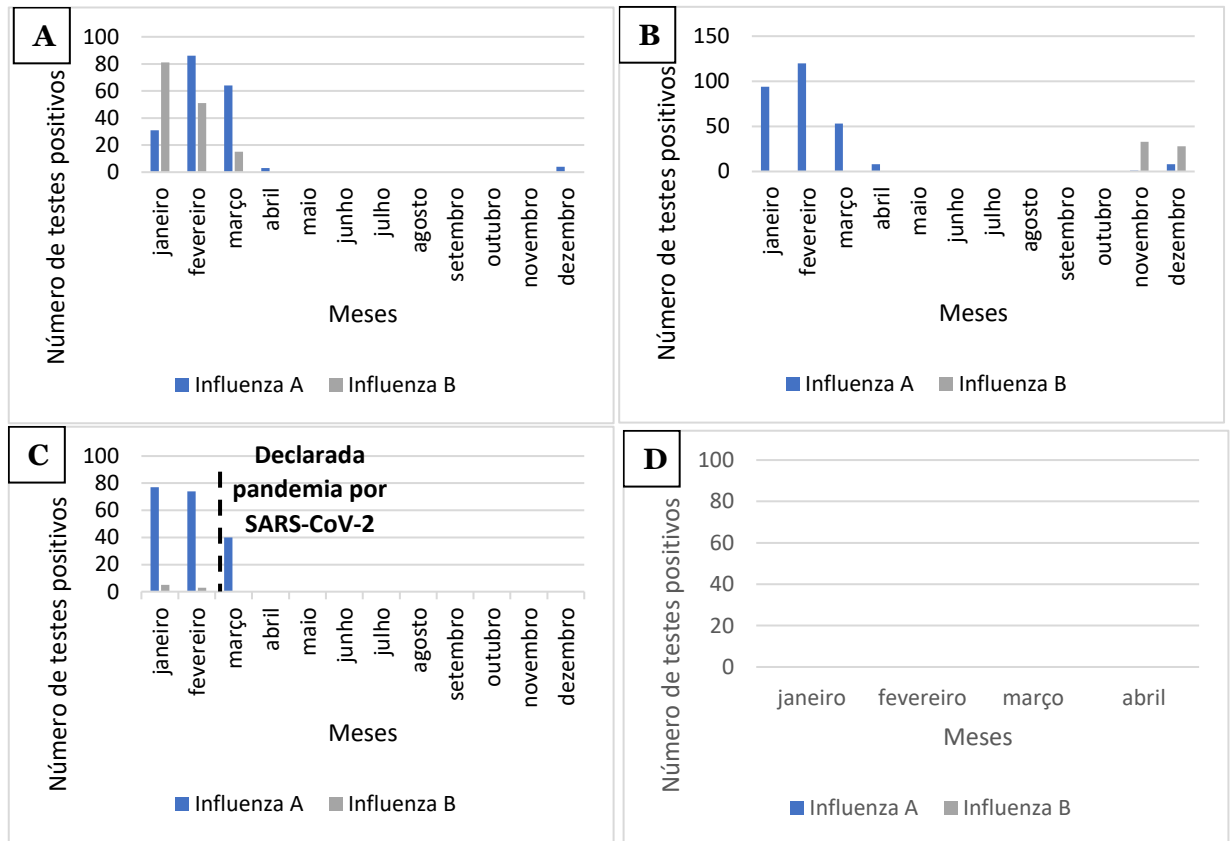


Figura 18: Caracterização dos casos detetáveis de Influenza nos anos 2018 (A), 2019 (B), 2020 (C) e 2021 (D).

4.4.2) Vírus Sincicial Respiratório

A distribuição anual de testes positivos (Figura 19) nos anos 2018 e 2019 de VSR revela que estes também seguem uma distribuição segundo a época gripal, tal como observado nos gráficos anteriores. Também se observa que há uma extinção de testes positivos a partir do mês de abril, após declaração de pandemia e adoção de medidas de mitigação da transmissão viral. Nos meses de 2021 em análise, não foram detetadas infecções por VSR.

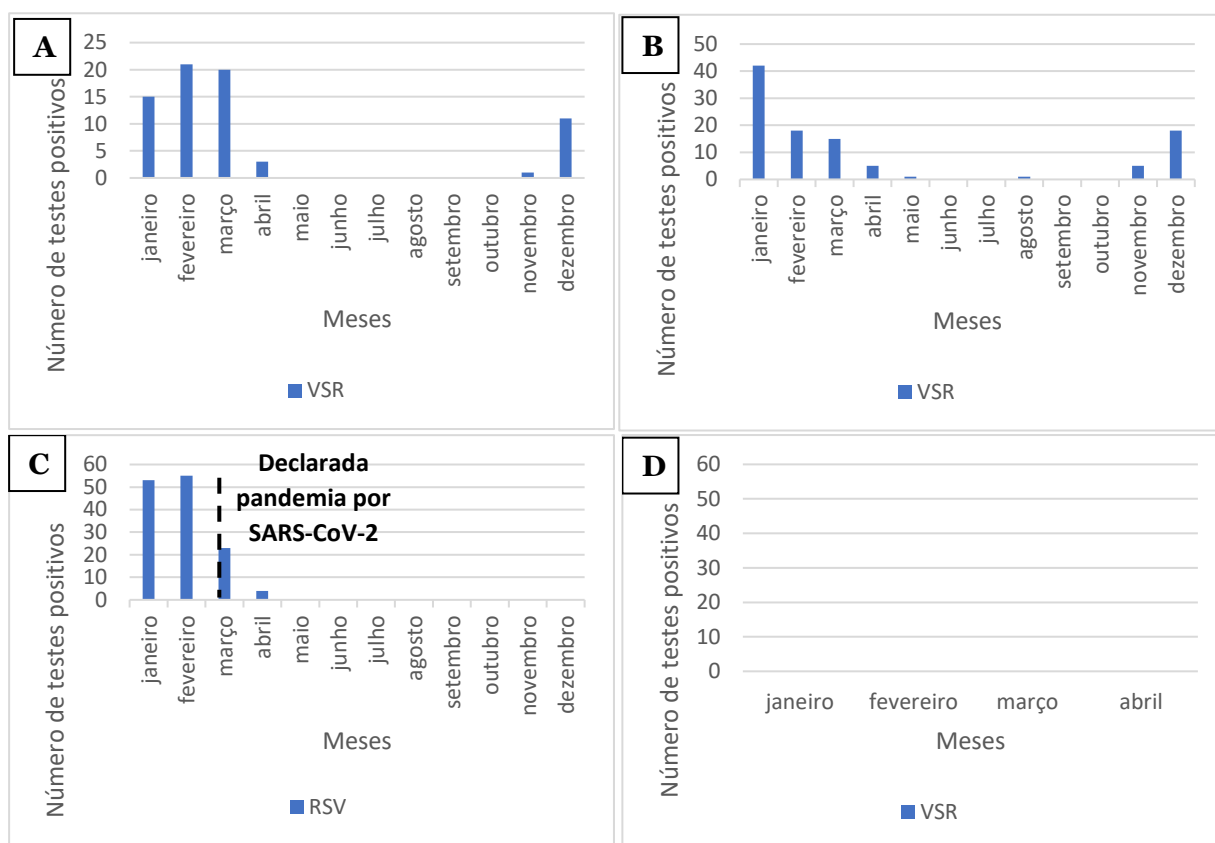


Figura 19: Caracterização dos casos detetáveis de VSR nos anos 2018 (A), 2019 (B), 2020 (C) e 2021 (D).

4.4.3) Parainfluenza e Metapneumovírus

Em 2018, o maior número de testes positivos para Metapneumovírus (Figura 20) situou-se no mês de abril, atingindo 7 casos positivos. Em 2019, pode observar-se que a incidência deste vírus diminuiu, apenas havendo testes positivos nos meses março a maio. Em 2020, volta a haver um pico de testes positivos para este vírus no início do ano, contudo a partir do mês de março não houve testes positivos.

Para a distribuição de testes positivos para o vírus Parainfluenza (Figura 20), o ano de 2019 é o ano com maior incidência deste vírus dos anos abrangidos pelo estudo, com pico em novembro. Observa-se que em 2020 foram detetados 2 testes positivos em fevereiro, e á semelhança do vírus Metapneumovírus, não houve testes positivos a partir do mês de março.

Para ambos os vírus, não foram detetados testes positivos nos meses de janeiro a abril do presente ano de 2021.

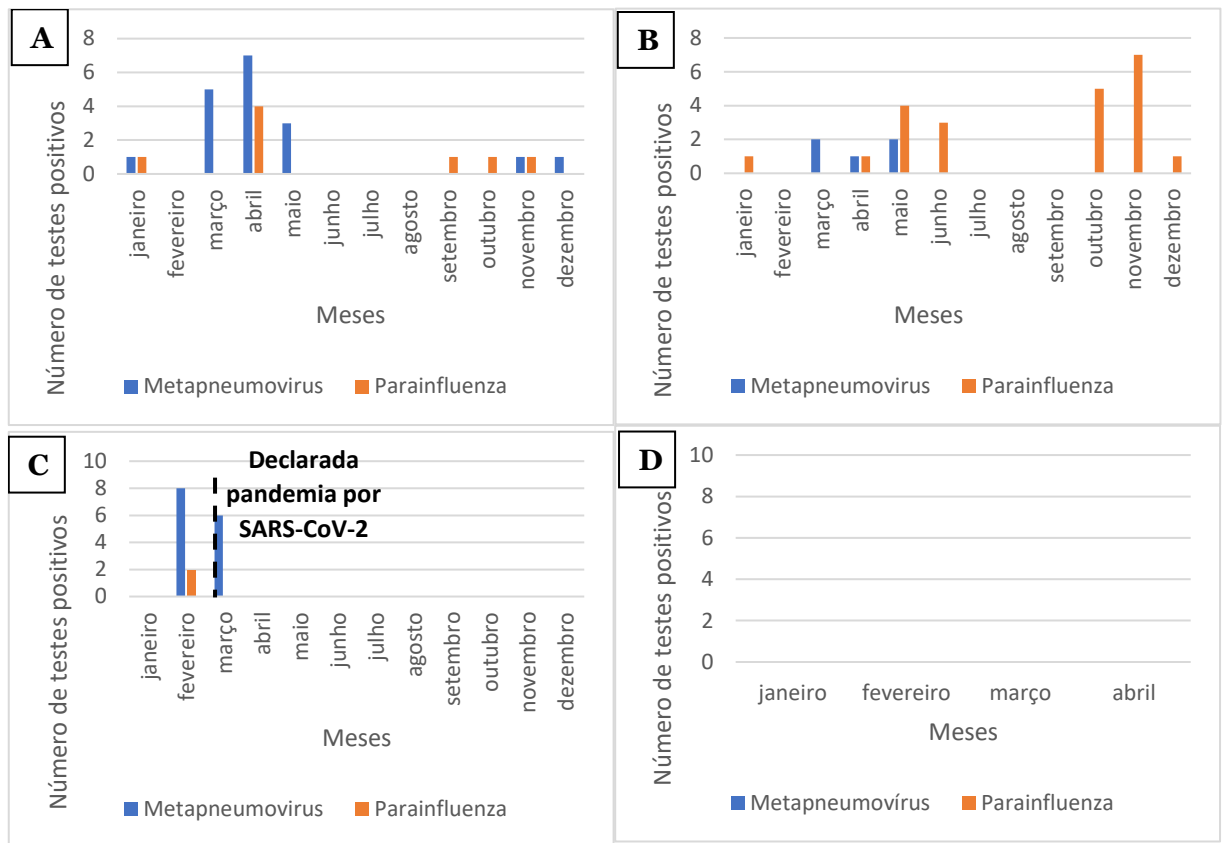


Figura 20: Caracterização dos casos detetáveis de Metapneumovírus e Parainfluenza nos anos 2018 (A), 2019 (B), 2020 (C) e 2021 (D).

4.4.4) Adenovírus e Enterovírus

A distribuição de testes positivos para adenovírus (Figura 21) não incide em meses específicos, contrariamente ao que se observa para vírus como Influenza e VSR. Para o Adenovírus, nos anos 2018, 2019 e 2020, o número de testes positivos é idêntico, assim como a diminuição em meses como julho e agosto. Nos meses em estudo do ano de 2021 foram detetados dois testes positivos para o Adenovírus.

A distribuição de testes positivos para Enterovírus (Figura 21) também difere relativamente á sua distribuição durante os meses do ano. Comparativamente com 2018 e 2019, em 2020 houve diminuição de testes positivos detetados para estes vírus. No presente ano de 2021, até ao mês de abril, não foram detetadas infeções por Enterovírus.

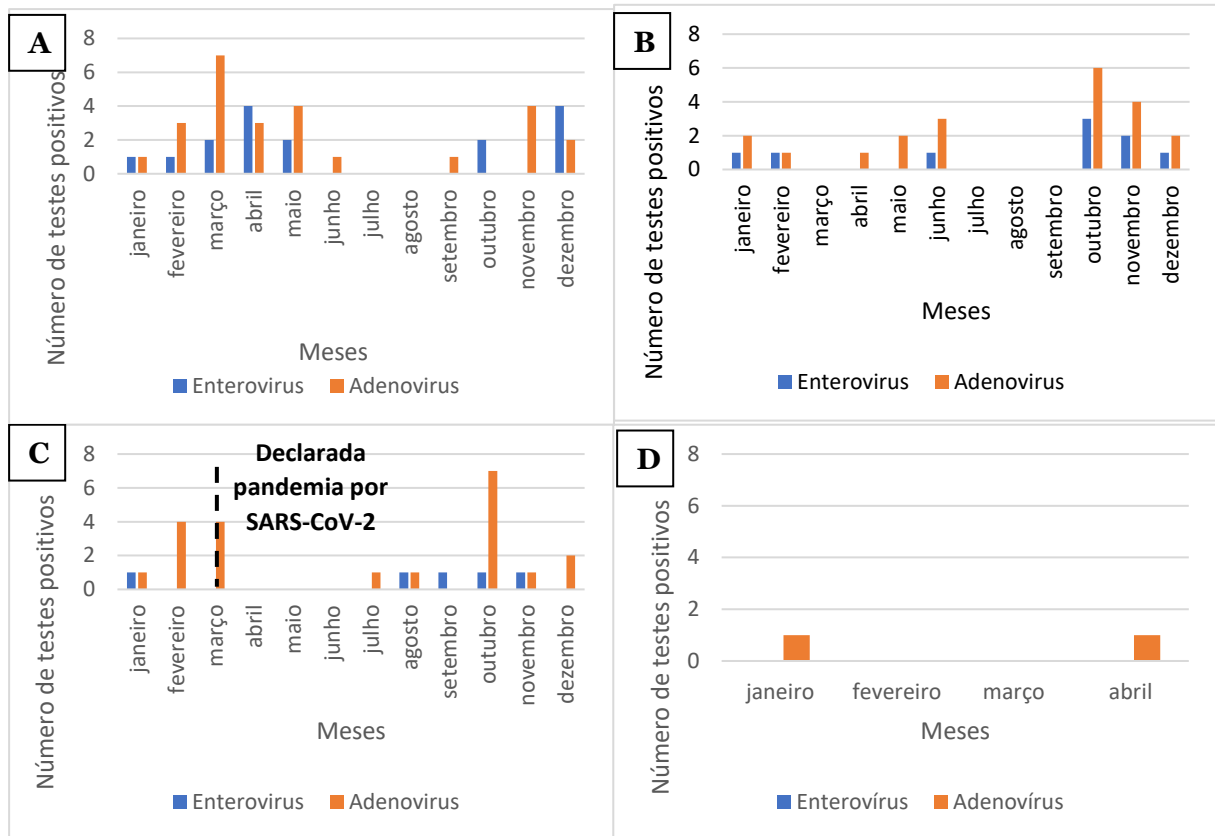


Figura 21: Caracterização dos casos detetáveis de Enterovírus e Adenovírus nos anos 2018 (A), 2019 (B), 2020 (C) e 2021 (D).

5. Discussão

Neste estudo foi possível caracterizar a amostra recolhida nos anos de 2018, 2019, 2020 e até abril de 2021. A caracterização foi efetuada ao nível do número de testes realizados, do intervalo de idades de utentes que efetuaram testes aos vírus respiratórios e, por fim, caracterização dos testes positivos em que se detetaram ácidos nucleicos virais. Esta caracterização foi essencialmente avaliada pela distribuição de amostra mensalmente.

O número de testes para Influenza e VSR (Figura 5 e 6) segue uma atividade basal no biénio 2018 e 2019, ou seja, em que o seu número é resultado de variáveis como incidência destes vírus na população, apresentação de sintomas e outros critérios exclusivamente clínicos. A testagem destes vírus também se caracteriza pela atividade gripal, dado que se trata de vírus respiratórios sazonais. A época gripal é intervalo de tempo entre a semana 40 e a semana 20 do ano seguinte²¹.

No dia 26 de outubro de 2020, foi publicada a norma 019/2020 pela Direção Geral de Saúde (DGS) que incidiu na capacidade de prevenção da transmissão de SARS-CoV-2 pela testagem laboratorial em larga escala. Esta norma ditou que doentes com critério internamento (antes do mesmo) era necessário realizar um teste molecular para deteção de SARS-CoV-2, assim como teste para detetar Influenza A e B, e em crianças com menos de dois anos de idade, teste para deteção de VSR. No CHUCB, a partir da adoção deste critério de internamento, foram efetuados testes moleculares para deteção de SARS-CoV-2, Influenza A e B e VSR, nos utentes. Esta condição de testes traduziu-se num aumento significativo dos mesmos, tal como se verificou nas figuras 5 e 6.

No dia 26 de março de 2021, foi publicada uma nova versão da norma 019/2020, uma atualização que dita que utentes com critério de internamento apenas necessitam de efetuar teste molecular para a deteção de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2. No mês de abril do mesmo ano, a testagem para os vírus Influenza e VSR diminuiu, como se verifica também nas figuras 5 e 6. Os testes são efetuados apenas por critério clínico.

A testagem dos vírus Metapneumovírus, Parainfluenza, Adenovírus e Enterovírus segue números de testagem heterogéneo durante os meses do ano (Figura 7). Apesar de a incidência destes vírus ao longo do ano ser diferente entre eles, a testagem dos quatro faz parte do mesmo painel de deteção, logo, são testados simultaneamente. Estes testes são efetuados maioritariamente em amostras de utentes em idade pediátrica.

Após a caracterização da distribuição de testes por idade do utente, é possível observar que em todo o intervalo de tempo em que foram obtidos os dados, ou seja, os anos de 2018, 2019, 2020 e até ao mês de abril de 2021, os utentes com idades entre os 70 e os 89 anos correspondem às pessoas que mais testaram, podendo ser observado nas figuras

8, 9, 10 e 11. Esta tendência facilmente se justifica por serem utentes que se deslocam com maior frequência a unidades de saúde devido aos riscos acrescidos de agravamento de infeções respiratórias por motivos demográficos, biológicos, sociais e comportamentais²².

A caracterização anual de testes positivos e negativos, em percentagem, permite avaliar a expressão de testes positivos numa totalidade de testes realizados. Quando analisada a caracterização para os vírus Influenza e VSR (Figuras 12 e 13), observa-se um aumento da testagem bastante significativa nos anos de 2020 e meses de 2021 em análise. Contudo, o aumento de testes não significou aumento do rastreamento dos vírus em questão, pelo contrário, a percentagem de positivos é baixa, atingindo 0% em 2021.

A infeção causada por Adenovírus foi detetada nos anos de 2018, 2019 e 2020 com a mesma expressão de testes positivos e negativos, e também se trata do único vírus detetado no ano de 2021, como se pode verificar na figura 17.

A distribuição de testes positivos mensalmente durante os anos da amostra em estudo revelou que a partir do momento em que foi declarada pandemia pela OMS pela doença COVID-19 e adotadas medidas de prevenção da transmissão viral, vírus como Influenza, VSR, Parainfluenza e Metapneumovírus não foram detetados no laboratório do CHUCB (Figuras 18, 19 e 20). Apenas Enterovírus e Adenovírus identificados após o mês de março(Figura 21).

Estes resultados sugerem que, as medidas de contenção adotadas em Portugal para mitigar a transmissão de SARS-CoV-2 permitiriam também a diminuição da transmissão de alguns vírus respiratórios. SARS-CoV-2, Influenza, VSR, Parainfluenza e Metapneumovírus transmitem-se por via aérea através de gotículas ou aerossóis provenientes de uma pessoa infetada^{3,5,6,8,11}. Assim, o uso de máscara, higienização das mãos, distanciamento físico e limpeza de superfícies, medidas enquadradas a nível nacional para travar a pandemia induzida pelo SARS-CoV-2, foram essenciais na interrupção da transmissão viral destes agentes etiológicos. A adoção de medidas mais restritas como fecho das escolas, confinamento ao domicílio, teletrabalho e circulação entre concelhos também foram cruciais para a diminuição de contactos sociais.

