

Caracterização Epidemiológica da População com Suspeita de Infecção por Vírus SARS-CoV-2 na Beira Interior

Versão final após defesa

Janise Giselle Caetano Rodrigues

Relatório de estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Mestre Sofia Isabel Aguiar Almeida
Co-orientadora: Mestre Débora Silvestre Gonçalves Rodrigues
Co-orientadora: Prof^a Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

Janeiro de 2021

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Angelina Chantre Caetano, que sempre lutou e sacrificou pelos seus filhos. Mesmo após eu ter ficado 5 anos longe de casa, para fazer a minha licenciatura, aceitou e financiou este novo desafio. Se não fosse o seu apoio, eu seria uma pessoa totalmente diferente e o meu futuro seria outro. Sinto-me privilegiada por ser sua filha.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à Dr.^a Mafalda Felgueiras por todo o carinho e atenção que me deu desde o primeiro dia do estágio. Por toda paciência e por sempre me deixar à vontade para tirar todas as minhas dúvidas, até as que achava tolas. Agradeço por ter tido a oportunidade de conhecer não só a Dr.^a Mafalda Felgueiras, a excelente profissional, mas também a Dr.^a Mafalda Felgueiras amiga, que ajuda, que cuida e que se preocupa com os outros. Agradeço por me ter ajudado nesta reta final e por ter sido mais que uma orientadora. Sem a sua ajuda não teria conseguido entregar este trabalho.

Agradeço à Mestre Débora Rodrigues por ter sido a coorientadora que eu precisava para escrever o relatório de estágio, por exigir sempre de mim, por estabelecer prazos, pela paciência e pelo carinho.

Agradeço à minha coorientadora Prof.^a Ângela Sousa. Eu não poderia ter escolhido melhor coorientadora, obrigada por estar sempre disponível, por ter sempre tempo na sua agenda para nos encontrarmos, obrigada por todos e-mails que enviou a perguntar se estava tudo bem, principalmente nesta fase final. Sou muito grata por me ter ouvido e aconselhado no início do estágio, quando pensei em desistir por não ver mercado de trabalho, mas a Prof.^a Ângela ajudou-me a ver a luz no final do túnel e, felizmente, não desisti.

Agradeço a toda equipe do Serviço de Patologia Clínica, desde os técnicos, aos assistentes operacionais e aos assistentes técnicos. Em especial à Dr.^a Sofia Almeida e às Técnicas Fátima, Lídia, Ana Dias, Rita e Catarina, por me terem recebido com simpatia, por me deixarem sentir sempre à vontade para tirar dúvidas, pela confiança, por me terem feito sentir parte da equipe e pelos momentos de descontração.

Agradeço a Dr.^a Maria Conceição Faria a possibilidade de realizar o meu estágio curricular, bem como o trabalho de pesquisa, no Serviço de Patologia Clínica.

E, por fim, agradeço à aluna de doutoramento Dalinda, que mesmo sem me conhecer, disponibilizou-se e ficou uma manhã comigo para me ensinar a mexer no programa de análise estatística.

Resumo

As pandemias são surtos de doenças infecciosas em grande escala que podem aumentar a morbidade e mortalidade numa ampla área geográfica. Em Dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, surgiram os primeiros casos de uma pneumonia inexplicável, consequência de infeção por um coronavírus. O novo coronavírus foi classificado como SARS-CoV-2 e a doença causada por ele foi designada de COVID-19. No que diz respeito à origem zoonótica do SARS-CoV-2, os morcegos (assim como no SARS-CoV e no MERS-CoV) são os hospedeiros naturais do vírus. Contudo, ainda não foi definido com certeza qual é o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2.

O período de incubação do SARS-CoV-2 varia de um a quatorze dias e a transmissão pessoa a pessoa ocorre por inalação de gotículas respiratórias ou aerossóis provenientes de uma pessoa infetada, que podem ser gerados durante espirros, tosse e exalação. As pessoas infetadas podem não desenvolver manifestações da doença (serem assintomáticas) ou desenvolverem infeção respiratória grave (pneumonia), que em alguns casos culmina em morte. Os sinais e sintomas típicos da COVID-19 são febre, tosse seca, fadiga, expetoração, falta de ar e dor de garganta. Pessoas de todas as idades são suscetíveis ao novo coronavírus, sendo que os idosos e os indivíduos com doenças crónicas, são mais vulneráveis. Até ao momento não existe nenhum medicamento específico que permita curar a COVID-19, nem vacina eficaz que previna a infeção por SARS-CoV-2. A RT-PCR é, atualmente, considerada como o método de diagnóstico laboratorial de eleição da COVID-19.