A campanha de vacinação para Influenza também se inclui numa das medidas essenciais de saúde pública, constitui uma medida pré-época gripal de prevenção da sobrecarga dos serviços hospitalares associada à infeção²³.

Vírus como Adenovírus e Enterovírus continuaram em circulação após a tomada de medidas de prevenção da transmissão de COVID-19, ao contrário de outros vírus mencionados acima. Adenovírus corresponde ao único vírus detetado nas amostras do

CHUCB nos meses de janeiro e abril de 2021. Estes agentes virais, para além de apresentarem a via aérea como via de transmissão e o contacto com uma pessoa infetada, também se transmitem por via oral-fecal^{9,10}, em que é ingerido algo contaminado com partículas fecais, como alimentos. O facto de terem outra via transmissão além da via aérea poderá ter conferido sobrevivência e continuação da circulação, mesmo com o uso de máscaras e com o distanciamento físico. Estes vírus têm maior incidência em idade pediátrica, uma parte da população que não tem obrigatoriedade de uso de máscara¹⁶, o que poderá também ter influenciado a continuação de deteção destes vírus em questão.

Os desinfetantes alcoólicos para higienização são capazes da inativação viral através da ruptura celular e desnaturação proteica nos microrganismos, logo, a eficácia depende das propriedades da superfície destes agentes etiológicos²⁴. Geralmente vírus sem envelope lipídico são conhecidos como agentes mais resilientes a desinfetantes, comparando com vírus com envelope²⁴. Desta maneira, o Adenovírus e Enterovírus, agente etiológicos sem envelope apresentam maior resiliência à inativação do que vírus como Influenza e Coronavírus²⁴.

Ao analisar a situação nacional, é possível identificar que a deteção de Influenza diminuiu, um vírus com uma incidência significativa em épocas gripais passadas²¹. Na época gripal 2020-2021, até à semana 18, apresentou um total de 11 casos detetados pela Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe²¹. Até à semana 18 de 2021, foram detetados maioritariamente agentes respiratórios pertencentes ao grupo dos Picornavírus²¹.

A nível internacional, vários países apresentaram estudos que demonstram que a partir da adoção de restrições da transmissão de SARS-CoV-2, houve uma diminuição significativa da transmissão de Influenza na população²⁵⁻²⁹.

A queda observada de casos de Influenza, tanto a nível nacional, como internacional, preocupa os especialistas na formulação da vacina contra Influenza da próxima época gripal³⁰. A escassa circulação de Influenza leva a que a previsão das estirpes circulatórias sazonais da época gripal seguinte diminua³⁰. Futuramente o uso de máscara, o distanciamento físico, entre outras medidas, poderá ser fundamental para o controlo da transmissão de Influenza.

Estudos em culturas de células e ratinhos indicam que a coinfeção de Influenza e SARS-CoV-2 tem um mau prognóstico, dado que Influenza aumenta a carga viral do SARS-CoV-2³¹, a sua infecciosidade³¹ e maiores danos nos pulmões³¹. A prioridade será evitar a coinfeção pelos dois vírus mencionados, de modo a evitar agravamento do estado de saúde e também a sobrecarga dos serviços hospitalares, prestando auxílio adequado a todos os utentes. Sendo a época gripal uma época com elevadas infeções respiratórias

causadas por vários vírus em circulação, seria benéfico que os cuidados adotados para mitigação de disseminação SARS-CoV-2 se mantivessem em ocasiões de maior risco de transmissão.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

As medidas de contenção relativamente à transmissão de SARS-CoV-2 adotadas a nível nacional mostraram-se eficazes para a mitigação deste novo vírus causador de uma pandemia, contudo também afetaram consequentemente a mitigação de outros vírus respiratórios. No trabalho desenvolvido, todos os vírus a detetar que se transmitem exclusivamente por via aérea não foram detetados a partir do momento em que as medidas foram aplicadas e foram cumpridas.

A desinfeção das mãos, o distanciamento físico, o uso de máscara, a limpeza de superfícies, a etiqueta respiratória e a testagem de contactos de risco, levaram à diminuição drástica de Influenza para valores quase nulos. A vacinação para Influenza também foi reforçada no início da época gripal. A adoção das medidas mencionadas em conjunto com medidas mais restritas como o confinamento, teletrabalho obrigatório, e limitação de circulação entre concelhos entre outras, também foram cruciais para a diminuição de contactos sociais. Vírus como VSR, Metapneumovírus e Parainfluenza não foram detetados a partir de abril de 2020.

Perante este vírus pandémico e a consequente aplicação destas regras, os comportamentos do ser humano modificaram-se. Esta modificação do comportamento poderá ser a principal causa da redução acentuada de outros agentes virais causadores de infeção respiratória. No futuro, será proveitoso a adoção destas medidas em diversas situações como por exemplo, em espaços fechados com um elevado número de pessoas, em contexto hospitalar ou na abordagem de pessoas idosas.

Como mencionado anteriormente, há vários fatores que indicam que seria benéfico o uso das medidas de proteção individual, em conjunto com os comportamentos de higiene, como por exemplo, o facto de ser pouco previsível as estirpes de Influenza em circulação e também o facto de poder existir uma relação entre Influenza e a infecciosidade do vírus SARS-CoV-2. Desta forma, se se continuar a adotar comportamentos conscientes para a mitigação viral, as consequências poderão ter menos impacto para a população.

As principais limitações neste estudo incidiram no facto de a amostra em estudo ser restrita aos utentes que se deslocam ao CHUCB e à falta de conhecimento sobre critério

clínico de realização de testes para vírus respiratórios. Como perspectivas futuras, será importante analisar o impacto sem as medidas de contenção para a mitigação da transmissão da COVID-19, de forma a confirmar se estas medidas são efetivamente a origem da redução de casos para outros vírus respiratórios. Seria também importante estudar o impacto destas regras adotadas na transmissão de infeções bacterianas, nomeadamente pneumonias bacterianas e se houve um decréscimo das mesmas.

Capítulo 2: Relatório de Estágio no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário da Beira Interior

1. Caracterização do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira³²

O Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, EPE é uma unidade do Serviço Nacional de Saúde português constituída pelo novo Hospital Pêro da Covilhã e pelo Hospital do Fundão. É uma unidade hospitalar moderna e inovadora, sendo uma instituição de referência na prestação de cuidados de saúde às populações residentes nos concelhos da Covilhã, Fundão, Belmonte e Penamacor.

Tem como principal missão a prestação de cuidados de saúde com eficiência e qualidade aos cidadãos. Este Centro também participa no ensino pré e pós-graduado, em colaboração com algumas escolas e universidades, proporcionando um ensino de excelência nas várias áreas de prestação de cuidados de saúde.

2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica³²

O Serviço de Patologia Clínica do CHUCB tem como missão recolher produtos biológicos de utentes que recorrem ao serviço, procedendo à determinação analítica dos parâmetros solicitados; efetuar colheitas em segurança; executar determinações analíticas fiáveis em tempo útil, baseadas na atualização técnica, na qualidade e na automatização; e participar no ensino pré graduado, pós graduado e em projetos de investigação.

O laboratório do Hospital da Covilhã situa-se no piso 0 e possui como áreas de diagnóstico a hematologia, microbiologia, imunoquímica, virologia, autoimunidade e um laboratório dedicado ao serviço de Urgência.

3. Microbiologia

3.1) Contextualização teórica⁵

O estudo de microrganismos patogénicos é essencial no entendimento das doenças e no controlo das mesmas. A relação entre os organismos e as doenças que originam não é

simples, nem sempre se trata de uma patologia com manifestações e tratamentos bem definidos. Outro desafio é a compreensão da origem da infecção causada, pode tratar-se de uma infecção exógena, onde o indivíduo está exposto a bactérias, fungos, parasitas ou vírus de fonte externa, ou, pode tratar-se de uma infecção endógena, que é produzida pela própria flora microbiana. A interação entre microrganismos e o ser humano é complexa e a interação pode dar-se apenas por colonização, relação de simbiose prolongada ou mesmo a doença. A virulência do organismo, o sítio de exposição e a capacidade de resposta do hospedeiro são variáveis determinantes da interação

No laboratório de microbiologia do CHUCB, o foco de trabalho incide na área da bacteriologia, sendo as restantes áreas estudadas noutras secções. As bactérias são organismos procarióticos unicelulares sem membrana nuclear, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. A parede celular é complexa e pode apresentar-se de duas formas nas bactérias: uma camada robusta de peptidoglicanos e uma membrana externa, ou uma parede com uma fina camada de peptidoglicanos. O tamanho (1 a 20µm ou até maior), a forma (esférica, como os cocos; bastão, como os bacilos; espirilos; espiroquetas ou vibriões) e o arranjo espacial das células (uma única célula, em cadeia ou em cacho) são usados para uma classificação preliminar das bactérias.

A classificação definitiva é baseada nas características metabólicas da bactéria em estudo, incluindo a necessidade de crescimento em ambientes anaeróbios ou aeróbios; a necessidade de nutrientes específicos, como por exemplo, a habilidade de fermentar certos hidratos de carbono; a produção de produtos metabólicos característicos como álcoois ou ácidos; e por fim, a produção de enzimas, tendo o exemplo da produção de catalase característica do género *Staphylococcus*.

Algumas bactérias podem ser identificadas através de testes sorológicos; nestes são usados os anticorpos produzidos pelo indivíduo para detetar antígenos característicos. Esta serotipagem é executada quando se trata de microrganismos de difícil identificação ou microrganismos em que o seu crescimento no laboratório representa perigo.

Após a identificação do microrganismo, o laboratório tem a capacidade de determinar a atividade antimicrobiana de agentes terapêuticos quando se tratam de organismos patogénicos indutores de doença. O tratamento deve envolver um planeamento específico com o objetivo de uma resposta rápida e eficaz.

3.2) Microscopia⁵

A microscopia permite a detecção direta e a identificação definitiva de microrganismos em amostras biológicas. A visualização permite a detecção de células bacterianas e elementos característicos de fungos e de parasitas. Este método pode ser combinado com a adição de reagentes e colorações para detectar agentes etiológicos. As aplicações da microscopia são vastas e significativas para um diagnóstico eficiente.

3.3) Colorações

As colorações permitem a identificação de microrganismos presentes nas amostras pois coram componentes do material celular com recurso a reagentes adequados. Esta técnica é conjugada com a microscopia para observação da morfologia e posterior identificação^{5,33}.

3.3.1) Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma das colorações mais usadas nos laboratórios, quase todas as bactérias podem ser detetadas quando submetidas a esta técnica. O princípio divide as bactérias em Gram positivo e Gram negativo. As bactérias Gram positivo contêm na sua parede celular uma espessa camada de peptidoglicanos com ácido teicóico, que contribui para a resistência à descoloração do álcool e retenção do cristal violeta, apresentando uma coloração roxa. As bactérias Gram negativo não retêm o cristal violeta devido à sua complexa parede celular e adquirem coloração rosa^{5,33}.

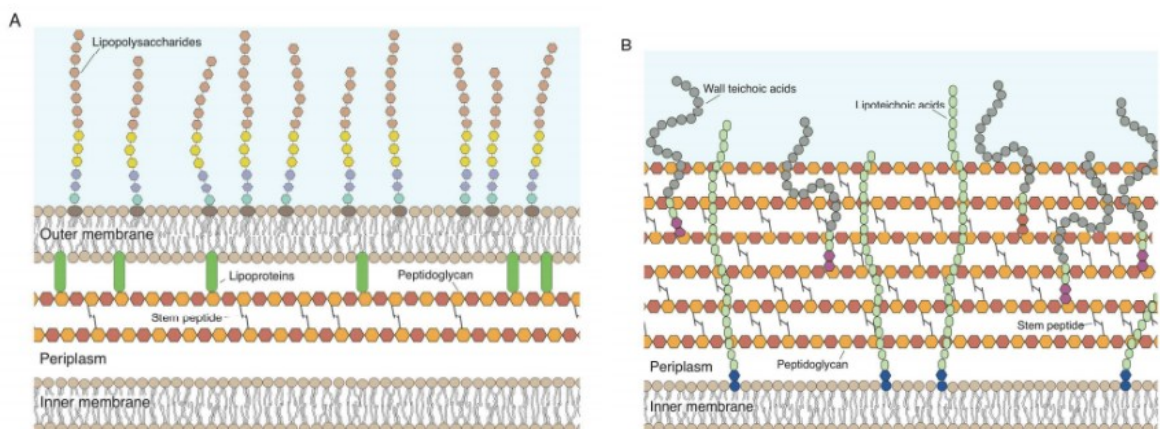


Figura 22: A: Parede celular de bactérias Gram negativo; B: Parede de bactérias Gram positivo. Adaptada de Auer & Weibel, 2017).

A coloração manual inicia-se com a fixação da lâmina à chama, de seguida esta é coberta com cristal violeta durante 2 minutos. Após este tempo, o cristal violeta é arrastado com lugol e deixa-se atuar durante 1 minuto de forma a formar um complexo com o cristal violeta. De seguida descora-se com álcool ou acetona e cobre-se a lâmina com safranina diluída durante 1 minuto. O complexo formado anteriormente é retido pelas bactérias Gram positivo, que apresentam cor roxa ao

microscópio, e a safranina é retida pelas bactérias Gram negativo, caracterizadas pela cor rosada⁵.

No laboratório de microbiologia é usado equipamento automatizado PREVI[®] Color Gram (Figura 23) utilizado para proceder à coloração, este equipamento facilita o fluxo de trabalho devido à rapidez e caracteriza-se por ser fácil manuseamento e por ser bastante seguro, não libertando aerossóis provenientes dos reagentes³⁴. Podem ser colocadas até 12 lâminas no rotor e os reagentes usados são os mesmos da coloração manual³⁴.



Figura 23: A: Equipamento PREVI[®] Color Gram para efetuar a coloração de Gram automatizada.

3.3.2) Coloração de Zhiel-Neelsen

A coloração Zhiel-Neelsen é específica para detetar bactérias ácido-álcool resistentes (BAAR), como por exemplo, a *Mycobacterium tuberculosis*⁵. Estas bactérias, devido ao elevado conteúdo de ácido micólico da parede celular, apresentam hidrofobicidade que permite a hidrofobicidade a outras colorações⁵.

A coloração manual inicia-se pela fixação do esfregaço pelo calor, de seguida cobre-se a lâmina com fucsina básica e aquece-se até a libertação de vapores para o corante ser absorvido. Deixa-se atuar a fucsina durante 3-5 minutos sempre aquecendo a lâmina, este reagente vai permitir que as BAAR adquiram a cor vermelha. De seguida, descora-se a lâmina com uma solução de álcool-ácido e cobre-se a lâmina com azul de metileno para obtenção de um fundo azul de contraste⁵.

Quando é necessária a pesquisa de BAAR no laboratório, é utilizado o equipamento automatizado Aerospray[®] TB Series 2 que faz a coloração de Zhiel-Neelsen, é um método de executar a coloração bastante rápido e seguro dado que não há libertação de vapores como na coloração manual³⁵. As lâminas são fixadas à chama e colocadas

no rotor, também com capacidade de 12 lâminas³⁵. Os reagentes são os mesmos da coloração manual.



Figura 24: Equipamento Aerospray ® TB Series 2.

3.3.3) Citospin

Ambos os equipamentos de coloração mencionados possuem um sistema de cito centrifugação com um rotor específico com capacidade até 8 lâminas^{34,35}. Este método permite que amostras pouco concentradas, através da centrifugação, se tornem mais concentradas, o que facilita a visualização das mesmas quando submetidas a algum tipo de coloração.

3.4) Meios de cultura⁵

A inoculação de amostras biológicas tem três principais objetivos: o crescimento e isolamento das bactérias, a identificação destas através do crescimento nos meios adequados, e por fim, a obtenção de crescimento suficiente que seja clinicamente relevante para identificação e caracterização.

Os meios de cultura podem ser **líquidos**, em que os nutrientes se encontram dissolvidos e o crescimento de bactérias induz uma mudança na aparência do meio; este torna-se turvo, e quanto mais crescimento houver, maior a turbidez. Os meios líquidos mais usados no laboratório encontram-se resumidos na tabela 1.



Figura 25: Meio de Todd-Hewitt do lado esquerdo com turvação e o do lado direito límpido.

Tabela 1: Meios de cultura líquidos usados no laboratório de microbiologia.

Nome	Tipo de Meio	Características	Microrganismos
Caldo de carne	Enriquecimento	Nitrogênio, fontes de carbono, dextrose e vitaminas para crescimento de microrganismos	
Todd-Hewitt	Seletivo	Ácido nalidíxico e gentamicina ou colistina para inibição de bactérias Gram negativo	Bactérias Gram positivo
Lowenstein	Seletivo	Verde de malaquite e sais minerais	Micobactérias
Tetracionato	Seletivo	Sais biliares e tiosulfato de sódio que impede o crescimento de bactérias Gram positivo e <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella spp.</i>

Os meios de cultura **sólidos** contêm também nutrientes dissolvidos em água, contudo é-lhes adicionado um agente solidificante, como por exemplo, a agarose. Estes podem ser classificados em:

- meios de enriquecimento, formulados com nutrientes específicos para permitir o crescimento a maior parte dos microrganismos;



Figura 26: Meio Gelose de Sangue, meio de enriquecimento. Neste meio é possível detetar a beta hemólise proveniente do microrganismo *Staphylococcus epidermidis*, os eritrócitos do meio servem de nutriente e ocorre a lise.

- meios seletivos, que permitem o crescimento de certo tipo de microrganismos numa mistura de vários agentes, estes meios contêm inibidores de suprimem o crescimento de organismos não desejados;
- meios diferenciais, que permitem a exibição de características metabólicas e deste modo é possível distinguir várias espécies de microrganismos na mesma placa;



Figura 27: Meio de Manitol Sal, meio seletivo para *Staphylococcus* sp. e diferencial dado que passa de cor-de-rosa a amarelo na presença de *S.aureus*.

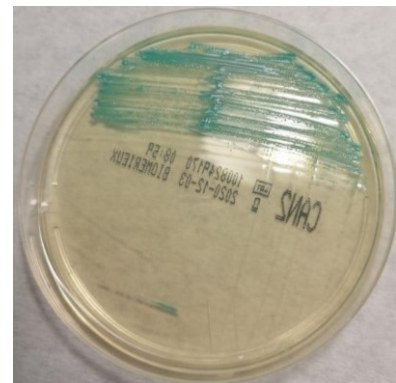


Figura 28: Meio Candida, meio seletivo para fungos e diferencial com identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, cada uma apresenta uma cor diferente como verde, azuis metalizadas e cor-de-rosa, respetivamente.

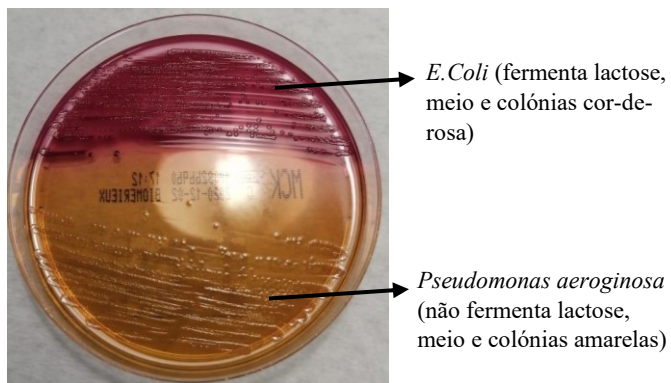


Figura 29: Meio MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram negativo. Também é um meio diferencial pois permite identificar bactérias fermentadoras e não fermentadoras da lactose.



Figura 30: Meio MRSA, meio seletivo para *Staphylococcus spp.*. Também é um meio cromogénico diferencial pois permite identificar as colónias de *S.aureus* meticilina resistentes pois adquirem a cor verde.

- meios especializados, meios criados para a deteção de determinados microrganismos que são fastidiosos ou que normalmente se encontram em grandes misturas de organismos.

Os meios de cultura sólidos mais usados no laboratório encontram-se resumidos na tabela 2.

As amostras são inoculadas em meios de cultura sólidos de forma quantitativa ou semi quantitativa, dependendo do objetivo e do produto biológico em questão. Quando o produto biológico é, por exemplo, urina, o inóculo é feito de modo quantitativo usando uma ança calibrada de 1 microlítro e estrias transversais, com o objetivo de contar as colónias (Figura 31A).

O inóculo feito por quadrantes trata-se de um método semi quantitativo, onde a finalidade é isolar as colónias para se proceder à identificação e caracterização das mesmas (Figura 31B).

A sementeira dos meios pode também efetuar-se em rede de forma a impregnar o meio de maneira homogénea quando se pretende executar antibiogramas manuais. Inocula-se apenas uma colónia com uma zaragatoa, as estrias são feitas horizontalmente, verticalmente e na diagonal em toda a placa de cultura (Figura 31C).