O presente trabalho teve como objetivos fazer a caracterização demográfica da população com suspeita de infeção por SARS-CoV-2 (por género, idade e proveniência geográfica) e a caracterização clínica dos casos estudados em contexto hospitalar no CHUCB (sintomas de infeção respiratória, alterações hematológicas, renais e hepáticas).

Os resultados obtidos demonstraram que a média de idades da população estudada (n=8609), foi de $57,9 \pm 22,4$ anos para o sexo masculino e de $55,8 \pm 22,4$ anos para o sexo feminino. Do total de casos positivos, 16 foram do sexo masculino e 17 do sexo feminino. De entre os positivos, apenas 4 foram “casos importados” e 1 veio a óbito. Do ponto de vista clínico, a febre foi o sintoma mais frequentemente observado. No que se refere ao estudo analítico realizado nos doentes positivos, os parâmetros de avaliação da função hepática (AST e ALT) mostraram que, estes doentes, apresentaram alteração

dos valores de normalidade das enzimas hepáticas. Os resultados revelaram também que estes doentes apresentavam níveis elevados de PCR, principalmente ao diagnóstico. Contudo, seria necessário uma amostragem maior, para que pudéssemos afirmar com maior certeza estas e outras conclusões. De uma forma global, o presente estudo mostrou que a região da Cova da Beira foi pouco afetada pela primeira vaga da pandemia COVID-19.

Palavras-chave

Coronavírus;SARS-CoV-2;COVID-19;Sintomas;Estudo analítico

Abstract

Pandemics are outbreaks of large-scale infectious diseases that can increase morbidity and mortality in a wide geographical area. In December 2019, the first cases of an unexplained pneumonia appeared in the city of Wuhan, caused by a coronavirus infection. The new coronavirus was classified as SARS-CoV-2 and the disease caused by it was called COVID-19. Regarding the zoonotic origin of SARS-CoV-2, bats (as in SARS-CoV and MERS-CoV) are the natural hosts of the virus. However, the intermediate host of SARS-CoV-2 has not yet been defined with certainty.

The SARS-CoV-2 incubation period varies from one to fourteen days and person-to-person transmission occurs by inhaling respiratory droplets or aerosols from infected people, which can be generated during sneezing, coughing and exhalation. Infected people may not develop symptoms of the disease (be asymptomatic) or develop severe respiratory infection (pneumonia), which in some cases culminates in death. COVID-19 typical signs and symptoms are fever, dry cough, fatigue, sputum, shortness of breath and sore throat. People of all ages are susceptible to the new coronavirus, being the elderly and individuals with chronic diseases are more vulnerable. Until now, there is no specific drug that can cure COVID-19, nor an effective vaccine that prevents SARS-CoV-2 infection. RT-PCR is currently considered as the laboratory diagnosis method of choice for COVID-19.

The present study aimed to make the demographic characterization of the population with suspected SARS-CoV-2 infection (by gender, age and geographical origin) and the clinical characterization of the cases studied in the hospital in CHUCB (symptoms of respiratory infection, changes hematological, renal and hepatic).

The results obtained showed that the studied population average age ($n = 8609$) was 57.9 ± 22.4 years old for males and 55.8 ± 22.4 years old for females. Of the total positive cases, 16 were male and 17 females. Among the positive's cases, only 4 were "imported cases" and 1 died. From a clinical point of view, fever was the most frequently observed symptom. Regarding the analytical study carried out on positive patients, the parameters for assessing liver function (AST and ALT) showed that the patients had abnormal liver enzymes values. The results also revealed that the positive patients had high levels of PCR, mainly at diagnosis. However, a larger sample would be necessary, so that we could affirm these and other conclusions with greater

certainty. Overall, the present study showed that the Cova da Beira region was little affected by the first wave of the pandemic COVID-19.

Keywords

Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, Symptoms, Analytical Study

Índice

Capítulo 1: Estágio Curricular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Cova Da Beira	1
Introdução	1
1.1 Caracterização do Centro Hospitalar Cova Da Beira	2
1.2 Caracterização do Serviço De Patologia Clínica	2
1.3 Secção de Microbiologia	3
1.3.1 Coloração de Gram	5
1.3.2 Coloração de Zhiel-Neelsen	6
1.3.2.1 Meios de Cultura para Crescimento e Isolamento de Microrganismos	7
1.3.2.2 Gelose de Sangue (GS)	8
1.3.2.3 Gelose de Chocolate PoliVitex (PVX)	8
1.3.2.4 Meio Chocolate Haemophilus (HAE2)	9
1.3.2.5 Meio de Chocolate VCAT3	9
1.3.2.6 Meio MacConkey (MCK)	9
1.3.2.7 Meio Colistina e Ácido Nalidíxico (CNA)	9
1.3.2.8 Meio Sabourad	10
1.3.2.9 Meio Salmonella-Shigella (SS)	10
1.3.2.10 Meio Yersinia	10
1.3.2.11 Meio Campylobacter	10
1.3.2.12 Meio Líquido Tetrionato	11
1.3.2.13 Meio Caldo de Carne	11
1.3.2.14 Meio Líquido Todd	11
1.3.2.15 Meio Mueller Hinton (MHE)	11
1.3.2.16 Mueller Hinton com sangue (MHF)	12
1.3.2.17 Meio Pylori	12
1.3.2.18 Meio Lowenstein-Jensen	12
1.3.2.19 Meios de Cultura Cromogénicos	12
1.3.2.19.1 Meio Granada	12
1.3.2.19.2 Meio <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente	13
1.3.2.19.3 Meio Candida	13
1.3.2.19.4 Meio SMAC (meio MacConkey com Sorbitol)	13

1.3.2.19.5	Meio Brilliance	13
1.3.2.19.6	Meio Manitol Salgado (MSA)	14
1.3.3	Tipos de Sementeira e Condições de Incubação	14
1.3.4	Urina	16
1.3.5	Aparelho Respiratório	17
1.3.6	Cateter Vascular	19
1.3.7	Hemocultura	19
1.3.8	Fezes	21
1.3.8.1	Exame Cultural (Coprocultura)	21
1.3.8.2	Exame Parasitológico	21
1.3.8.3	Pesquisa de Microrganismos nas Fezes	22
1.3.9	Líquidos Biológicos	23
1.3.10	Pus	24
1.3.11	Biópsia	24
1.3.12	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente	25
1.3.13	Pesquisa Streptococcus agalactiae	25
1.3.14	Espermocultura	25
1.3.15	Visualização da Bancada	27
1.3.16	Provas Para a Identificação Presuntiva de Microrganismos	27
1.3.16.1	Prova de Catalase	27
1.3.16.2	Prova de Coagulase	28
1.3.16.3	Prova da Oxidase	28
1.3.16.4	Teste da Optoquina	29
1.3.16.5	Teste dos Fatores V, X e VX	29
1.3.17	Confirmação da Resistência à Colistina	30
1.3.18	Tipagem de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos	30
1.3.19	Identificação e Antibiograma de Microrganismos	30
1.3.20	Serologia	33
1.3.20.1	Teste de Rosa de Bengala	33
1.3.20.2	Teste de Wright	33
1.3.20.3	Teste de Widal	34
1.3.20.4	Monoteste	34
1.3.21	Controlo de Qualidade	34
1.4	Seção de Hematologia	35
1.4.1	Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER	37
1.4.2	Equipamento AEROSPRAY®	40

1.4.3	Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T	41
1.4.4	Sediplus® S 2000	43
1.4.5	Equipamento INNOVANCE PFA-200	44
1.4.6	Equipamento ACL TOP®	46
1.4.6.1	Tempo protrombina	47
1.4.6.2	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	47
1.4.6.3	Tempo de trombina	48
1.4.6.4	Fibrinólise	48
1.4.6.5	Inibidores da Coagulação	49
1.4.6.5.1	Anticoagulante Lúpico	49
1.4.6.5.2	Fator de von Willdbrand	50
1.4.7	Citometria de Fluxo	50
Capítulo 2: Estudo Epidemiológico Da Incidência Do Vírus Sars-Cov-2 Na Beira Interior		52
2.1	Introdução	52
2.1.1	Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda Grave	54
2.1.1.1	A Origem Zoonótica do SARS-CoV	55
2.1.2	Síndrome Respiratória do Oriente Médio	55
2.1.2.1	A Origem Zoonótica do MERS-CoV	56
2.1.3	O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2	57
2.1.3.1	Origem Zoonótica do SARS-CoV-2	58
2.1.4	Os Morcegos como Hospedeiros Naturais do Vírus (coronavírus)	59
2.1.5	Virologia do SARS-CoV-2	59
2.1.6	Biologia Molecular do SARS-CoV-2	62
2.1.7	Fatores que Favorecem a Transmissão dos SARS-CoV	63
2.1.8	Diagnóstico da COVID-19	64
2.2	OBJETIVOS	67
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	67
2.3.1	Amostra	67
2.3.2	Desenho de estudo	68
2.3.3	Inativação e Extração de RNA Viral	68
2.3.4	Protocolo de RT-PCR em Tempo Real	69
2.3.5	Análise dos Dados	70
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70