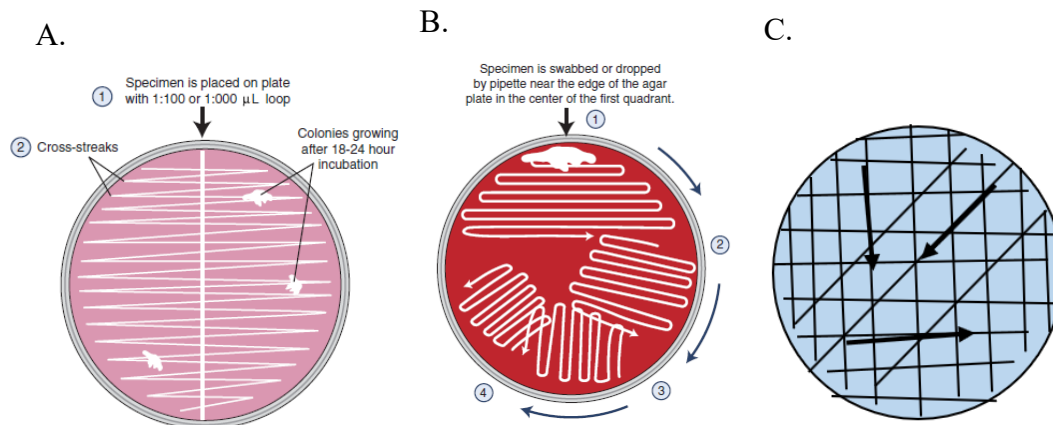


Figura 31: Métodos de inoculação em meios de cultura sólidos: A) Por contagem adaptado de (Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, 2015); B) Por quadrantes adaptado de (Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, 2015); C) Em rede.

Tabela 2: Meios de cultura sólidos no laboratório de microbiologia.

Nome	Tipo	Características	Microrganismos
Gelose de Sangue	Enriquecimento	Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro.	Bactérias e fungos
Gelose MacConkey	Seletivo e diferencial	Cristal violeta para diferenciar fermentação de lactose e sais biliares para inibir Gram positivo	Bactérias Gram negativo com distinção das fermentadoras de lactose de através da mudança de tonalidade do meio
Gelose Chocolate Haemophilus	Seletivo	Sangue aquecido que fornece os fatores X e V, provenientes da hemoglobina presente no meio, e antibióticos para tornar o meio seletivo	<i>Haemophilus</i> spp.
Gelose Chocolate + PolyVitex	Seletivo	Sangue aquecido que fornece os fatores X e V, fornecidos pela hemoglobina.	Bactérias fastidiosas como <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Gelose SS	Seletivo	Lactose, ferritina, citrato de sódio e vermelho neutro com indicador de pH para verificar fermentação de lactose.	<i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> , apresentam colônias incolores ou cor-de-rosa, respectivamente. A <i>Salmonella</i> produz H ₂ S e por isso as colônias apresentam centro preto.

Gelose Yersinia	Seletivo	Peptonas, manitol e vermelho neutro	<i>Yersinia enterocolitica</i> com colónias vermelhas devido à fermentação de manitol
Gelose Candida ID	Seletivo para fungos e diferencial	Nutrientes e substratos cromogénicos	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> , cada uma apresenta uma cor diferente como verde, azuis metalizadas e cor-de-rosa, respetivamente.
Gelose Sabouraud	Seletivo	Elevada concentração de glucose, pH ácido e antibióticos presentes como penicilina e gentamicina para inibir bactérias	Leveduras, bolores e dermatófitos
Gelose Campyloesel	Seletivo	Sangue de carneiro, agentes redutores, antibióticos e antifúngicos	<i>Campylobacter jejuni</i>
Gelose CNA + 5% sangue de carneiro	Seletivo	Nutrientes, antibiótico colistina e ácido nalidíxico	Bactérias Gram positivas
Gelose MRSA	Seletivo e diferencial	Nutrientes, antibióticos que inibem bactérias não pertencentes à espécie em estudo e substrato cromogénio	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina que se apresentam em colónias verdes
Mueller-Hinton	Enriquecido	Vários nutrientes	Testar a suscetibilidade a antibióticos de agentes patogénicos através da difusão por discos.
Gelose Chocolate + PolyVitex VCAT3	Seletivo	Antimicrobianos, antifúngicos, nutrientes e fatores X e V, fornecidos pelo PolyVitex e pela hemoglobina.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>
Granada	Seletivo	Substrato cromogénico, inibidores seletivos de	<i>Streptococcus agalactiae</i> que se

		fungos e bactérias que não pertençam à espécie em estudo	<i>apresentam com colónias cor-de-laranja</i>
Gelose Manitol Sal	Seletivo para <i>staphylococcus</i> e diferencial	Nutrientes e manitol	<i>Staphylococcus; staphylococcus aureus</i> fermenta o manitol e torna o meio amarelo

3.5) Amostras Biológicas³⁶

3.5.1) Urina

O exame cultural da urina é efetuado com uma ansa calibrada de 1 µL para contagem de colónias. Os meios utilizados para este exame são Gelose de Sangue e MacConkey, que incubam durante 18 a 24 horas a 35°C. O meio Candida é também inoculado se houver suspeita de candidíase, sendo incubado durante 24 a 48 horas, a 30°C.

O exame citológico é feito após o exame cultural. Consiste na separação de uma alíquota para um tubo de centrífuga de 10mL, que introduzido no equipamento com um módulo SediMax, que através da microscopia, deteta eritrócitos, leucócitos, cristais, células epiteliais, bactérias e leveduras. As urinas passam também por um módulo denominado AutionMax, que através da refletância de biocromatismo com tiras de teste, analisa a densidade, cor, glicose, bilirrubina, pH, proteínas e corpos cetónicos. Se for solicitada a pesquisa de BAAR, procede-se à preparação de um esfregaço e posterior coloração de Zhiel-Neelsen. Se solicitado exame cultural de BAAR, é separada uma alíquota da amostra num frasco de 50mL que é enviado para o sector de Micobactérias.

Para a pesquisa de antígenos urinários para *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* é usado o teste rápido ImmuView® *S. pneumoniae* e *L. pneumophila* Antigen Test, que deteta um dos antígenos ou ambos. O procedimento consiste na adição de três gotas de urina e duas gotas de tampão de análise num tubo de ensaio, de seguida coloca-se a tira de teste no tubo e aguarda-se 15 minutos para se observar o resultado. O resultado é negativo se apenas aparecer a linha de controlo, o resultado é positivo para *L. pneumophila* se aparecer a tira do controlo e uma tira azulada e positivo para *S. pneumoniae* se se observar a linha do controlo e uma linha abaixo avermelhada. Também pode ser positivo para ambos os antígenos, neste caso aparece a linha do controlo, uma linha avermelhada e uma linha azulada. É um teste imunocromatográfico de fluxo lateral que permite um prognóstico imediato para ambas as doenças causadas pelas bactérias com a finalidade de um tratamento antecipado.

3.5.2) Fezes

Para se processarem as fezes, é necessário observar as mesmas macroscopicamente. Se estas se apresentarem moldadas, devem ser rejeitadas para o exame cultural (coprocultura), com a exceção de utentes imunocomprometidos (HIV). Por outro lado, a coprocultura não é realizada se o doente se encontrar internado há mais de 72 horas.

A coprocultura é semeada nos meios MacConkey, que incuba a 35°C durante a 24 horas; meio SS, que incuba a 35°C durante 24 horas; meio Yersinia, que incuba a 30°C durante 24 horas; meio Campylobacter que incuba em atmosfera de microaerofilia a 42°C durante 48 horas; meio Tetrationsato com 4 gotas de lugol que incuba a 35°C durante 6 horas e após esse período é feita uma passagem para meio SS; e meio E.Coli O:157 a 35°C durante a 24 horas, semeado apenas com amostras de crianças até 5 anos.

3.5.2.1) Testes Rápidos Imunocromatográficos:

Pesquisa de Sangue Oculto³⁷: Fecal Occult Blood Rapid Test é um teste rápido de imunoensaio cromatográfico para deteção qualitativa de sangue humano oculto nas fezes. Várias doenças podem provocar a existência de sangue oculto nas fezes como cancro do cólon, úlceras, colite e fissuras, e por isso o teste em questão ajudará no diagnóstico exato e antecipado das patologias.

O teste pode detetar 6 µg de hemoglobina por g de fezes e o procedimento consiste em recolher amostra com a vareta coletora que se insere no tubo coletor, agita-se o tubo vigorosamente para uma eficaz extração com o tampão que o tubo contém e transferem-se três gotas da amostra extraída para a cassette; o resultado pode ser lido após 5 minutos.

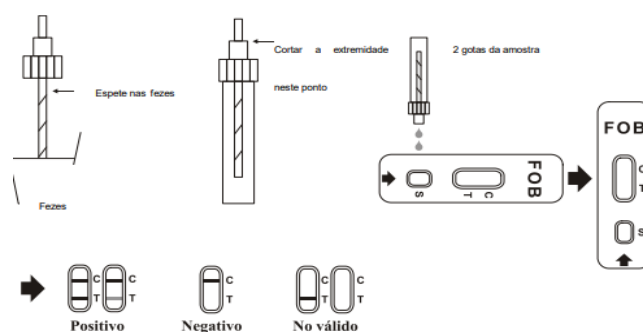


Figura 32: Procedimento do teste Fecal Occult Blood Rapid Test.

Pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*³⁸: O teste Rapid-VIDITEST *Crypto-Giardia*® é um teste rápido de imunoensaio cromatográfico que deteta qualitativamente os antígenos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, parasitas

microscópicos que vivem no intestino por longos períodos de tempo nas fezes humanas de maneira a diagnosticar criptosporidiose e giardíase.

Para execução do teste, a vareta coletora inserida no tubo coletor é colocada na amostra de maneira a recolher 125mg de fezes, é introduzida novamente no tubo e este é agitado vigorosamente para se proceder à extração dos antígenos com o tampão. Seguidamente, deitam-se 4 gotas na cassete e o resultado deve ser lido em 10 minutos. O resultado é negativo se apenas aparecer a linha correspondente ao controlo na cassete (marcado com letra C), positivo para *Cryptosporidium* se aparecer a linha do controlo e uma linha vermelha na região marcada com a letra T, positivo para *Giardia* se aparecer a linha do controlo e uma linha azul perto da região marcada com a letra T; e, por fim, o resultado pode ser positivo para *Cryptosporidium* e *Giardia* em simultâneo, desta maneira aparecem três linhas com as cores verde, relativamente ao controlo, vermelha e azul.

Pesquisa de Parasitas³⁹: O StorAX SAF ® consiste num sistema de concentração parasitológico; este contém uma solução SAF (acetato de sódio, ácido acético e formaldeído) que é um fixador para conservar cistos e trofozoítos. É recolhida uma alíquota de fezes humanas com a espátula inserida no tubo coletor, seguidamente é usado o vórtex para homogeneização, fixação e extração da amostra. Posteriormente, esta amostra fixada é colocada num tubo de centrífuga, a centrifugação é feita a 2000 rpm durante 10 minutos e decantado o sobrenadante para se observar o sedimento no microscópio.

Pesquisa de *Helicobacter pylori*⁴⁰: O teste Pylori-Strip é utilizado para a deteção da bactéria *Helicobacter pylori*, uma das principais causas de gastrite crónica e úlcera péptica. Esta bactéria aloja-se no estômago, mas pode ser encontrada nas fezes e na saliva.

Este teste consiste na adição de 14 gotas de tampão de extração num tubo e diluição da amostra fecal com uma ansa calibrada neste tampão. Após homogeneização do tubo é adicionada a fita do teste. O resultado pode ser lido após 15 minutos, este é considerado negativo se apenas aparecer a linha correspondente ao controlo, ou, positivo se aparecerem duas linhas na tira, uma correspondente ao controlo e outra correspondente ao teste.

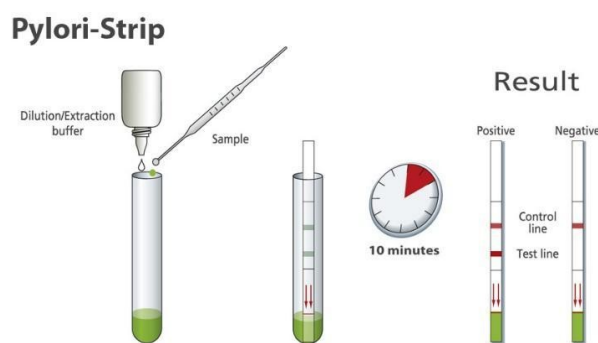


Figura 33: Procedimento do teste Pylori-Strip.

Pesquisa de *Clostridium difficile*⁴¹: O teste C. DIFF QUIK CHEK® é um teste rápido de imunoensaio que deteta o antigénio do *Clostridium difficile*, glutamato desidrogenase e as toxinas A e B na cassette. Após o tratamento com antibióticos, muitos pacientes desenvolvem diarreia severa e colite provocadas muitas vezes por microrganismos oportunistas como *Clostridium difficile*, que cresce no intestino devido á alteração da flora intestinal causada pelos antibióticos. A estirpe toxigénica da bactéria em questão produz dois tipos de toxinas, A e B, ou apenas produz a toxina B. A toxina A é uma enteroxina que danifica os tecidos e a toxina B é considerada a toxina citotóxica. As estirpes toxigénicas e não toxigénicas produzem glutamato desidrogenase, que pode ser detetado para um diagnóstico mais rápido e eficaz.

O teste consiste em adicionar 750 µL de diluente num pequeno tubo, 1 gota de conjugado e 25 µL de amostra fecal. De seguida são retirados 500 µL deste preparado e depositados no poço da cassette, seguindo-se um período de incubação de 15 minutos. Após este período de tempo são adicionados 300 µL de tampão e uma gota de substrato ao poço de leitura; o resultado deve ser lido após 10 minutos.

A cassette apresenta três pontos no meio que corresponde ao controlo, validando o teste. O resultado é negativo se apresentar os pontos correspondentes ao controlo, positivo para *Clostridium difficile* se apresentar uma linha à esquerda dos pontos e positivo para *Clostridium difficile* produtor de toxinas se apresentar duas linhas na cassette, uma de cada lado dos pontos como podemos observar na imagem.



Figura 34: Cassete do teste C. DIFF QUIK CHEK® com resultado positivo para o antígeno do Clostridium difficile e positivo para produção de toxinas.

Pesquisa de Rotavirus e Adenovirus⁴²: Rotavírus e Adenovírus são a principal causa de gastroenterite severa em bebês e crianças; contudo podem também causar esta patologia em adultos. O CerTest Rotavirus + Adenovirus One Step é um teste simples e bastante sensível para diagnosticar a infecção.

O procedimento inicia-se com a recolha da amostra fecal com a vareta coletora que se insere no tubo coletor e a homogenização da amostra com a tampão de extração já presente no tubo. De seguida, são adicionadas 4 gotas no poço A e 4 gotas no poço B, respetivo para cada vírus em estudo, e o resultado deve ser lido após 10 minutos. Este resultado é negativo se apenas aparecer a linha correspondente ao controlo e positivo para cada um dos vírus se aparecer a linha do controlo e a linha correspondente ao teste.

Pesquisa de Norovirus⁴³: O teste RIDA®QUICK Norovirus Test é um teste imunocromático para deteção de norovírus dos genogrupos 1 (GG I) e genogrupo 2 (GG2). Este vírus é a maior causa de gastroenterite em todo o mundo.

O teste consiste na preparação do reagente de extração, em que se adicionam 0,5mL de reagente A e 0,5mL de reagente B num eppendorf. Depois são adicionados 50 µl de amostra fecal e posterior homogeneização. Após 5 minutos de sedimentação, retira-se 150 µl do sobrenadante e coloca-se no poço da cassete. A leitura do teste deve ser efetuada em 15 minutos. O resultado é negativo se apenas aparecer a linha correspondente ao controlo e positivo se aparecer a linha do controlo e a linha do teste.

3.5.3) Aparelho Respiratório

3.5.3.1) Expetoração e secreções brônquicas

Deve ser efetuado um exame macroscópico deste tipo de amostras e verificar se o aspeto é purulento, hemoptóico ou salivar. Este último constitui um critério de rejeição para futuros exames.

Após o exame macroscópico, é feito o exame microscópico e procede-se à coloração. A preparação das lâminas é feita por esmagamento, fixadas à chama e depois efetuadas a coloração de Gram, para avaliação de células epiteliais e polimorfonucleares com a objetiva de 10X e também a observação de microrganismos presentes na amostra com a objetiva de 100x, e é também efetuada a coloração de Zhiel-Neelsen, com a finalidade da pesquisa de BAAR.

O exame cultural é feito se a amostra apresentar número de células epiteliais inferior a 25 por campo e apresentar um número superior a 20 leucócitos por canto, o que indica que a amostra é produtiva e não salivar. A sementeira é realizada por quadrantes nos meios de Gelose Sangue, que incuba em atmosfera de CO₂, Gelose Chocolate *Haemophylus* e também MacConkey. Os meios mencionados incubam durante 24 a 48 horas, a 35°C.

Quando solicitado um exame micológico, a amostra é semeada em gelose Sabouraud, que incuba a 30°C durante 24 a 48 horas.

Para o exame cultural de BAAR, separa-se uma alíquota da amostra, em frasco de centrífuga de 50 mL e envia-se para o sector específico de Micobactérias.

3.5.3.2) Lavado Bronco-Alveolar e Aspirado brônquico

No lavado bronco-alveolar, os esfregaços são efetuados após cito centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Os aspirados devem ser centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos antes de serem processados. Segue-se o exame microscópio com a preparação das lâminas por estiramento e as colorações de Zhiel-Neelsen, para pesquisa de BAAR, e coloração de Gram, para avaliar o número de células epiteliais brônquicas e observação de microrganismos presentes. A observação de células epiteliais pavimentosas superior a 1% sugere contaminação com flora da orofaringe.

O exame cultural nos lavados bronco-alveolares procede-se com uma ansa calibrada de 10 µL para contagem de colónias, após agitação no vórtex durante 30 a 60 segundos. Os aspirados brônquicos deverão ser centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos, e o

sedimento é semeado por quadrantes no meio Gelose Chocolate Polyvitex (PVX) que incuba a 35°C numa atmosfera de CO₂ durante 48 horas.

3.5.4) Hemocultura

Os frascos são incubados no equipamento *BacT/ALERT 3D* durante 5 dias, com as exceções de exame micológico, que incuba durante 14 dias, e também nos casos de suspeita de Endocardite, Brucelose ou bactérias do grupo HACEK (*Haemophilus spp*, *Aggregatibacter spp*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*) que incubam durante 28 dias pois têm crescimento fastidioso. Este equipamento tem as condições necessárias ao crescimento de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras em amostras de sangue. Estas amostras encontram-se em frascos de cultura, a cada colheita são retirados 20 mL, 10mL para um frasco de anaerobiose e 10 mL para um frasco de aerobiose.

As garrafas são colocadas no equipamento para se efetuar a incubação durante o período necessário, os frascos que apresentarem crescimento microbiano são classificados como positivos, e os frascos que após o período determinado de incubação não obtiverem crescimento de microrganismos, são indicados como negativos. O crescimento de microrganismos é detetado colorimetricamente em que sensores de emulsão líquida mudam de cor quando o pH altera com o aumento de CO₂ pela produção deste pelos microrganismos. Esta mudança de cor do fundo do frasco de cinzento para amarelo é reconhecida pelo sistema através da luz incidente com leituras feitas de 10 em 10 minutos.



Figura 35: Garrafas de hemoculturas, a garrafa da esquerda apresenta coloração amarela, que indica crescimento bacteriano; a garrafa da direita apresenta cor cinzenta, indicando ausência de crescimento bacteriano.

Quando o equipamento deteta uma alteração da cor, o frasco referente é indicado como positivo e procede-se à hemocultura do mesmo. O procedimento é feito por repicagem

para meios de cultura sólidos e prepara-se um esfregaço para coloração de Gram. É fundamental que a tampa da garrafa seja desinfetada com álcool 70% antes do processo. Se o frasco positivo for aeróbio ou pediátrico, os meios semeados por quadrantes são Gelose de sangue em atmosfera de CO₂ e também MacConkey, ambos incubam a 35°C durante 24 a 48 horas; no caso de ser anaeróbio, os meios semeados são Gelose de sangue em atmosfera de anaerobiose e também Gelose de sangue Polyvitex (PVX) em atmosfera de CO₂, ambos os meios incubam a 35°C durante 48 a 72 horas.

3.5.5) Cateter

O cateter vascular é processado sempre que se suspeita se o utente apresenta bacterémia associada a cateter. Este deve vir sempre acompanhado de hemocultura, caso contrário é critério de rejeição da amostra.

O exame cultural é realizado com a técnica semi quantitativa de Maki, ou seja, rola-se a ponta do cateter 4 vezes em Gelose Sangue. Este meio é incubado a 35°C em atmosfera de CO₂ durante 48 horas, é visualizado nas 24 e nas 48 horas. No término do período de incubação, são contadas as colónias e o resultado é considerado positivo sempre que houver um número de colónias superior a 15 unidades formadoras de colónias (UFC).

3.5.6) Exsudado vaginal e uretral

O exame citológico é efetuado para pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, um parasita eucariota flagelado que se transmite sexualmente, este causa uma infeção vaginal que tem como principais manifestações a inflamação e erosão do revestimento epitelial⁵. A zaragatoa com soro deve permanecer a 35°C durante pelo menos 30 minutos, com a finalidade do parasita flagelado não perder a motilidade ao permanecer a uma temperatura próxima a temperatura corporal. Após este período de tempo, a zaragatoa é pressionada contra a lâmina, adicionada uma lamela em cima e observa-se ao microscópio com uma objetiva de 40X com a finalidade de avaliação do número de células epiteliais, polimorfonucleares e pesquisa de *Trichomonas*.

O exame cultural é feito a partir da zaragatoa com carvão ou meio de Stuart e a sementeira é efetuada por quadrantes nos meios Gelose de sangue, que incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C; Gelose chocolate VCAT, em atmosfera de CO₂ a 35°C; e Gelose Candida que incuba a 30°C. Os meios mencionados incubam durante 48 horas.

A pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é feito por rotina a grávidas quando atingem as 34/35 semanas de gestação dado que este microrganismo é a principal causa infeção neonatal durante a gravidez e pós-parto, associada a taxas de mortalidade elevadas em

partos prematuros. Para tal é feita uma colheita de exsudado vaginal e outro exsudado retal. Para o exame cultural, as zaragatoas são colocadas em meio Todd-Hewitt, a 35°C durante 24 horas. Este meio líquido é posteriormente repicado para meio Granada, coloca-se uma lamela sobre a sementeira e incuba-se este meio a 35°C durante 24 horas em atmosfera de anaerobiose.

3.5.7) Líquidos biológicos

3.5.7.1) Líquido pleural

Este líquido biológico encontra-se no espaço pleural, ou seja, entre duas camadas finas que revestem os pulmões. A acumulação de líquido pleural neste espaço pode ocorrer quando existe uma pneumonia, tumor ou insuficiência cardíaca. Desta forma é essencial testar a amostra para saber se estamos perante uma infeção de origem bacteriana. O produto é centrifugado a 2000 rpm durante dez minutos sempre que houver quantidade suficiente desta amostra. Rejeita-se o sobrenadante e processa-se o sedimento.

O exame microscópico é feito através da preparação de duas lâminas, fixação destas e procede-se à coloração de Gram e coloração de Zhiel-Neelsen. O exame cultural consiste na realização da sementeira por quadrantes nos meios Gelose sangue, que incuba em atmosfera de CO₂, Gelose chocolate *haemophilus*, MacConkey e inocula-se um frasco de hemocultura pediátrica (1 a 3 mL) ou em caldo de carne se a quantidade for inferior a 1 mL. Os meios incubam durante 24 a 48 horas, a 35°C.

Se pedido, é separada uma alíquota da amostra num frasco de centrífuga de 50 mL para pesquisa de BAAR e enviada para o sector de Micobactérias.

3.5.7.2) Líquido ascítico

O líquido ascítico é um fluido biológico presente na cavidade abdominal, quando este se encontra aumentado poderá indicar insuficiência cardíaca, cirrose hepática ou infeções. Os exames cultural e microscópico efetuados permitem identificar se a origem da acumulação é uma infeção bacteriana.

Sempre que a quantidade é suficiente, o produto deve ser concentrado através de centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, rejeitando-se o sobrenadante e processando-se o sedimento.

O exame microscópico é feito através da preparação de duas lâminas e de seguida efetuadas as colorações de Gram e de Zhiel-Neelsen.

O exame cultural é realizado por sementeira por quadrantes nos meios Gelose sangue, que incuba em atmosfera de CO₂, MacConkey. Se o volume de amostra for inferior a 1 mL deve inocular-se um frasco de hemocultura pediátrica (1 a 3 mL) ou caldo de carne. Os meios mencionados incubam a 35°C durante 24 a 48 horas.

Se pedido, é separada uma alíquota da amostra num frasco de centrífuga de 50 mL para pesquisa de BAAR e enviada para o sector de Micobactérias.

3.5.7.3) Líquido sinovial ou articular

Este fluido encontra-se nas cavidades articulares e tem como função lubrificar as articulações. Os exames efetuados permitem o diagnóstico de uma artrite infecciosa com origem bacteriana.

Sempre que a quantidade é suficiente, o produto deve ser concentrado através de centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, rejeitando-se o sobrenadante e processando-se o sedimento.

O exame microscópico é feito através da preparação de duas lâminas e de seguida efetuadas as colorações de Gram e de Zhiel-Neelsen.

O exame cultural é realizado por quadrantes nos meios Gelose sangue, que incuba em atmosfera de CO₂; Gelose chocolate VCAT, que incuba em atmosfera de CO₂; MacConkey; inocular num frasco de hemocultura pediátrica (1 a 3mL) ou caldo de carne se o volume for inferior a 1mL. Os meios mencionados incubam a 35°C durante 24 a 48 horas.

Se pedido, é separada uma alíquota da amostra num frasco de centrífuga de 50 mL para pesquisa de BAAR e envia-se para o sector de Micobactérias.

3.5.7.4) Líquido Cefalorraquidiano

É um líquido que envolve o cérebro e a medula espinal e as suas principais funções são de proteção e transporte de nutrientes. Normalmente são colhidos três tubos de LCR, onde são realizados os testes citológicos, microscópico e cultural, estes auxiliam no diagnóstico de infeções, como por exemplo, a meningite bacteriana. Caso seja pedido exame citológico, este é realizado na câmara de contagem de Nageotte. Este exame permite a observação e quantificação de células como eritrócitos, leucócitos e plaquetas, permite também a deteção de leveduras ou bactérias, o que permite a orientação do diagnóstico do paciente.



Figura 36: Câmara de contagem de Nageotte.

O exame microscópico é feito através da preparação de duas lâminas e realização das colorações de Gram e de Zhiel-Neelsen. O exame cultural é efetuado após centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, se houver a quantidade suficiente, sendo descartado o sobrenadante e processado o sedimento. A sementeira é realizada por quadrantes nos meios Gelose sangue, que incuba em atmosfera de CO₂, a 35°C durante 24 a 48 horas; Gelose chocolate, que incuba em atmosfera de CO₂, a 35°C durante 24 a 48 horas; e meio Sabouraud, que incuba a 30°C durante 48 horas. É também inoculado 1 a 3 mL numa garrafa de hemocultura pediátrica; caso o volume de amostra seja inferior a 1 mL, inocula-se em caldo de carne.

3.5.8) Pús

A amostra de pús pode chegar ao laboratório em meio de Portagerme ou então em zaragatoa. O meio Portagerme permite a esterilidade do pús e contém um gel que se torna azul quando há contaminação por oxigénio, deste modo é possível verificar se foram mantidas as condições de anaerobiose. A finalidade é conservar os microrganismos anaeróbios, dado que estes podem ser os causadores da infeção. Para se processar a amostra em meio de portagem, deve verificar-se se o gel tomou a cor azul, de seguida deve desinfetar-se a tampa do frasco com álcool a 70°C, retira-se a amostra do frasco com uma seringa e coloca-se uma gota em cada meio e numa lâmina. Para o exame microscópico, é efetuada a coloração de Gram. Para o exame cultural, a sementeira é executada nos meios Gelose sangue, que incuba em atmosfera de CO₂; MacConkey; Gelose sangue, que incuba em atmosfera de anaerobiose apenas se não houver contaminação com oxigénio do pús em Portagerme; caldo de carne, e Gelose Cândida, que incuba a 30°C.

Caso a amostra se encontre em duas zaragatoas, uma seca e outra em meio de transporte, coloca-se a zaragatoa seca em caldo de carne e faz-se o exame cultural com a zaragatoa

em meio de transporte nos mesmos meios usados para pús em portagerme, com a exceção do meio Gelose de sangue em meio de anaerobiose que não é semeado.

Se apenas for enviada uma zaragatoa, coloca-se apenas em caldo de carne e semeada nos meios sólidos caso haja crescimento bacteriano, detetado pela turvação do meio.

3.5.9) Esperma

Esta amostra permite identificar infecções bacterianas ou fúngicas presentes no aparelho reprodutor do homem. O exame citológico desta amostra é feito numa lâmina, com a objetiva de 40X no microscópio e realiza-se para avaliar o número de células epiteliais, polimorfonucleares e também para avaliar a presença de *Trichomonas*.

O exame cultural é processado através da sementeira por quadrantes nos meios sólidos Gelose chocolate polyvitex, que incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C durante 48 horas; MacConkey, que incuba a 35°C durante 24 horas, e também Gelose chocolate VCAT que incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C durante 48 horas.

3.5.10) Biópsia

Esta amostra deve ser reduzida em pequenas partes com o auxílio do bisturi. O exame cultural é realizado nos meios Gelose de sangue, em atmosfera de CO₂, e MacConkey, incubam ambos a 35°C durante 24 horas. É também inoculada a amostra em caldo de carne. Para o exame microscópico, um pedaço de biópsia é esmagado contra a lâmina e esta é corada pela técnica de Gram.

3.6) Testes de Identificação Microbiana Manual

3.6.1) Teste da Catalase

Este teste permite distinguir bactérias Gram positivo do género *Streptococcus*, que apresentam uma reação de catalase negativa, de bactérias dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, que mostram uma reação positiva.

Esta distinção é possível porque as bactérias contêm catalase, uma enzima que permite a destruição de peróxidos produzidos durante as reações de oxidação. Ocorre formação de duas moléculas de água e uma de oxigénio e libertação de bolhas.

É utilizado o teste ID color Catalase da Bio-Merieux®, numa lâmina é colocado uma gota de reagente e emulsionadas duas colónias em estudo. O aparecimento de efervescência ocorre em 5 segundos, o que torna este teste de identificação rápido e eficaz.



Figura 37: Teste da catalase, do lado esquerdo observa-se um resultado positivo com visualização da efervescência e do lado direito observa-se um resultado negativo com ausência de efervescência.

3.6.2) Teste da Coagulase

Este teste serve para identificar *Staphylococcus aureus*, que corresponde á única espécie de *Staphylococcus* coagulase positivo patogénica para o Homem. Esta distinção é possível porque as bactérias desta espécie produzem a enzima coagulase.

Numa lâmina coloca-se uma gota do reagente e gota do controlo, emulsionam-se uma a duas colónias em estudo e agita-se lentamente o cartão ate 30 segundos, observando o aparecimento de aglutinação.



Figura 38: Teste da coagulase, do lado esquerdo observa-se um resultado positivo com visualização de aglutinação e do lado direito observa-se um resultado negativo com ausência de aglutinação.

3.6.3) Tipagem de Streptococcus β hemolíticos

Remel™ PathoDxtra™ Strep Grouping Kit é um kit específico para deteção de anticorpos específicos de *Streptococcus* β -hemolíticos consoante a classificação de Lancefield (A, B, C, D, F e G) a partir de placas de culturas primárias. O antigénio é extraído e testado na lâmina de teste revestida de IgG, o teste é considerado positivo se houver aglutinação granular visível a olho nu.

O procedimento consiste numa primeira fase em que se procede á preparação do extrato, num tubo de hemólise, coloca-se 400 μ l de enzima de extração, extraem-se 2 a 3 colónias da cultura e emulsionam-se no volume de enzima de extração. Mistura-se bem e incuba-se a 37°C durante 10 a 15 minutos.

De seguida, homogenizam-se corretamente as suspensões de látex, coloca-se uma gota de cada antissoro nos respetivos poços. Colocam-se também 25 μ l da solução de extrato

ao lado da gota de cada antissoro, misturam-se as gotas com um bastonete e efetua-se um movimento rotativo durante 1 minuto. A aglutinação pode ser observada a olho nu e determina o resultado deste teste.

Para leitura e interpretação dos resultados, o aparecimento de aglutinação em menos de 2 minutos indica um resultado positivo e a ausência de aglutinação indica resultado negativo, sendo que aglutinação fraca deve ser desprezada.

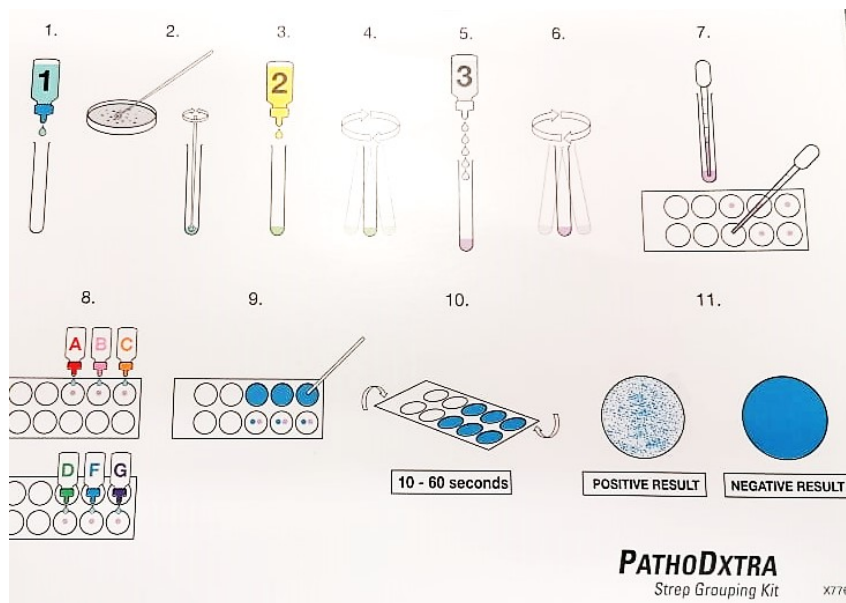


Figura 39: Procedimento do teste Remel™ PathoDxtra™ Strep Grouping Kit.

3.6.4) Teste de Inibição à Bacitracina

Este teste permite diferenciar os *Streptococcus* hemolíticos do grupo A (classificação de Lancefield) dos outros *Streptococcus* hemolíticos, dado que a bacitracina inibe *Streptococcus* hemolíticos do grupo A. É semeada uma placa de gelose sangue em rede com uma zaragatoa, coloca-se o disco de bacitracina de 0,04 unidades no centro das estrias, incuba-se durante 18 a 24 horas a 35°C. Se houver zona de inibição, o teste é positivo e não estamos perante *Streptococcus* hemolíticos do grupo A.

3.6.5) Teste de Resistência à Novobiocina

O teste de resistência à novobiocina orienta a identificação de *Staphylococcus* coagulase negativa, permitindo diferenciar *S. epidermidis* (sensível à novobiocina) de *S. saprophyticus* (resistente).

O teste consiste na efetuação de uma suspensão de colónias em estudo em solução de NaCl 0,85% até atingir 0,5 na escala de McFarland, um padrão de turvação que

determina a intensidade do crescimento bacteriano verificado no densitômetro *Vitek*®, e inoculação em placa de Mueller-Hinton pela técnica de rede com uma zaragatoa. Coloca-se um disco de novobiocina e incuba-se o meio na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas. Se houver um halo de inibição em redor do disco superior a 16mm, estamos perante *S. epidermidis*; se houver crescimento em redor do disco, estamos perante *S. saprophyticus*.

3.6.6) Teste de Resistência à Optoquina

Para identificação de *Streptococcus pneumoniae* procede-se ao teste da sensibilidade à optoquina, estes são sensíveis e os restantes *Streptococcus* são resistentes.

É semeada uma placa de Gelose Sangue pela técnica de rede com uma cultura pura das colónias a identificar, coloca-se um disco de optoquina e incuba-se na estufa a 35°C durante 18 a 24 horas. O resultado é considerado positivo quando se observa um halo de inibição em redor do disco (12 a 35mm), confirmando que estamos perante *Streptococcus pneumoniae*; se o resultado for negativo observa-se crescimento em redor do disco.

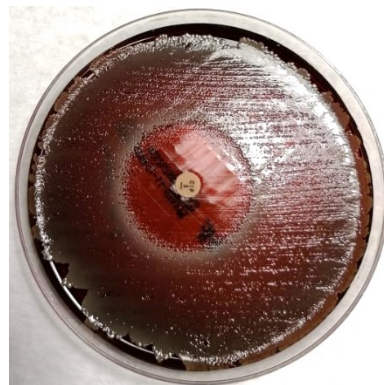


Figura 40: Meio GS com disco de optoquina. Observa-se sensibilidade a este antibiótico logo o microrganismo presente é o *Streptococcus pneumoniae*.

3.6.7) Teste dos Fatores X, V, XV

Este teste permite a identificação de *Haemophilus influenzae* e baseia-se na dependência deste dos fatores de crescimento X, V e XV.

É semeada uma placa de Mueller-Hinton em rede com uma cultura pura das colónias a identificar, colocam-se os discos dos fatores X, V, e XV afastados para não haver sobreposições, e incuba-se na estufa a 37°C durante 18 a 24 horas.

3.7) Testes Serológicos³⁶

3.7.1) Identificação de Antígenos Febris

A detecção de anticorpos presentes no soro do doente quando ocorre uma suspeita de infecções bacterianas causadas por *Brucella abortus* e *Salmonella*. Este teste destina-se à detecção do título de anticorpos contra a *Brucella abortus*, *Salmonella* Tífico H (antígeno somático), *Salmonella* Tífico O (antígeno flagelar) e *Salmonella* Paratífico B, em soro humano. Os antígenos específicos presentes no reagente irão reagir com os anticorpos presentes no soro e é observável uma reação de aglutinação.

A técnica inicia-se com o depósito de 40 µL e de 20 µL de soro humano na lâmina com o auxílio de uma pipeta automática. De seguida adiciona-se uma gota de reagente a todas as amostras, homogeneizar e com um palito e agitar num agitador durante 2 a 3 minutos. Procede-se à observação de aglutinação, se esta ocorrer, o resultado é positivo, se não ocorrer aglutinação, o resultado é negativo. O resultado positivo é expresso pelo título correspondente ao volume da amostra da última diluição que apresentar aglutinação.

3.7.2) Identificação Serológica de *Brucella*

A brucelose humana é uma antropozoonose provocada pelo contacto direto com *Brucella* através animais infetados, inalação de fezes animais ou contaminação através de produtos animais. A doença pode apresentar-se sob duas formas: aguda, com síndrome febril; ou crónica, caracterizada por síndrome da “fadiga crónica”.

O Brucelloslide-Test é um teste quantitativo de ajuda ao diagnóstico da brucelose aguda por aglutinação do Antígeno Rosa de Bengala no soro humano, quando estão presentes anticorpos específicos da Brucelose (*Brucella melitensis*, *abortus*, *bovis e suis*).

O procedimento tem como base a adição de 30 µL de antígeno e 30 µL de soro a testar, misturar com um palito e agitar a carta durante precisamente 4 minutos. Proceder de igual forma com o controlo positivo. A reação positiva é caracterizada pela aglutinação e a reação negativa pela ausência de aglutinação.

3.7.3) Diagnóstico Serológica da Sífilis

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pela bactéria *Treponema pallidum*. Os sinais e sintomas dependem da evolução da infecção, que é caracterizada por três fases ativas. Todas as mulheres grávidas dever fazer análises de rastreio da sífilis no início e final da gravidez para evitar a transmissão da doença ao bebé¹⁵.

O teste efetuado é o Macro-Vue RPR Teardrop Card Test, em que a suspensão de antígeno é colocada no cartão RPR que tem partícula de carbono, são detetadas

“reaginas”, substâncias semelhantes a anticorpo presente no soro de indivíduos sífilíticos, e ocorre floculação macroscópica.

O procedimento é efetuado com dispositivos dispenstirs, em que uma gota de amostra na superfície do cartão. Com a parte oposta do dispenstirs, espalha-se a gota da amostra pelo círculo delimitador presente no cartão e seguidamente adiciona-se uma gota do reagente. Agita-se o cartão durante 8 minutos e pode observar-se o resultado. Este é dado como reativo se apresentar aglutinação marcada a intensa, ou não reativo se não apresentar qualquer aglutinação.

Após um resultado reativo, podem proceder-se aos testes quantitativos com base em sucessivas diluições. Para cada amostra, coloca-se 50 µL de NaCl e 50 µL de amostra, com uma pipeta. Para a diluição seguinte, aspira-se 50 µL da mistura anterior e junta-se 50 µL de NaCl para criar as diluições. Coloca-se uma gota de reagente e agita-se durante 8 minutos. O resultado é interpretado através da observação da floculação e registada a última diluição em que se observa reatividade.

3.8) Testes de Identificação Automática e Antibiograma³⁶

A identificação dos microrganismos infecciosos e o teste de sensibilidade aos antibióticos são dados fundamentais para um diagnóstico correto, uma resposta clínica eficaz e melhores resultados de assistência aos utentes. O equipamento usado é o ID/AST VITEK[®] 2, que oferece resultados rápidos e fiáveis, permitindo um melhor fluxo de trabalho no laboratório.