2.4.1	Caracterização Demográfica da População Estudada	70
2.4.2	Caracterização Clínica dos Casos Estudados em Contexto Hospitalar no CHUCB	72
2.5	Conclusão e Perspectivas Futuras	75
	Referências Bibliográficas	76
	Anexo I- Declaração de Estágio na Secção de Microbiologia	85
	Anexo II- Declaração de Estágio na Secção de Hematologia	86
	Anexo III- Declaração do Laboratório de Testes de Diagnóstico do Covid-19 Cics-UBI	87

Lista de Figuras

Figura 1- Classificação morfológica das bactérias

Figura 2- Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo

Figura 3- Observação ao microscópico de bactérias Gram-negativo negativo (à esquerda) e bactérias Gram-positivo (à direita)

Figura 4- Observação de micobactérias ao microscópio coradas pela coloração de Ziehl-Neelsen.

Figura 5- Tipos de hemólise observados na gelose de sangue

Figura 6- (a) Esquema da técnica de sementeira por contagem de colónias; (b) Uma placa inoculada pela mesma técnica

Figura 7- (a) Esquema da técnica de sementeira por quadrantes; (b) Uma placa inoculada pela mesma técnica.

Figura 8- - Esquema de processamento da técnica de sementeira em rede

Figura 9- (a) Garrafa de hemocultura de aerobiose (tampa verde), de anaerobiose (tampa laranja) e pediátrica (tampa amarela); (b) Interpretação do seu resultado.

Figura 10- Galeria para deteção de *Mycoplasma* e *Ureoplasma*

Figura 11- Formação de bolhas em bactérias que possuem a enzima catálase

Figura 12- **(a)** Meio gelose de sangue com uma zona de inibição em torno do disco; (b) um teste negativo de optoquina (não se observa halo de inibição).

Figura 13- (a) Equipamento Vitek® 2 Compact; (b) Cartas para identificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos

Figura 14- Antibiógramas manuais com antibióticos no formato de disco e fita

Figura 15- Tubos utilizados na secção de Hematologia. (a)Tubo de EDTA (tampa vermelha); (b e c) tubos contendo citrato (tampa verde e tampa roxa)

Figura 16- (a) Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER; (b) o hemograma dividido em 3 partes: eritrograma, leucograma e plaquetograma.

Figura 17- (a) Ilustração de como realizar um esfregaço de sangue periférico e o aspecto de um esfregaço com separação ótima para observação; (b) Equipamento AEROSPRAY®.

Figura 18- Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T

Figura 19- Constituição e estrutura molecular da hemoglobina

Figura 20- (a) Equipamento Sediplus® S 2000; (b) A diferença entre os 0 e 60 minutos

Figura 21- a) Equipamento INNOVANCE PFA-200; (b) Princípio do teste da hemostase primária

Figura 22- Equipamento ACL TOP.

Figura 23- Cascata da coagulação

Figura 24- Estrutura e constituição dos coronavírus

Figura 25- Classificação filogenética dos coronavírus

Figura 26- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do SARS-CoV

Figura 27- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do MERS-CoV

Figura 28- Países com casos de COVID-19

Figura 29- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2

Figura 30- Painel de recomendações de tratamento farmacológico para pacientes com COVID-19 com base na gravidade da doença

Figura 31- Estrutura genômica do SARS-CoV-2

Figura 32- Mecanismo que o SARS-CoV-2 utiliza para entrar nas células hospedeiras e conseguir replicar-se

Figura 33- Diagramas estruturais das glicoproteínas S de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. As proteínas S contêm subunidades S1 e S2, que são divididas pelos locais de clivagem S. FP: peptídeo de fusão; FC: repetição do heptal 1 e repetição do heptal 2; RBD: domínio de ligação ao receptor, contém motivo de ligação ao núcleo no subdomínio externo; SP: peptídeo sinal

Figura 34- Etapas do diagnóstico do COVID-19

Figura 35- Processo de amplificação do cDNA viral na RT-PCR em tempo real

Figura 36- Esquema das etapas de preparação das amostras para RT-PCR em tempo real.