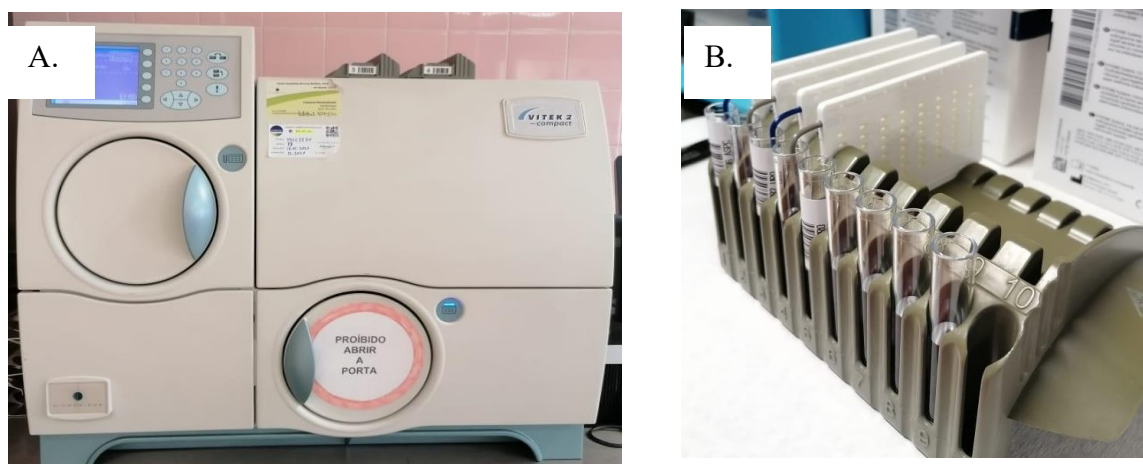


Figura 41: A) Equipamento ID/AST VITEK[®] 2) B) Tubos com suspensão e com as cartas de identificação e antibiograma adequadas.

A preparação das cartas envolve um padrão de McFarland adequado, verificado no densitômetro *Vitek*®, e que varia consoante o agente em estudo, presente nos meios de cultura. No laboratório são efetuados os testes de identificação e de suscetibilidade de bactérias Gram negativo (GP, AST-N192 e AST-N222), Gram positivo (GP, AST-P619 E AST-P586), Leveduras (YST), microrganismos fastidiosos (NH) e também de microrganismos anaeróbios (ANC). Diariamente, é efectuado um controlo de qualidade que consiste num controlo de esterilidade da solução salina *Vitek*®, numa placa de Gelose de Sangue, que incuba a 35°C durante 24 horas. A ausência de crescimento bacteriano no controlo indica que o procedimento ocorreu em condições estéreis e sem contaminações, permitindo a determinação exata de cada microrganismo.

A solução preparada com o microrganismo é aspirada para as cartas, de modo a preencher cada poço. As cartas de identificação têm poços com substratos ou enzimas com o objetivo de traçar o perfil bioquímico do microrganismo e as cartas de suscetibilidade microbiana contém vários antibióticos em determinadas concentrações com a finalidade de traçar a suscetibilidade ou resistência. O Leitor/Incubador guarda as cartas de teste e a leitura é executada através de sensores fotométricos, que deteta alterações de cor ou turvação nas cartas e indica esses dados ao computador. O computador transmite automaticamente os resultados finais dos testes de cada carta.

3.9) Testes de Biologia Molecular

Estes testes têm como princípio base a Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). É um método sensível em que é possível a deteção e quantificação de RNA ou DNA presente na amostra. Esta reação ocorre em duas fases, na primeira o RNA mensageiro é convertido em DNA complementar através da enzima transcriptase reversa⁴⁴. Na segunda etapa, o DNA complementar é amplificado e quantificado em DNA dupla hélice através da enzima DNA polimerase termoestável⁴⁴. O sistema de instrumentos GeneXpert automatiza e integra a preparação de amostras, a extração e amplificação de ácidos nucleicos e a deteção da sequência-alvo em amostras, utilizando ensaios de PCR em tempo real.



Figura 42: A) Equipamento GeneXpert® IV; B) Cartucho Xpert® MRSA.

3.9.1) Xpert® Carba-R⁴⁵

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos do grupo dos carbapenemos como, por exemplo, Enterobacteriaceae, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* tem sido um problema a nível de saúde pública. Esta resistência leva a uma limitação a nível de tratamento, e por isso é crucial a deteção de enzimas hidrolisantes dos carbapenemos. Alguns dos genes de resistência, como os determinantes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, estão associados a linhagens clonais de bactérias que têm uma vantagem seletiva em unidades hospitalares onde a utilização antimicrobiana é elevada.

O Xpert® Carba-R Assay da Cepheid executado nos sistemas do instrumento GeneXpert® consiste num teste diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a deteção e diferenciação rápida das sequências dos genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48* e *blaIMP-1* associados à não susceptibilidade a carbapenemos em bactérias Gram negativo obtidas a partir de amostras de zaragoas rectais em doentes em risco de colonização intestinal com bactérias não susceptíveis a carbapenemos.

3.9.2) Xpert® CT/NG⁴⁶

As *Chlamydia trachomatis* (CT) são bactérias Gram negativo sem motilidade que existem como parasitas intracelulares obrigatórios de células eucarióticas, devido à sua incapacidade de sintetizar ATP. A espécie CT é constituída por pelo menos quinze serotipos que podem provocar doenças em humanos. Sem tratamento, a CT pode

provocar uretrite não gonocócica, epididimite, proctite, cervicite e salpingite aguda. Nas mulheres, a CT sem tratamento poderá provocar doença inflamatória pélvica (DIP). A DIP pode manifestar-se como endometrite, salpingite, peritonite pélvica e abscessos tubo-ováricos.

Os *Neisseria gonorrhoeae* (NG) são diplococos Gram negativo sem motilidade e são agentes causadores de doença gonorreica. A gonorreia é a segunda doença sexualmente transmitida (DST) mais frequente. A maioria das infecções uretrais provocadas por NG nos homens originam sintomas que os levam a procurar tratamento, mas, nas mulheres, as infecções não originam sintomas reconhecíveis até ao surgimento de complicações.

O ensaio Xpert CT/NG é um teste de diagnóstico *in vitro* automático para a deteção e diferenciação qualitativas de ADN de CT e NG de amostras de indivíduos assintomáticos e sintomáticos: urina de mulheres e homens, zaragatoa endocervical e zaragatoa vaginal.

3.9.3) Xpert® Flu⁴⁷

A gripe é uma infecção viral contagiosa do trato respiratório. A transmissão da gripe processa-se principalmente através do ar (isto é, através da tosse e de espirros) e tem o seu pico de incidência de transmissão no inverno.

Os vírus da gripe são classificados nos tipos A, B e C, sendo que os dois primeiros causam a maioria das infecções em seres humanos. O vírus da gripe A é o tipo mais comum de vírus da gripe em seres humanos, é geralmente responsável por epidemias de gripe sazonais e tem o potencial de causar pandemias. Dividem-se ainda em subtipos com base em duas proteínas de superfície: a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N) e a gripe sazonal é normalmente provocada por vírus que contêm os subtipos de hemaglutinina H1, H2 ou H3 combinados com os subtipos de neuraminidase N1 ou N2.

As infecções pelo vírus da gripe B limitam-se geralmente aos seres humanos e é mais raro causarem epidemias.

O Ensaio Xpert® Flu é um teste de diagnóstico automatizado *in vitro* para a deteção qualitativa dos vírus da gripe A, gripe B e do subtipo H1N1 2009 da gripe A. O ensaio é realizado nos sistemas do instrumento GeneXpert da Cepheid e as amostras usadas são de lavagens ou aspirados nasais e zaragatoas nasofaríngeas colhidas de pacientes com sinais e sintomas de infecção respiratória em conjunto com fatores de risco clínicos e epidemiológicos.

3.9.4) Xpert® MTB/RIF⁴⁸

Globalmente, há cerca de 2 mil milhões de pessoas infetadas com *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), o agente que causa tuberculose. A MTB ativa caracteriza-se por ser altamente contagiosa e transmitida por via aérea, o que leva a que o seu diagnóstico tenha que ser rápido.

O tratamento envolve a administração prolongada de múltiplos fármacos; contudo, as estirpes de MTB podem adquirir resistência aos mesmos tornando a cura muito mais difícil de alcançar. Os quatro fármacos de primeira linha habitualmente usados na terapia anti tuberculose são: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB) e Pirazinamida (PZA). A resistência à RIF raramente ocorre isoladamente e normalmente indica resistência a alguns dos outros fármacos anti tuberculose.

O Xpert® MTB/RIF Assay, destinado a ser utilizado com o sistema GeneXpertR da Cepheid, é um teste de diagnóstico *in vitro*, semi quantitativo de “nested” PCR em tempo real, uma técnica de PCR em que são utilizados dois pares de primers, garantindo a amplificação específica com elevada sensibilidade e especificidade. Foi concebido para a deteção do ADN do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e também deteção de mutações do gene *rpoB*, associadas a resistência a rifampicina, em amostras de expectoração ou em sedimentos concentrados preparados a partir de expectorações induzidas.

3.9.5) Xpert® MRSA⁴⁹

Staphylococcus aureus (SA) é um patógeno oportunista humano que provoca bacteriémia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, síndrome de choque tóxico, entre outros. Em 1959, foi introduzida a meticilina, uma penicilina sintética, dado que a aquisição e disseminação de plasmídeos produtores de beta-lactamase diminuíram a eficácia da penicilina. Contudo, em 1960, foram identificadas estirpes de *S. aureus* resistentes a meticilina. Determinou-se que esta situação resultava da aquisição do gene *mecA*.

O ensaio da Cepheid efectuado no sistema GeneXpertR Dx é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a deteção rápida e simultânea de *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) a partir de zaragatoas nasais, em doentes em risco de colonização nasal, incluindo doentes pré cirúrgicos.

4. Hematologia

4.1) Contextualização teórica

A hematologia é a especialidade que estuda o sangue e os seus componentes, sendo este estudo fundamental para o diagnóstico de possíveis patologias associadas, tal como para o tratamento das mesmas⁵⁰.

A formação das células sanguíneas é um processo denominado de hematopoiese e inicia-se com células-tronco presentes na medula óssea que dão origem às distintas linhagens celulares, como podemos observar na figura 43⁵⁰.

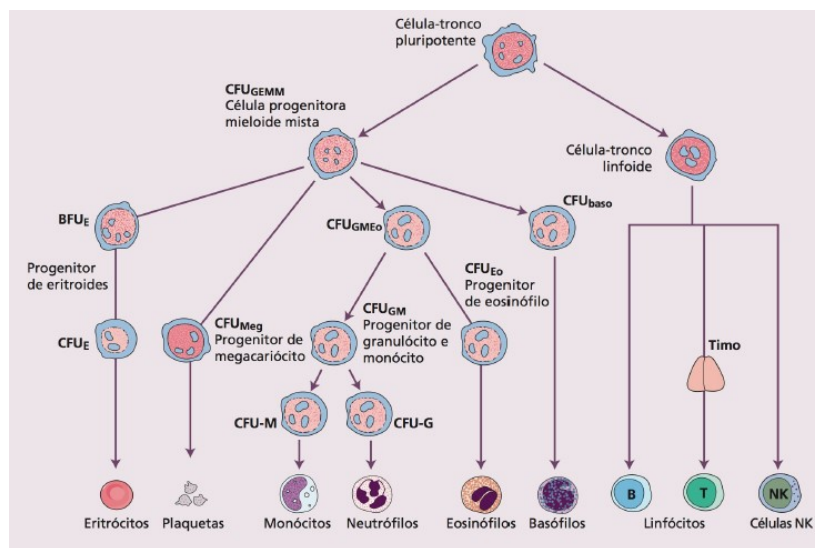


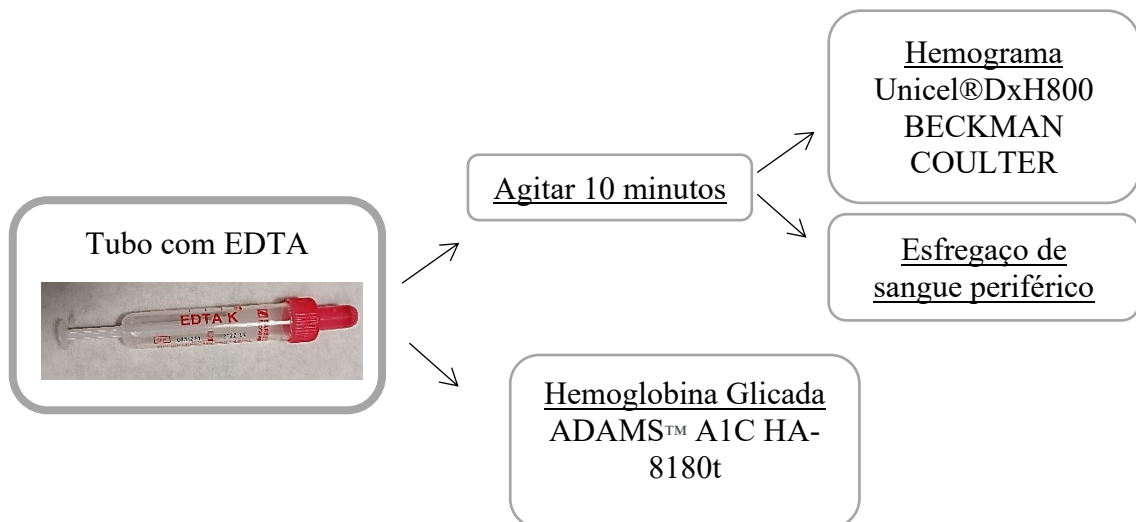
Figura 43: Formação das células sanguíneas e os seus precursores. Retirado de *Essential Haematology*.

Podemos distinguir três principais grupos de células sanguíneas⁵⁰:

- eritrócitos, células sanguíneas maioritariamente compostas por hemoglobina, uma proteína conjugada que permite o transporte de oxigénio e dióxido de carbono. A sua estrutura é um disco bicôncavo flexível, este formato aumenta a superfície de contacto da célula, facilitando as trocas gasosas. O seu tempo de semi vida em circulação são 120 dias;
- leucócitos, que podem ser divididos em fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) e linfócitos. Estas células têm como principal função a proteção do organismo contra infeções;
- plaquetas, células que participam no processo de hemóstase sanguínea cuja principal função é a formação do tampão mecânico como resposta à lesão vascular.

Estas células e os seus parâmetros associados encontram-se em condições e concentrações ótimas para um normal funcionamento do organismo¹. Para além da avaliação dos mesmos, também é essencial a avaliação da hemóstase, um método eficiente e rápido para estancar a hemorragia em locais de lesão vascular. A resposta hemostática normal ao dano vascular depende da interação íntima entre a parede vascular, as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação, e divide-se em hemostase primária, secundária e fibrinólise⁵⁰.

Os tubos de colheita usados para contagem de células sanguíneas são os de tampa rosa, que contém EDTA K₃, anticoagulante agente quelante de cálcio que atua bloqueando a formação de protrombina, e que também permite a preservação da morfologia celular, facilitando a contagem e a identificação das células sanguíneas. O tubo de tampa verde contém citrato de sódio na proporção de 1:9 (amostra:anticoagulante), que é também quelante do cálcio e é o anticoagulante utilizado para estudos da coagulação. Os tubos de tampa roxa, que contém citrato de sódio da proporção de 1:4, são utilizados para estudar a velocidade de sedimentação. As amostras principais são o sangue total e o plasma, contudo o laboratório recebe ainda medula óssea e líquidos ascíticos, que se processam consoante o pedido.



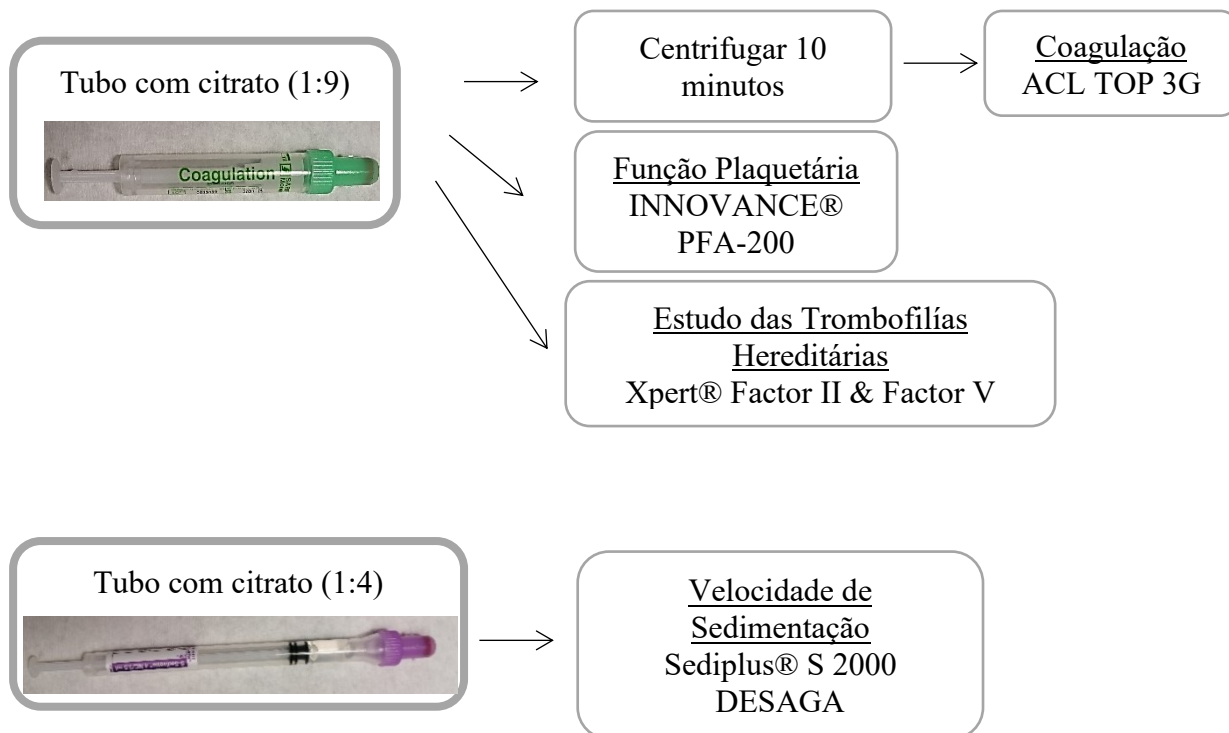


Figura 44: Diagrama que representa o fluxo de trabalho da seção de Hematologia do LPC.

4.2) Hematimetria⁵¹

A hematimetria é obtida com o equipamento Unicel®DxH 800 Beckman Coulter; este permite a contagem total de células na amostra de sangue total, a contagem diferencial e também a contagem dos reticulócitos, células em estágio de maturação que antecedem os eritrócitos. A técnica utilizada no equipamento é a citometria de fluxo em que o equipamento mede dispersão de luz, emitida por um laser de HeNe, através de dois detetores óticos. Estes detetores permitem a leitura de cinco ângulos distintos. Desta forma, são fornecidos sete parâmetros de medição células que valorizam a análise como volume celular, relação núcleo/citoplasma, composição química, complexidade e granularidade.

Na contagem total do sangue obtemos os seguintes parâmetros:

- WBC: Contagem leucocitária;
- UWBC: Contagem leucocitária não corrigida;
- RBC: Contagem eritrocitária;
- HCT: Hematócrito (percentagem volume ocupado pelos eritrócitos no volume total do sangue);
- VCM: Volume Corpuscular Médio (volume médio dos eritrócitos);

- HCM: Hemoglobina Corpuscular Média (quantidade de hemoglobina nos eritrócitos);
- CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (concentração de hemoglobina nos eritrócitos);
- RDW: Distribuição dos eritrócitos (morfologia dos eritrócitos);
- PLT: Contagem plaquetária;
- MPV: Volume Plaquetário Médio.

Na contagem de células diferenciais obtemos os seguintes parâmetros, em contagem total e em percentagem:

- Neutrófilos;
- Linfócitos;
- Monócitos;
- Eosinófilos;
- Basófilos.

Na contagem reticulocitária obtemos os seguintes parâmetros:

- Reticulócitos (contagem total e em percentagem);
- MRV: Volume Reticulocitário Médio;
- IRF: Fração Imatura Reticulocitária.

Com estes índices hematimétricos é possível obter o eritrograma, leucograma e plaquetograma, estes são essenciais para o diagnóstico de doenças hematológicas. A contagem eritrocitária é essencial na deteção de anemias e para a divisão das mesmas em microcíticas, macrocíticas e normocíticas, ao analisar o HCM e o VCM¹. Os parâmetros da contagem dos reticulócitos permitem avaliar a eritropoiese e a resposta da medula óssea, e os parâmetros da contagem diferencial podem indicar inflamações, infeções e distúrbios da medula óssea⁵⁰.



Figura 45: Equipamento Unicel DxH 800 Beckman Coulter.

O Unicel DxH®800 Beckman Coulter também tem a possibilidade de analisar amostras manualmente, fechadas ou abertas. Desta maneira, conseguem-se obter os parâmetros hematimétricos de amostras diluídas, amostras com quantidade reduzida ou fluidos biológicos.

Após a obtenção dos parâmetros, podem ser solicitados pedidos de aquecimento da amostra quando o volume eritrocitário se encontra elevado (o volume pode aumentar bastante, sinal de aglutinação das células provavelmente por anticorpos frios, e o aquecimento promove a desagregação e permite a contagem dos eritrócitos); pode ser solicitado esfregaço sanguíneo para uma observação detalhada da morfologia celular; e por fim, pode ser requerido despiste de coágulo quando a contagem plaquetária se encontrar bastante diminuída (a existência de coágulo induz a contagem incorreta das células).

4.3) Colorações Citológicas

As colorações citológicas são essenciais para a avaliação hematológica, para se proceder à contagem e observação da morfologia celular. Para melhor avaliação das amostras sanguíneas são efetuados esfregaços (Figura 4)³. Esta técnica permite que a amostra se espalhe na lâmina de forma gradual (mais concentrado para o menos concentrado) e também que se apresente como um filme fino, o que permite a diferenciação das células. Os esfregaços e posterior coloração são requisitados quando o hemograma apresenta valores anormais, de forma a analisar a amostra com maior detalhe e orientar o diagnóstico²⁰.

No laboratório de Hematologia é efetuada a coloração de May-Grunwald-Giemsa em amostras de medula óssea, líquidos biológicos e em amostras de sangue total. A coloração das medulas ósseas é efetuada manualmente³⁶:

- Atuação do corante de May-Grunwald durante 3 minutos (este corante é uma solução de eosina e azul de metileno em metanol, que ajuda na fixação);
- De seguida lavam-se as lâminas com água tamponada, e deixa-se secar bem;
- Após a secagem, adiciona-se a solução de Giemsa diluída (1/10: 9 partes de água destilada com 1 parte do corante Giemsa, uma mistura de eosina com derivados do azul de metileno) e deixa-se atuar durante 20 minutos;
- Lavam-se as lâminas com água destilada e deixa-se secar bem.

A coloração das amostras de sangue e dos líquidos biológicos é feita no equipamento Aerospray® Pro Series 2 (Figura 4), um equipamento que permite a coloração automatizada e rápida, facilitando o fluxo de trabalho no laboratório³⁵. Este equipamento apresenta também capacidade de cito centrifugação, para amostras menos concentradas³⁵.

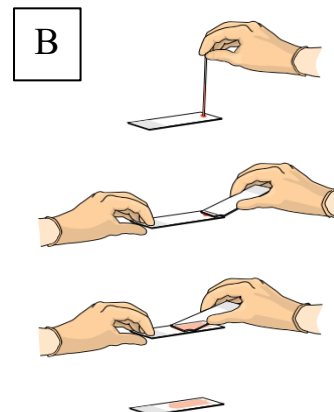


Figura 46: A) Equipamento Aerospray® Pro Series 2; B) Técnica de obtenção de um esfregaço sanguíneo, retirado de *Blood Cells: A Practical Guide*, 2006.

A ação combinada dos corantes May-Grunwald e Giemsa permite a coloração correta de todas as estruturas celulares: os núcleos adquirem uma tonalidade avermelhada, os citoplasmas basofílicos adquirem cor azul e os acidófilos adotam uma cor rosada. A granulação específica neutrófila fica castanha, a eosinófila adquire cor laranja, a basófila violeta escura, e a azurófila rosa-púrpura⁵².

Na secção de hematologia também é efetuada a coloração de Perls em amostras de medula óssea³⁶:

- Fixação das lâminas com metanol durante 3 minutos;
- Preparação de uma solução com o reagente 1 (hexacianoferrato(II) de potássio) com o reagente 2 (ácido hidrocloreídrico) na proporção de 1:1;
- Incuba-se durante 20 minutos;
- Lavar as lâminas com água tamponada e deixar secar bem;
- Adicionar o reagente 3 (*Nuclear Fast Red Solution*) durante 3 minutos;
- Lavar com água tamponada e deixar secar bem.

A reação do ferro livre (Fe^{3+}), que não se encontra ligado à hemoglobina, com a solução de hexacianoferrato(II) de potássio em ácido hidrocloreídrico vai produzir um precipitado, um complexo insolúvel de cor azul, que permite localizar o ferro nas células³⁶. A solução *Nuclear Fast Red Solution* vai permitir corar os citoplasmas de cor rosada³⁶.

A água tamponada é uma solução preparada com uma pastilha de fosfato de potássio diluída num litro de água e adquire o pH de 6,8, apropriado para os passos de lavagem em ambas as colorações executadas.

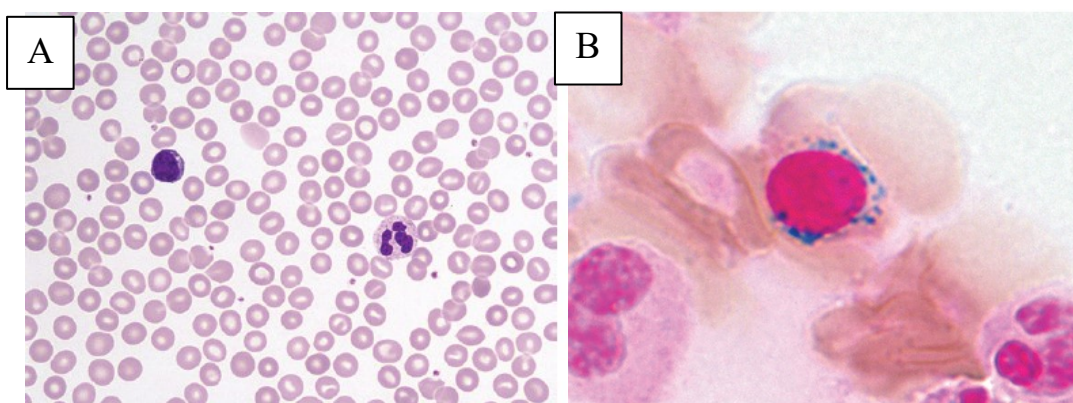


Figura 47: A) Amostra corada pela técnica May-Grunwald-Giemsa, podemos observar eritrócitos, um linfócito do lado esquerdo e um neutrófilo do lado direito; B) Amostra corada através da técnica de Perls, podemos observar sideroblasto em anel, com o precipitado de ferro livre a azul. Ambas imagens retiradas de Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods, 2011.

4.4) Hemoglobina Glicada

A hemoglobina é uma proteína conjugada que serve de veículo para o transporte de oxigénio e dióxido de carbono e trata-se do componente maioritário do eritrócito. Uma molécula de hemoglobina contém dois pares de cadeias polipeptídicas e quatro grupos heme, cada um com um átomo de ferro⁵⁰. O sangue do adulto normal contém três tipos de hemoglobina: Hemoglobina A, com estrutura molecular $\alpha_2\beta_2$ e corresponde à hemoglobina predominante (97%); hemoglobina A2, com estrutura $\alpha_2\delta_2$ e encontra-se em pequenas quantidades (1,5-3,5%); e a hemoglobina Fetal $\alpha_2\gamma_2$, o tipo que se encontra em menor quantidade (inferior a 2%)⁵⁰.

No sangue pode também ser detetada a hemoglobina A1c, um tipo de hemoglobina que apresenta ligação estável da glucose com a valina da cadeia β da hemoglobina A⁵³. O processo de formação da hemoglobina A1c é um passo irreversível de rearranjo estrutural e ocorre continuamente durante o tempo de vida eritrocitária (120 dias)⁵³. Desta maneira, constitui uma ferramenta de avaliação e monitorização dos valores de concentração média de glucose no plasma do paciente durante as últimas 8 a 12 semanas antes da colheita⁵³.

O equipamento ADAMS™ A1c HA-8180T (Figura 48) é um equipamento automatizado que tem como técnica a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e as amostras são de sangue total com anticoagulante K EDTA⁵⁴. Este equipamento foi desenhado para separar e quantificar a hemoglobina A1c, mas também deteta variantes de hemoglobina como A2 e Fetal⁵⁴. O princípio da medição baseia-se na cromatografia de troca catiónica; a amostra é aspirada pelo equipamento, é hemolisada e injetada na coluna⁸. As moléculas de hemoglobina eluem com os tampões inorgânicos por ordem crescente de polaridade, e após a eluição passam num detetor espectrofotométrico⁵⁴. Este detetor identifica as moléculas de hemoglobina pelos tempos de retenção característicos, obtendo o cromatograma como o apresentado na figura X, com a concentração, percentagem de hemoglobina e os respetivos picos de eluição detetados⁵⁴.

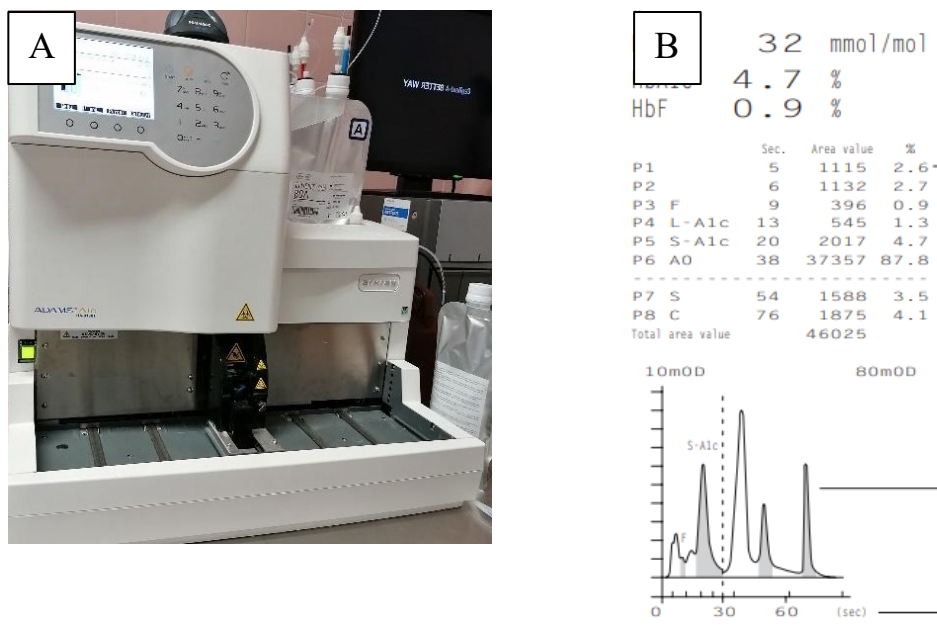


Figura 48: A) Equipamento ADAMS™ A1c HA-8180T; B) Cromatograma obtido.

4.5) Hemostase Primária⁵⁵

A hemostase primária consiste na resposta à lesão de um vaso sanguíneo, em que inicialmente ocorre vasoconstrição seguida de adesão e agregação plaquetária. O equipamento INNOVANCE PFA-200 simula o mecanismo de hemostasia primária e avalia a função das plaquetas para formar o trombo. As disfunções plaquetárias podem ser adquiridas como a urémia, herdadas como a doença de von Willebrand ou induzidas por agentes inibidores, como o ácido acetilsalicílico.

No equipamento são introduzidos dois cartuchos, cada um com epinefrina e ADP combinados com colagénio, os quais são essenciais no processo. Os vasos sanguíneos danificados expõem fios de colagénio, os quais servem de mediadores para a ligação do fator von Willebrand e permite a adesão plaquetária. Nas lesões são também libertadas grandes quantidades de ADP e epinefrina para o sangue, que contribuem para a ativação das plaquetas e a libertação dos grânulos plaquetários.

Os cartuchos de teste incluem um capilar, um reservatório e uma membrana com um orifício, desta maneira consegue mimetizar-se a lesão vascular e determinar quanto tempo decorre até as plaquetas presentes na amostra de sangue total conseguirem proceder à adesão, ativação e agregação. O resultado é então obtido em tempo, denominado tempo de oclusão, e constitui o indicador da função plaquetária.

4.6) Hemostase Secundária

A hemostase secundária abrange a coagulação do sangue; é um sistema biológico de amplificação, que por meio de ativação de fatores enzimáticos presentes no plasma,

culmina na formação de trombina. Esta converte o fibrinogénio solúvel em fibrina, a fibrina infiltra os agregados plaquetários nos locais de lesão vascular e converte os tampões instáveis formados primeiramente em tampões hemostáticos firmes e estáveis⁵⁰.

A cascata da coagulação está dividida em via extrínseca, via intrínseca e via comum (figura 4). A avaliação da coagulação pode ser executada através de testes como o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina ativada (APTT), tempo de trombina (TT) e determinação dos fatores envolvidos⁵⁶.

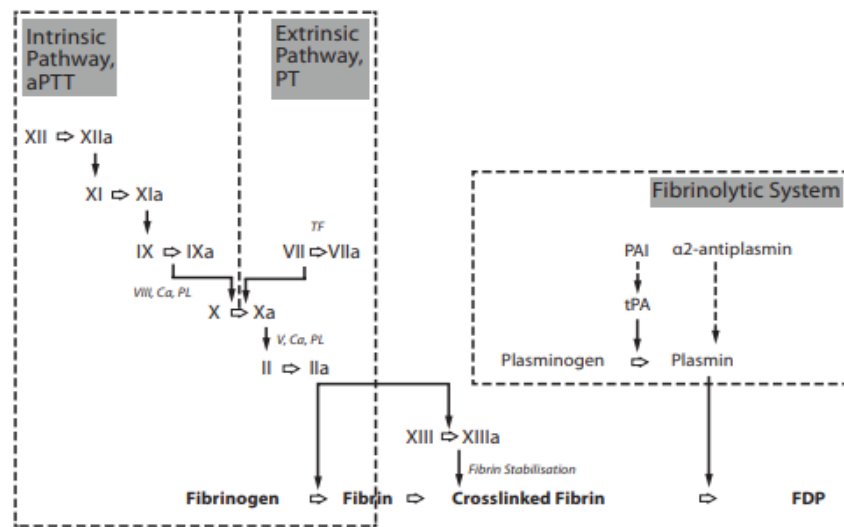


Figura 49: Componentes das vias extrínseca, intrínseca, comum e também do sistema fibrinolítico, retirado de Tha, M. H., & Joo, H., 2014.

Após a formação do tampão ocorre a fibrinólise, que é o mecanismo de resposta hemostática normal à lesão. A degradação da fibrina ocorre pela ação da plasmina, que é ativada pelo plasminogénio⁵⁶. Os produtos da fibrinólise são os produtos da degradação da fibrina e os D-Dímeros⁵⁶. O equipamento da secção de Hematologia que realiza os testes referentes à hemostase secundária é o ACL TOP 3G. Neste é possível fazer o doseamento dos fatores de coagulação, do APTT, do TP, do TT, do fator von Willebrnad (FVW), de inibidores da coagulação como anti-trombina (AT), proteína C (PC) e proteína S livre (PS) e anticoagulante lúpico (AL), e de produtos da fibrinólise como D-Dímeros. Para a análise, o equipamento utiliza ensaios turbidiméticos, cromogénicos ou imunológicos. Na tabela 3, estão descritos estes ensaios e os parâmetros associados.

Tabela 3: Tipos de ensaios, respetiva descrição e parâmetros analisados no equipamento ACL TOP 500.

Ensaio	Descrição	Parâmetros
Turbidimétrico	Medição da densidade ótica da amostra, esta torna-se turva quando se forma o coágulo	TP, APTT, TT e fatores II, V, VII, VIII, X, XI, XII,
Colorimétrico	Medição da absorvância na presença de um substrato cromogénico que deteta a atividade enzimática	PC, fator VIII, AT
Imunológico	Medição da quantidade de analito através da ligação antigénio-anticorpo que altera a turbidez da amostra	PS, FVW, XIII, D-Dímeros

No laboratório diariamente fazem-se quatro testes:

- Tempo de Protrombina⁵⁰: avalia a via extrínseca da coagulação. É o teste efetuado para controlo de terapia anticoagulante oral e os valores de normalidade variam entre os 10 e os 15 segundos. Valores aumentados deste parâmetro podem ser sugestivos de deficiência dos fatores VII, X, V e II, insuficiência hepática, hipovitaminose K (devido aos fatores desta via serem dependentes da vitamina K), anticoagulantes orais ou presença de inibidores, como a heparina.
- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada⁵⁰: avalia a via intrínseca da coagulação. Os valores normais compreendem o intervalo de 24 a 35 segundos; valores aumentados deste parâmetro sugerem deficiência de fatores como XII, XI, X, IX, V, II e fibrinogénio, doença hepática, presença de inibidores e também a hipovitaminose K.
- D-Dímeros⁵⁰: avalia os produtos da fibrinólise. Valores alterados deste parâmetro podem indicar situações de coagulação intravascular disseminada (CID) ou fibrinólise primária.
- Fibrinogénio C⁵⁰: avalia a conversão de fibrinogénio em fibrina. Encontra-se aumentado em processos inflamatórios e gravidez e encontra-se diminuído em situações de hipofibrinogénias, afibrinogénias, CID e insuficiência hepática grave.

Fazem-se outros testes como doseamento dos fatores envolventes da coagulação ou mesmo o doseamento dos inibidores da coagulação assim que a quantidade de amostras com estes pedidos é significativa:

- Proteína C⁵⁰: proteína dependente de vitamina K e inibidor fisiológico da coagulação que atua a nível dos fatores V e VIII ativados, destruindo-os e evitando a formação de mais trombina. Uma diminuição de proteína C pode indicar uma predisposição a trombose como a CID¹.
- Proteína S⁵⁰: também uma proteína dependente de vitamina K e cofator da proteína C mencionada acima, também corresponde a uma proteína inibidora da coagulação em conjunto com a proteína C¹.
- Antitrombina⁵⁰: proteína plasmática que inibe a trombina (fator IIa) e também outros fatores como Xa, IXa, XIa, inibindo a formação do coágulo¹.
- Anticoagulante Lúpico⁵⁰: classe de anticorpos que atua sobre os fosfolípidos carregados negativamente ou sobre os complexos fosfolípidos-proteínas, como é o caso das plaquetas, da protrombina e de fatores de coagulação¹. Ao atuar sobre estes, vai prolongar os valores de APTT. Para a deteção laboratorial deste anticoagulante são efetuados dois testes para despiste de falsos negativos, o teste de sílica e o teste com veneno da víbora de Russel diluído (dRVVT), e em ambos os testes são testados duas metodologias diferentes, *screening* e confirmatório. O *screening* apresenta baixa concentração de fosfolípidos, desta maneira existe reação do AL contra os fosfolípidos, apresentando um APTT prolongado; o teste confirmatório apresenta elevada concentração de fosfolípidos de forma a saturar o AL presente no plasma, corrigindo o APTT. O resultado é dado em rácios, rácio do screen em relação ao confirmatório de ambos os testes (sílica e dRVVT). O resultado é considerado positivo se um ou os dois testes excederem 1,2 no teste dRVVT e 1,16 no teste sílica.

No laboratório faz-se também a deteção do fator de von Willenbrand, um fator com extrema importância nos mecanismos de coagulação dado que permite a adesão plaquetária ao vaso, o transporte do fator VIII, impedindo-o de atuar prematuramente e ativar o fator X, e a agregação plaquetária⁵⁰. A sua deteção é importante no diagnóstico da doença de von Willenbrand, que pode ser classificada em tipo 1, em que o fator está diminuído; tipo 2, em que o fator não se apresenta funcional; e tipo 3, em que o fator é inexistente no plasma. A deteção laboratorial consiste na avaliação do rácio entre o teste do antígeno do FvW e o teste do seu cofator, a ristocestina.

4.7) Testes de Biologia Molecular

4.7.1) Teste Xpert® HemosIL® FII & FV⁵⁷

É um teste in vitro de genotipagem qualitativa com o objetivo de detecção rápida das mutações pontuais únicas do fator II e do fator V Leiden em sangue total com anticoagulante citrato de sódio. As mutações dos fatores mencionados estão associadas com aumento do risco de trombose venosa. O fator II, ou protrombina, é o precursor da trombina e a mutação detetada por este teste corresponde a uma transição de arginina em glutamina no nucleótido da posição 20210. Ocorre o aumento dos níveis no plasma e excesso de ativação da cascata da coagulação, aumentando assim o risco de tromboembolismo.

O fator V Leiden é uma mutação do fator V e corresponde a uma transição de uma arginina por glutamina no nucleótido da posição 1691 do gene. Esta mutação permite que o fator fique resistente à ação da proteína C, um inibidor natural da cascata da coagulação.

O Gene-Xpert® permite a purificação de ácidos nucleicos e detecção da sequência alvo com ensaios PCR e RT-PCR, ensaios explicados no ponto 3.9). Estes ensaios permitem a detecção dos alelos do fator II e do fator V Leiden.

4.7.2) Teste Xpert® BCR-ABL Ultra⁵⁸

É um teste de diagnóstico para detecção quantitativa de transcritos de mRNA de translocação nos cromossomas BCR-ABL em amostras de sangue periférico em doentes diagnosticados com Leucemia Mielóide Crónica (LMC). A LMC é uma das doenças hematológicas mais comuns e mais de 95% dos doentes com a doença apresenta o cromossoma Philadelphia característico. Este cromossoma resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. Esta translocação consiste na fusão do gene ABL1 do cromossoma 9 para a região BCR do cromossoma 22, resultando no gene BCR-ABL1, uma tirosina cinase com atividade desregulada que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da LMC.

O Gene-Xpert® permite a purificação de ácidos nucleicos e detecção da sequência alvo com ensaios PCR e RT-PCR, ensaios explicados no ponto 3.8). Estes ensaios permitem a quantificação do transcrito BCR-ABL com um rácio BCR-ABL/ABL.

4.8) Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação eritrocitária é habitualmente definida como a diferença, medida em milímetros, entre a superfície da coluna líquida total e a superfície de sedimentação dos eritrócitos no sangue, 60 minutos após a agitação do tubo de colheita⁵⁹.

A medição da velocidade de sedimentação é feita do equipamento Sediplus®S 2000 DESAGA, e é realizada por um feixe de luz de infravermelhos que atravessa o tubo e ocorre a deteção com a mudança de intensidade da mesma.



Figura 50: A) Equipamento Sediplus ® S 2000 DESAGA; B) Velocidade de sedimentação após 60 minutos.

Este teste é realizado regularmente, e depende principalmente da concentração plasmática de moléculas proteicas grandes, por exemplo, fibrinogénio e imunoglobulinas⁵⁰. A velocidade de sedimentação aumenta quando o utente apresenta doenças inflamatórias sistémicas, neoplásicas, ou também na gravidez⁵⁰. É um exame inespecífico dado que é insensível a mudanças agudas numa inflamação, contudo é útil no diagnóstico e controlo do tratamento da arterite temporal, polimialgia reumática e linfoma de Hodgkin⁵⁰.

4.9) Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica essencial para o estudo clínico da resposta celular imunológica²⁰. O princípio envolve duas tecnologias: a primeira é descrita como a passagem do fluxo, em que as partículas são contadas e as suas características físicas e químicas são medidas numa suspensão, célula a célula²⁰. Na segunda, descrita como

análise estática, as partículas encontram-se estáticas e o laser incide sobre a amostra²⁰.

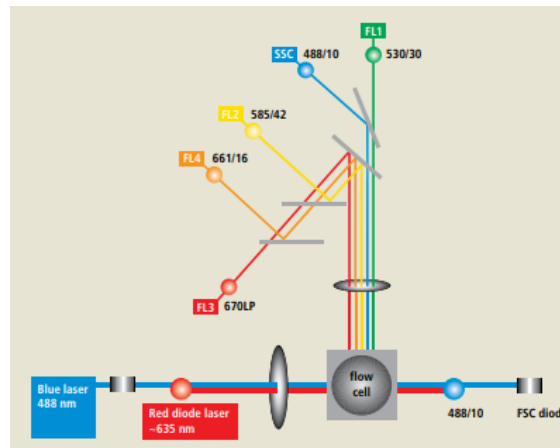


Figura 51: Configuração ótica do equipamento BD FACSCalibur™, permitindo a detecção através dos fluorocromos. Retirado do Manual do Operador do equipamento.

O equipamento usado é citómetro BD FACSCalibur™. A amostra é incubada com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos que se vão ligar a recetores específicos que se encontram na superfície das células presentes na amostra, marcando-as. O feixe de luz, neste caso o laser azul e o laser vermelho, incidem sobre a amostra e excitam os fluorocromos, que emitem um comprimento de onda específico que permite a detecção das células. O citómetros também fornece informações como o volume celular e a complexidade da partícula, assim como a granularidade da mesma²⁰. As células em estudo encontram-se em suspensão, por isso as amostras utilizadas são sangue total com EDTA, aspirados broncoalveolares e também aspirados medulares. Nestas amostras são executados os painéis específicos dos antígenos de membrana dos linfócitos B e T, com o auxílio dos anticorpos monoclonais adequados, podendo ser traçado o fenótipo destas células. Nas amostras de aspirados medulares, o estudo é direcionado para a caracterização de plasmócitos, linfócitos B produtores de anticorpos. Com a obtenção da percentagem dos antígenos é possível estudar distúrbios linfocitários como Leucemia Linfóide Crónica tipo B, gamopatias monoclonais, síndrome mielodisplásico, leucemia aguda, entre outros²⁰.

5. Imunoquímica

5.1) Contextualização teórica

Nesta secção do SPC do CHUCB, os ensaios realizados têm por base as áreas imunologia e Química Clínica. O foco de estudo incide na deteção e quantificação de biomoléculas essenciais para a homeostase, avalia também parâmetros de função biológica de certas proteínas e concentração iónica, essencial ao equilíbrio osmótico celular. Todos estes parâmetros avaliados são determinantes para o estudo de patologias com a finalidade de um diagnóstico eficaz e rápido no auxílio ao utente. As principais amostras processadas na secção são soro e urina e, contudo também são processadas amostras de LCR e outros líquidos biológicos. Os tubos de soro, após serem colhidos, sofrem a retração do coágulo no gel presente no tubo de colheita durante cerca de 30 minutos e de seguida são centrifugados, de maneira a obter o soro.

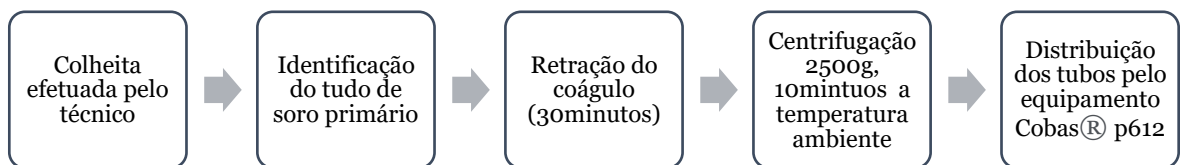


Figura 52: Diagrama que representa o fluxo de trabalho da secção de Imunoquímica.

O equipamento cobas® p612 é um equipamento que auxilia todo o processo pré-analítico, visto que este recebe os tubos que chegam ao laboratório, após centrifugação, efetua a leitura do código de barras para identificar as provas requisitadas e faz a sua distribuição⁶⁰. Os tubos são distribuídos consoante as provas e este equipamento permite também fazer alíquotas de soro e urina, sempre que necessário⁶⁰. Após todas as provas necessárias serem realizadas, o tubo volta ao equipamento e é colocado num arquivo e refrigerado.



Figura 53: Equipamento cobas® p612.

5.2) Equipamento Cobas® série 8000

O cobas® 8000 é um equipamento analisador modular que possui os módulos ISE (sódio, potássio e cloro); módulo c502 (módulo bioquímica) e dois módulos c602 (módulo imunologia). Possui uma unidade core que gere o transporte das amostras para cada módulo analítico, dependendo dos ensaios a realizar⁶¹. O cobas® 8000 garante a análise automatizada de amostras como soro, urina e líquidos biológicos, permitindo um fluxo de trabalho no laboratório rápido e eficiente.

- Módulo ISE: A unidade ISE efetua ensaios potenciométricos, isto é, ensaio no qual os analitos são medidos em milivolts por eletrodos seletivos de íão³. A concentração dos analitos (íões sódio, potássio e cloro) é obtida utilizando uma membrana semipermeável apenas a um íão e um eletrodo⁶². O íão presente na amostra, ao passar pela membrana, vai formar um potencial elétrico (força eletromotriz) e este é detetado pelo eletrodo²⁰. A partir dos valores do potencial elétrico obtido é possível calcular a concentração dos íões a analisar²⁰.
- Módulo c502: Este módulo efetua ensaios fotométricos e imunoturbidimétricos para detetar e quantificar vários analitos⁶². Os ensaios fotométricos medem a energia radiante absorvida pela amostra, sendo a concentração de analito presente na amostra proporcional à quantidade de luz absorvida²⁰. Os ensaios imunoturbidimétricos, frequentemente usados para partículas de grandes dimensões como complexos de anticorpo-antigénio e proteínas séricas, medem uma redução de transmissão de luz incidente devido ao aumento da turbidez da amostra pela formação de partículas²⁰.
- Módulo c602: Este módulo executa ensaios de ECLIA, um método que utiliza compostos eletroquímicos que integram o ciclo de reações de oxidação-redução e geram luz²⁰. A determinação de analitos é conseguida por micropartículas magnéticas revestidas com anticorpos ou antigénio, estes reagem com o analito quando a amostra é adicionada²⁰. Após a lavagem, a suspensão da fase sólida é introduzida ao detetor com um eletrodo que vai medir a quimioluminescência²⁰.

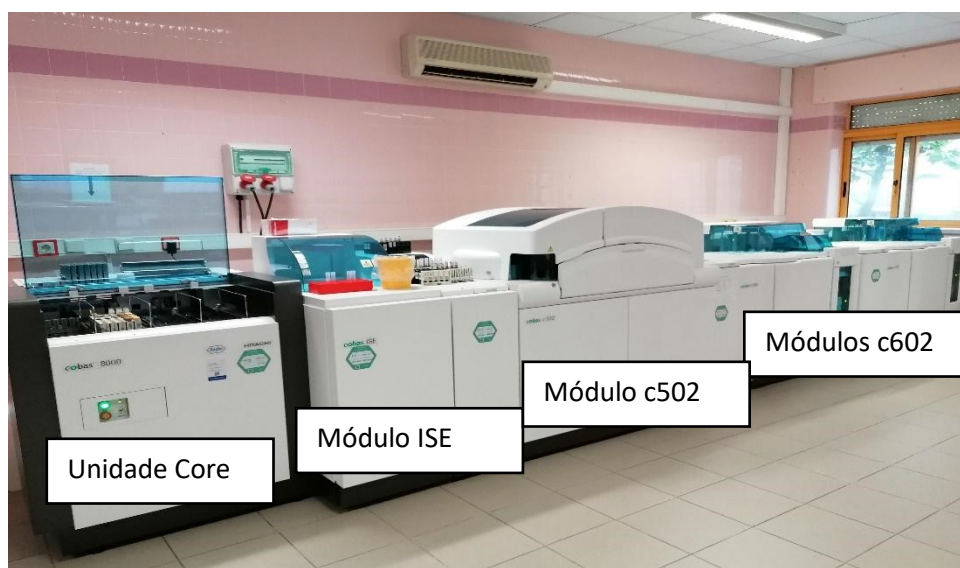


Figura 54: Equipamento cobas® 8000 e os seus módulos.

Tabela 4: Resumo dos analitos detetados e quantificados pelos respetivos módulos do equipamento cobas® 8000.

Módulo	Analito
ISE	Sódio, Potássio, Cloro
C502	<p><u>Ensaio fotométrico</u>: Ácido úrico, Amicacina, ALT, AST, α-Amilase, Bilirrubina direta e total, Cálcio, Creatinina, Colesterol HDL e LDL, Ferro, Fosfatase Alcalina, Fósforo, Glicose, Magnésio, Proteínas totais, Ureia e Triglicéridos.</p> <p><u>Ensaio imunoturbidimétrico</u>: α-1-Antitripsina, C3 e C4, ECA, Fator Reumatoide, Haptoglobina, IgA, IgG, IgM, Lipoproteína A, Proteína C Reativa, Transferrina e Recetor Solúvel da Transferrina.</p>
E602	Ácido fólico, AcHBs, AgHBs, AcHBc, CA 19.9, CA 15.3, CA 125, CEA, Citomegalovírus (IgM e IgG), Ferritina, PSA Total e Livre, <i>Treponema Pallidum</i> , Toxoplasmose (IgM e IgG), TSH, T3 Livre e T4 Livre, Rubéola (IgM e IgG), Vitamina D e Vitamina B12.

5.3) Equipamento Cobas® e 411⁶³

O equipamento cobas® e411 é um equipamento automatizado que usa a tecnologia de eletroquimioluminescência (ECLIA) para imunoensaios. Esta técnica é comum ao módulo c602 do cobas 8000 presente nesta secção do SPC.

Os analitos detetados e doseados são a tiroglobulina, o CA 72.4, o antígeno E da hepatite B (HBeAg) e a hormona anti-Mulleriana.



Figura 55: Equipamento cobas® e411.

5.4) Equipamento ARCHITECT i2000SR

Este equipamento realiza ensaios de quimioluminescência (CLIA), reações que têm por base a ligação antígeno-anticorpo e são utilizadas amostras de soro e urina. São imunoensaios que usam moléculas que geram quimioluminescência, neste caso, a acridina⁶⁴. O reagente contém micropartículas revestidas com anticorpos ou antígenos específicos a reagir, dependendo do analito a detetar²⁰. A amostra é inserida e dá-se a ligação do analito, posteriormente é adicionado anticorpos marcados com acridina, desta maneira, é emitido o sinal, em Unidades Relativas de Luz²⁰. Quanto maior é o sinal emitido pelo substrato quimioluminescente, maior a concentração de analito na amostra.



Figura 56: Equipamento ARCHITECT2000SR.

Os parâmetros doseados neste equipamento são:

- Marcadores cardíacos: Pro-BNP, mioglobina, homocisteína, troponina, CK Massa;
- Hormonas da fertilidade: LH, FSH, progesterona, estradiol, testosterona, estrogénio, SHBG;
- Anticorpos anti tiroideus: anti-TPO, anti-Tg;
- Anticorpos anti virais: IgM e IgG anti-HAV; IgM e IgG anti-EBV

5.5) Equipamento Phadia™ 250⁶⁵

O equipamento Phadia 250 realiza testes ImmunoCAP para direcionar o estudo de alergénios. É efetuado o doseamento de IgE total e IgE específica contra certos alergénios. Estes ensaios mencionados têm como técnica de ELISA indireto, uma técnica que tem como princípio base a reação anticorpo-antigénio. Nesta técnica, a molécula alvo encontra-se imobilizada na fase sólida que posteriormente reage com o anticorpo presente na amostra. Numa segunda fase, é adicionado um anticorpo secundário marcado com uma enzima que ao ser adicionado o seu substrato específico, este gera fluorescência (Figura 57). Desta maneira, quanto maior fluorescência detetada, maior concentração do anticorpo a dosear.

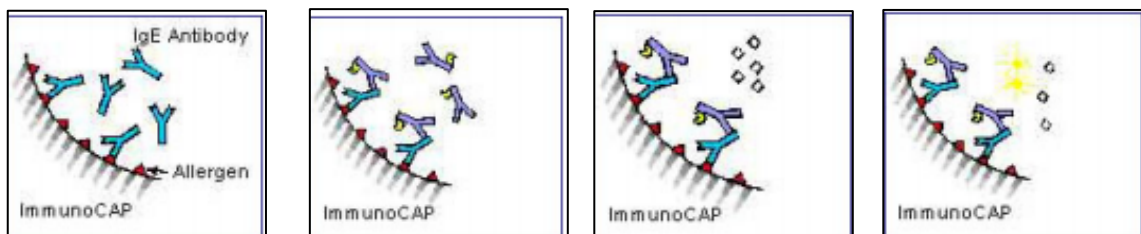


Figura 57: Técnica de ELISA para detetar IgE, adaptada de Manual do Operador do Phadia™250.

Para além dos testes ImmunoCAP para detetar IgE, também se podem executar ensaios para dosear a proteína calprotectina, uma proteína presente nas fezes quando existe doença inflamatória renal. Este ensaio auxilia no diagnóstico e monitorização da patologia, evitando testes invasivos, como a colonoscopia. Este teste é um ensaio “sandwich” em que o anticorpo com afinidade para a calprotectina se encontra imobilizado na fase sólida, a amostra é adicionada e a calprotectina liga-se. É posteriormente adicionado anticorpo com afinidade para o complexo já formado, este anticorpo também se encontra marcado com uma enzima, e o seu substrato ao ser degradado, emite fluorescência. (Figura 57).

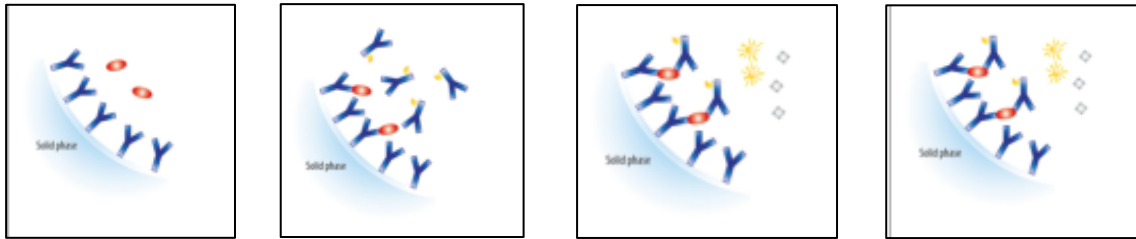


Figura 58: Técnica de ELISA para dosear a calprotectina, adaptada de Manual do Operador do Phadia™250.

5.6) Equipamento Atellica® NEPH 630 System

Este equipamento realiza ensaios que têm como princípio a nefelometria, isto é, a medição de luz incidente nas partículas presentes na solução²⁰. É uma técnica que permite o doseamento de partículas de elevadas dimensões, como por exemplo, complexos anticorpo-antígeno²⁰.

A técnica consiste em partículas de poliestireno revestidas com anticorpos de cadeias leves livres humanas, tipo kappa ou lambda, que reagem quando são com amostras que contenham cadeias leves livres⁶⁶. Estes agregados emitem um raio de luz que passa através da amostra e a intensidade da luz dispersa é proporcional à concentração da respectiva proteína na amostra⁶⁶.

Numa resposta imunológica normal, são criadas imunoglobulinas completas compostas por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (kappa e lambda)⁶⁶. Em indivíduos saudáveis, a produção maioritária é de imunoglobulinas completas com algumas cadeias leves livres em circulação⁶⁶. Quando se está perante uma gamapatia monoclonal, há produção excessiva de apenas uma imunoglobulina e de cadeias leves livres⁸. Neste equipamento é executado o doseamento de cadeias leves livres, do tipo kappa ou lambda, em soro, realizadas para auxiliar o diagnóstico de mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidose, doença de depósitos de cadeias leves e neoplasma linfocítico⁶⁶.

5.7) Eletroforese de Proteínas

A eletroforese é uma técnica que permite a separação de proteínas com base nas suas propriedades pela aplicação de uma diferença de potencial. No laboratório de Imunoquímica, é efetuada a técnica de eletroforese capilar para obtenção do proteinograma e a técnica de eletroforese em gel de agarose para executar imunofixação sérica e urinária.

5.7.1) Proteinograma

O equipamento CAPILLARYS 3 OCTA permite a obtenção do proteinograma em amostras de soro com recurso ao kit CAPI 3 PROTEIN(E) 6⁶⁷. A técnica base é a eletroforese capilar, esta permite a separação das frações das proteínas presentes no soro. Neste tipo de eletroforese, a separação dá-se num tubo capilar, que tem ambas as extremidades em recipientes com um tampão contendo elétrodos⁶⁸. O tampão é alcalino, o que torna as proteínas negativamente carregadas⁶⁸. Quando a voltagem é aplicada, as proteínas movem-se através do fluxo osmótico criado, sendo separadas pelas suas características de mobilidade eletroforética^{67,68}. A sua deteção dá-se durante a migração por absorvância no UV e dá-se a quantificação das frações separadas⁶⁷. As proteínas séricas dividem-se em seis frações: albumina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama.(Figura 58).

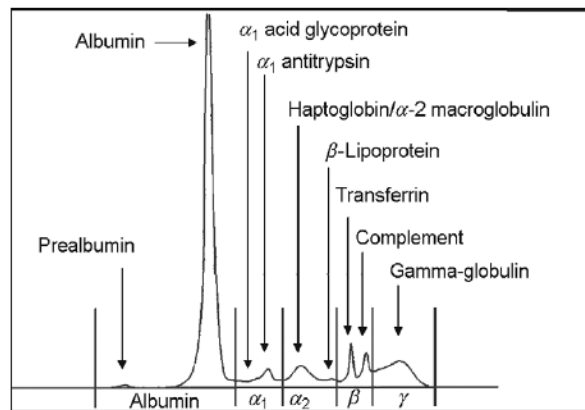


Figura 59: Proteinograma e as frações obtidas.

A obtenção do proteinograma e análise do mesmo é essencial para detetar certas patologias com a alteração das frações obtidas. Também é possível quantificar e detetar componentes monoclonais presentes na fração gama (imunoglobulinas) para diagnóstico e monitorização de pacientes com gamopatias monoclonais.

5.7.2) Imunofixação

A imunofixação é uma técnica que permite a deteção e identificação de imunoglobulinas presentes no soro e na urina, desta maneira é possível direcionar o estudo das gamopatias monoclonais. Esta técnica tem por base a eletroforese e migração das proteínas em gel de agarose, é realizada no equipamento Sebia HYDRASYS Focusing, um equipamento automatizado para a realização de imunofixação sérica e urinária.

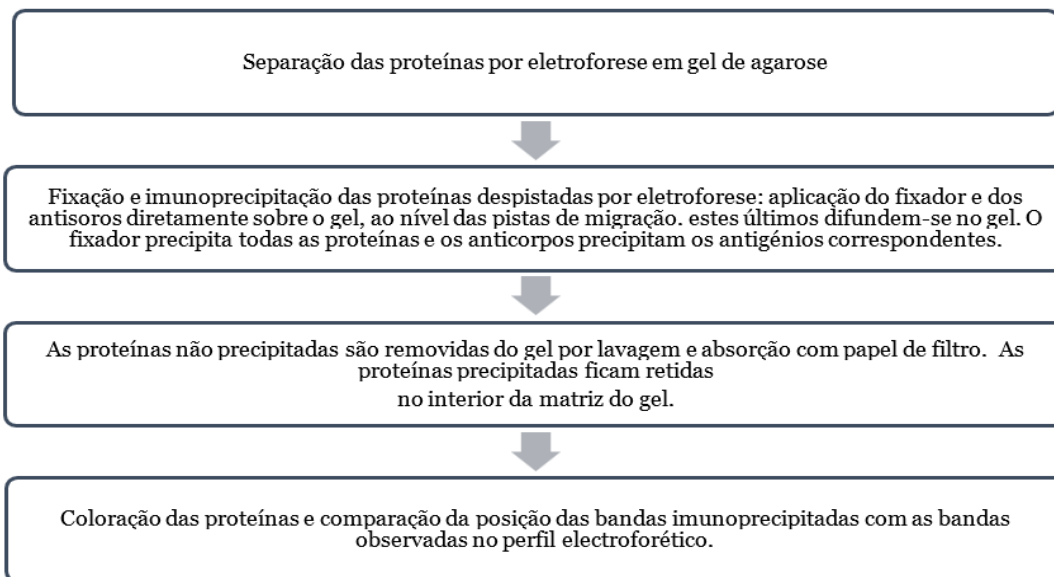


Figura 60: Diagrama do princípio da técnica de imunofixação, adaptado das Bulas dos Géis HYDRASYS.

5.7.2.1) Imunofixação Sérica

A imunofixação sérica é realizada se forem observados picos monoclonais no proteinograma. Contudo, quando não se observam picos monoclonais é necessário realizar uma imunofixação para confirmação da inexistência de gamapatias monoclonais, uma imunofixação em gel Pentavalente. A imunofixação sérica recorre a vários antissoros com especificidades diferentes: anti-cadeias pesadas Ig G, Ig A e Ig M, e anti-cadeias leves kapa e lambda (livres e ligadas)⁶⁹. A imunofixação em gel Pentavalente recorre a um antissoro único (todas as especificidades de antissoro mencionadas antes apenas num único antissoro) pentavalente para efetuar a confirmação da presença das cadeias de imunoglobulina⁷⁰.

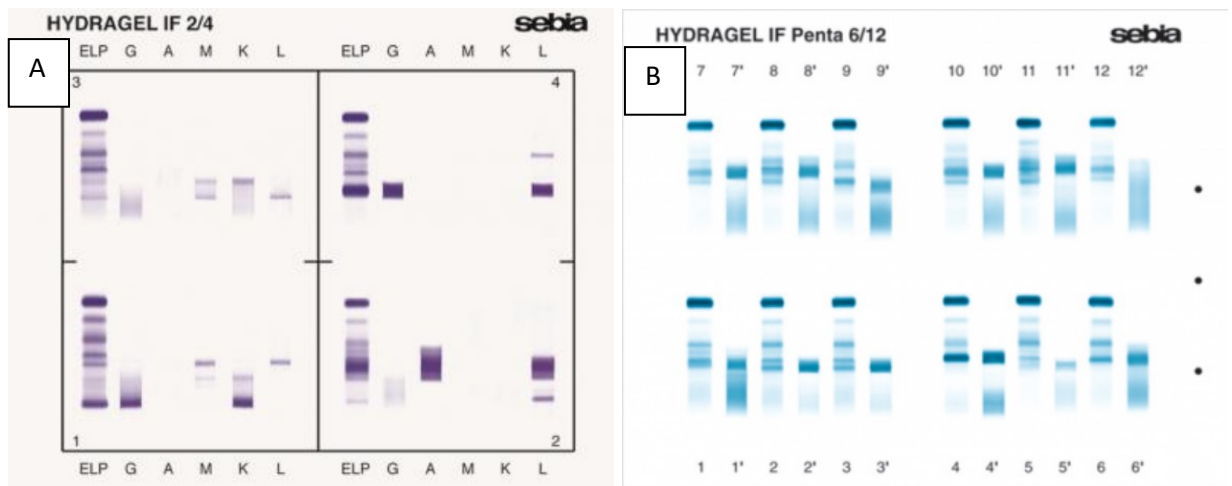


Figura 61: A: Gel para imunofixação sérica, retirada de <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-if>; B: Gel pentavalente de screening retirada de <https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-if-penta>

5.7.2.2) Imunofixação Urinária

Para a imunofixação urinária, doseia-se a proteína urinária. Se a concentração de proteínas for superior a 150mg/24horas, é realizado o gel para perfil urinário que permite a identificação das principais proteínas na urina que permite tipificar a insuficiência real (proteínas tubulares e glomerulares) e permite também a detecção e identificação de cadeias leves livres kappa e lambda, bem como a detecção de imunoglobulinas G, A e M com antissoros específicos⁷¹.

Se a concentração de proteínas na amostra de urina se encontrar inferior a 150mg/24horas, é realizado gel para pesquisa da proteína de Bence-Jones¹⁴. Esta proteína é composta por cadeias leves (kappa ou lambda), quando produzida em elevada quantidade, originária de uma gamapatia monoclonal como o mieloma múltiplo, o rim deixa de conseguir metabolizar e a proteína é excretada na urina, podendo ser detetada e quantificada⁷².

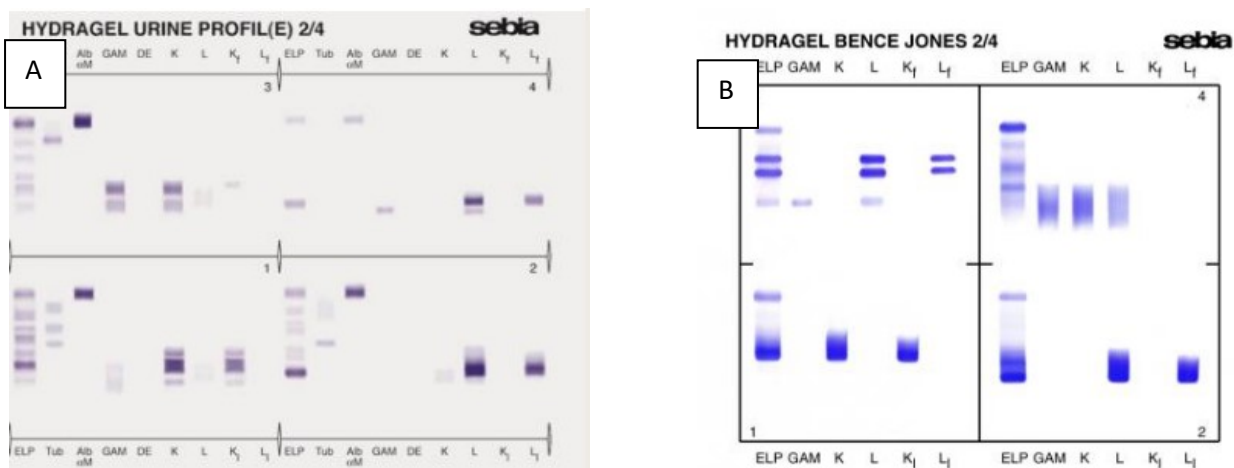


Figura 62: A: Imunofixação em gel para perfil urinário (<https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-urine-profile>); B: Imunofixação em gel para deteção da proteína de Bence-Jones (<https://www.sebia.com/en-EN/produits/hydragel-bence-jones>).

5.8) Análise do Sedimento Urinário

A análise de urinas é efetuada no equipamento SediMAX, já mencionado no ponto 3.4.1) do relatório de Microbiologia. Este equipamento realiza a análise dos sedimentos no módulo AUTIONMax através de tiras Uriflet S, obtendo parâmetros de glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos presentes na amostra⁷³.

5.9) Testes de Biologia Molecular

5.9.1) Carga Viral do HIV⁷⁴

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Este vírus transmite-se através de contacto sexual, exposição a sangue infetado ou infeção pré ou pós-natal do recém-nascido. Este teste indica a carga de RNA viral, essencial para monitorização da resposta à terapêutica antirretroviral.

O ensaio HIV-1 VL, realizado nos sistemas de instrumentos GeneXpert® consiste num teste de RT-PCR desenvolvido para a rápida quantificação de RNA do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 em plasma humano.

5.9.2) Carga Viral do HBV⁷⁵

A infeção pelo vírus da Hepatite B constitui um problema relevante de saúde pública com mortalidade significativa. Este vírus causa inflamação do fígado que pode ser aguda e/ou crónica. O principal diagnóstico desta infeção baseia-se na deteção do antígeno de superfície do vírus, contudo a medição da carga viral através deste ensaio é importante

para traçar um prognóstico da infeção ou mesmo para monitorização da eficácia do tratamento antiviral. O ensaio HBV VL, realizado nos sistemas de instrumentos GeneXpert® consiste num teste de RT-PCR desenvolvido para a rápida quantificação de RNA do vírus da hepatite B em plasma humano.

5.10) Imunoensaios Cromatográficos

5.10.1) Testes de Drogas de Abuso³⁶

Estes imunoensaios cromatográficos servem para detetar drogas de abuso como marijuana, cocaína, benzodiazepinas, morfina e anfetaminas. O teste One Step Drug Screen Test Device tem como princípio base a ligação competitiva da droga em estudo com o seu conjugado. A urina migra por ação capilar, se a droga estiver presente, esta vai ligar-se ao anticorpo específico na zona de teste e ficará saturado, na cassette apenas é visível a linha de controlo. Se a droga de abuso não estiver presente, os anticorpos presentes vão ligar-se ao conjugado, aparecendo uma linha colorida, para além da linha de controlo que valida o teste.

5.10.2) Teste de Gravidez³⁶

O teste Wondfo One Step hCG é um teste que deteta a hormona Gonadotropina coriónica humana, produzida pela placenta, e que se encontra na urina na fase inicial da gravidez. A urina é colocada na cassette e vai migrar por capilaridade. Quando a hCG está presente na urina, reage com a zona de teste revestida por anticorpos específicos para esta hormona e é desenvolvida uma banda colorida. Se a hormona não estiver presente na amostra, não aparece a banda colorida. Em ambos é verificada uma banda de controlo visível que valida o teste.

Referências Bibliográfias

1. van Doorn, H. R. & Yu, H. 33 *Viral Respiratory Infections*. 6.
2. Lauxmann, M. A., Santucci, N. E. & Autrán-Gómez, A. M. The SARS-CoV-2 Coronavirus and the COVID-19 Outbreak. *Int. Braz. J. Urol.* **46**, 6–18 (2020).
3. Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G. & Schinazi, R. F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J. Hepatol.* **74**, 168–184 (2021).
4. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/#sec-2> acedido a 12/01/2021.
5. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical microbiology*. (Elsevier, 2016).
6. Gaitonde, D. Y. Influenza:Diagnosis and Treatment. **100**, 8 (2019).
7. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 3 (2018).
8. Nam, H. H. & Ison, M. G. Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ* **l5021** (2019) doi:10.1136/bmj.l5021.
9. Chuang, Y.-Y. & Huang, Y.-C. Enteroviral infection in neonates. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **52**, 851–857 (2019).
10. Khanal, S., Ghimire, P. & Dhamoon, A. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines* **6**, 30 (2018).
11. Shafagati, N. & Williams, J. Human metapneumovirus - what we know now. *F1000Research* **7**, 135 (2018).
12. Harrison, A. G., Lin, T. & Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* **41**, 1100–1115 (2020).
13. Salzberger, B. *et al.* Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection* **49**, 233–239 (2021).
14. Ayenigbara, I. O., Adeleke, O. R., Ayenigbara, G. O., Adegboro, J. S. & Olofintuyi, O. O. COVID-19 (SARS-CoV-2) pandemic: fears, facts and preventive measures. *Germs* **10**, 218–228 (2020).
15. <https://www.portugal.gov.pt/pt/gc22/governo/comunicado-de-conselho-de-ministros?i=334> acedido a 17/05/2021.
16. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/prevencao/#sec-1>.
17. Lee, S., Meyler, P., Mozel, M., Tauh, T. & Merchant, R. Asymptomatic carriage and transmission of SARS-CoV-2: What do we know? *Can. J. Anesth. Can. Anesth.* **67**, 1424–1430 (2020).
18. On behalf of the COVID-19 Commission of Accademia Nazionale dei Lincei, Rome, Forni, G. & Mantovani, A. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ.* **28**, 626–639 (2021).
19. <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/artigos/vacinas-contr-a-covid-19-aprovadas-na-europa/> acedido a 19/05/2021.
20. McPherson, R. A. & Pincus, M. R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 1823.
21. <http://www.insa.min-saude.pt/category/informacao-e-cultura-cientifica/publicacoes/atividade-gripal/> acedido a 06/06/2021.

22. Doraiswamy, S., Mamtani, R., Ameduri, M., Abraham, A. & Cheema, S. Respiratory epidemics and older people. *Age Ageing* **49**, 896–900 (2020).
23. Paget, J. *et al.* The impact of influenza vaccination on the COVID-19 pandemic? Evidence and lessons for public health policies. *Vaccine* **38**, 6485–6486 (2020).
24. Lin, Q. *et al.* Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View* **1**, (2020).
25. Chiu, N.-C. *et al.* Impact of Wearing Masks, Hand Hygiene, and Social Distancing on Influenza, Enterovirus, and All-Cause Pneumonia During the Coronavirus Pandemic: Retrospective National Epidemiological Surveillance Study. *J. Med. Internet Res.* **22**, e21257 (2020).
26. Huang Q. *et al.* Impact of the COVID-19 nonpharmaceutical interventions on influenza and other respiratory viral infections in New Zealand. *Nat. Commun.* **12**, 1001 (2021).
27. Lei, H. *et al.* Nonpharmaceutical Interventions Used to Control COVID-19 Reduced Seasonal Influenza Transmission in China. *J. Infect. Dis.* **222**, 1780–1783 (2020).
28. Olsen, S. J. *et al.* Decreased Influenza Activity During the COVID-19 Pandemic – United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. **69**, 5 (2020).
29. Unidad de Virología, Hospital Universitario Son Espases. Facultad de Medicina UIB. Palma de Mallorca, Spain, Reina, J., Arcay, R. M., Busquets, M. & Machado, H. Impact of hygienic and social distancing measures against SARS-CoV-2 on respiratory infections caused by other viruses. *Rev. Esp. Quimioter.* (2021) doi:10.37201/req/017.2021.
30. Singer, B. D. COVID-19 and the next influenza season. *Sci. Adv.* **6**, 2–3 (2020).
31. Bai, L. *et al.* Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity. *Cell Res.* **31**, 395–403 (2021).
32. <http://www.chcbeira.pt/> acedido a 12/12/2020.
33. Auer, G. K. & Weibel, D. B. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* **56**, 3710–3724 (2017).
34. <https://www.biomerieux.pt/produto/previr-color-gram> acedido a 29/06/2020.
35. <https://www.elitechgroup.com/product/aerospray-tb-series-2-2> acedido a 29/09/2020.
36. Procedimentos Internos, CHUCB, LPC.
37. https://www.spinreact.com/files/Inserts/inserts_portugues/OSIS23IN-P_FOB_nou_2014.pdf acedido a 05/10/2020.
38. <https://www.mobitec.com/media/vidia/VIDIA-Product-Catalog-2019.pdf> acedido a 05/10/2020.
39. <https://www.praxisdienst.com/en/Lab+Equipment/Tests/Stool+Tests/StorAX+SAF+Stool+Vials.html> acedido a 05/10/2020.
40. <https://www.corisbio.com/pdf/Products/Coris-Pylori-Strip-Helicobacter-Pylori-Diagnostic.pdf> acedido a 05/10/2020.
41. www.techlab.com/wp-content/uploads/2013/06/t5029insert_rev_0609.pdf acedido a 05/10/2020.
42. www.certest.es/wp-content/uploads/2014/10/CerTest_Rota-Adeno_EN.pdf acedido a 05/10/2020.

43. https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2017/11/n1402_ridaquick-norovirus-12-10-26_gb.pdf acedido a 05/10/2020.
44. Green, M. R. & Sambrook, J. Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, pdb.proto95042 (2018).
45. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-Carba-R-Rx-Only-US-IVD-PORTUGUESE-Package-Insert-301-2438-PT-Rev-F.pdf> acedido a 18/11/2020.
46. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-CTNG-US-PORTUGUESE-Package-Insert-301-0234-PT--Rev-K.pdf> acedido a 18/11/2020.
47. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-Flu-PORTUGUESE-Package-Insert-301-1867P-Rev-E.pdf> acedido a 18/11/2020.
48. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-MTB-RIF-PORTUGUESE-Package-Insert-301-1404-PT-Rev-F.pdf> acedido a 18/11/2020.
49. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-MRSA-SA-SSTI-PORTUGUESE-Package-Insert-300-5440-PT-Rev-M.pdf> acedido a 18/11/2020.
50. Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E., & Moss, P. A. H. (2001). *Essential haematology*. Oxford: Blackwell Science.
51. https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2013-2014/labmethods/CBC_H_MET_COMPLETE_BLOOD_COUNT.pdf acedido a 01/02/2021.
52. Bain, B. J. *Blood cells: a practical guide*. (Blackwell, 2008).
53. Ding, L., Xu, Y., Liu, S., Bi, Y. & Xu, Y. Hemoglobin A1c and diagnosis of diabetes. *J. Diabetes* **10**, 365–372 (2018).
54. Urrechaga, E. Analytical evaluation of the ADAMS™A1c HA8180T analyzer for the measurement of HbA1c. *J. Clin. Lab. Anal.* **32**, e22155 (2018).
55. <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/innovance-pfa-200> acedido a 28/01/2021.
56. Tha, M. H. & Ng, H. J. An Approach to the Patient with Non-Surgical Bleeding and a Normal Coagulation Screen. *Proc. Singap. Healthc.* **23**, 21–27 (2014).
57. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert%20HemosIL%20Factor%20II%20%26%20Factor%20V%20ENGLISH%20300-8501%20Rev%20K.pdf> acedido a 09/02/2021.
58. <https://www.cephheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert%20BCR-ABL%20Ultra%20Assay-PORTUGUESE%20PI%20302-0738-PT%20Rev.%20C.pdf> acedido a 15/01/2021.
59. https://dafxbb5uxjcds.cloudfront.net/fileadmin/user_upload/99_Bedienungsanleitung/Intruction_Manual_Sediplus_R__S_2000__230V_90.189.700.pdf acedido a 11/04/2021.
60. <https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/products/c/cobas-p-512-p-612/assets/cobas-p-612-Technical-Specifications.pdf> acedido a 13/04/2021.
61. https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas_-8000-modular-analyzer-series.html acedido a 13/04/2021.
62. Roche. *Analizador Cobas Série 8000. Manual do Operador*.

63. Roche. Analisador Cobas Série e411. Bulas Elecsys.
64. <https://www.corelaboratory.abbott/us/en/offerings/brands/architect/architect-i2000SR> acedido a 14/04/2021.
65. <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> acedido a 15/04/2021.
66. Siemens Healthineers. Atellica NEPH 630 System. Bulas dos controlos.
67. <https://www.sebia.com/en-EN/produits/capi-3-proteine-6> acedido a 16/04/2021.
68. Bossuyt, X. Advances in Serum Protein Electrophoresis. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 42 43–80 (Elsevier, 2006).
69. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF sérica.
70. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF Pentavalente.
71. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF Perfil Urinário.
72. Sebia. HYDRASIS Focusing. Bula IF Bence-Jones.
73. <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/sedimento-urin%C3%A1rio/sedimax2> acedido a 20/04/2021.
74. <https://csvlab.com.br/HIV-1Craga-Viral-Bula-Cepheid.pdf> acedido a 25/04/2021
75. Marcuccilli, F. *et al.* Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert® HBV Viral Load Test. *Diagnostics* **11**, 297 (2021).