Figura 37- Proveniência das amostras

Figura 38- a) Número de testes realizados por género; b) Idade média por género e respetivo desvio padrão

Figura 39- Tipo de contágio

Figura 40- Sintomas registados no CHUCB

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classificação das bactérias quanto à sua fonte de carbono e oxigênio

Tabela 2- As estufas utilizadas na SM e as suas respectivas funções

Tabela 3- Diferentes tipos de cartas para a identificação e estudo de sensibilidade aos antibióticos

Tabela 4- Parâmetros do eritrograma

Tabela 5- Parâmetros do leucograma

Tabela 6- Parâmetros do plaquetograma

Tabela 7- Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Tabela 8- Interpretação dos resultados dos ensaios de RT-PCR em tempo real

Tabela 9- Valores médios dos parâmetros hematológicos; V.R= valores de referência

Tabela 10- Valores médios dos parâmetros que avaliam a função hepática, renal e a PCR

Lista de Acrónimos

ADP	Adenosina difosfafo
ACE2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
AL	Anticoagulante lúpico
ARDS	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	Citometria de fluxo
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
CNA	Meio Colistina e Ácido Nalidíxico
CoV	Coronavírus
COVID-19	Doença Coronavírus
CQE	Controle de Qualidade Externo
CQI	Controle de Qualidade Interno
DDP4	<i>Receptor dipeptidil peptidase 4</i>
E	Proteína de Envelope
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA K3	Ácido etileno-diamino-tetracético tripotássico
ERGIC	Compartimento Intermediário de Golgi
FvW	Fator de von Willebrand
GS	Gelose de Sangue
HAE2	Meio Chocolate Haemophilus
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA1c	Hemoglobina glicada
HbF	Hemoglobina fetal
Hel	Helicase
Ht	Hematócrito
IFN	Interferão
INR	Razão Normalizada Internacional
ITU	Infeções do trato urinário
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M	Proteína de Membrana
MCK	Meio MacConkey
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHE	Meio Muller Hinton
MHF	Meio Muller Hinton com sangue
MIC	Concentração inibitória mínima
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	Meio Staphylococcus aureus Meticilina Resistente
MSA	Meio Manitol Salgado

N	Nucleocapsídeo
NSPs	Proteínas não Estruturais Funcionais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLT	Plaquetas
PVX	Gelose de Chocolate PoliVitex
RBD	Domínio de Ligação ao Recetor
RE	Retículo Endoplasmático
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RDW	Dispersão do volume eritrocitário
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
S	Proteína spike
SS	Meio Salmonella-Shigella
SARS	Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SNC	Sistema Nervoso Central
SM	Secção de Microbiologia
SMAC	Meio MacConkey com Sorbitol
SPC	Serviço de Patologia Clínica
TP	Tempo de Protrombina
TT	Tempo de Trombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
UBI	Universidade da Beira Interior
VCAT	Vancomicina, colistina, anfotericina, trimetropim
VCM	Volume corpuscular médio
ZN	Coloração de Ziehl-Neelsen

Capítulo 1: Estágio Curricular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira

Introdução

A formação na área de bioquímica é baseada em dois campos complementares: o dos conhecimentos teóricos fundamentais, e o da experiência diário no laboratório, onde a aprendizagem se faz a partir de cada dúvida e dificuldade. Tendo por base essa perspectiva, no segundo ano de Mestrado em Bioquímica, optei por realizar um estágio profissional no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB), e um trabalho de científico.

O estágio profissional no SPC do CHUCB, que teve a duração de 6 meses, permitiu-me participar nas diversas funções que o Técnico Superior de Saúde exerce num laboratório de patologia clínica, que envolvem a organização e controlo de todas as fases do circuito analítico, no sentido de assegurar uma resposta rápida, mantendo sempre elevados padrões de qualidade. Para que tal seja possível é necessário ter conhecimentos gerais sobre cada área de trabalho e, conhecer e compreender as metodologias utilizadas em cada uma delas. O estágio foi dividido entre as secções de microbiologia e hematologia, e durante o tempo que passei em cada uma das secções, adquiri, progressivamente, aptidões teórico-práticas e executei todas as tarefas da rotina diária (Anexo I e II). Foi, sem dúvida, uma experiência que me permitiu crescer como profissional, por contribuir para aumentar a minha sensibilidade para o impacto que os resultados laboratoriais têm, no que ao doente diz respeito.

Na altura em que estava a terminar o estágio profissional, a pandemia da COVID-19 começou a ter impacto a nível nacional, e eu achei que era interessante fazer a caracterização epidemiológica da população da Cova da Beira, que estava a ser testada. Nessa mesma altura, tive a sorte de ter sido selecionada para participar na bolsa de interessados para apoio na realização de testes de diagnóstico do SARS-CoV-2, tendo tido oportunidade de aprender e executar as técnicas de biologia molecular utilizadas na identificação do SARS-CoV-2 (Anexo III). Oportunidade que me permitiu compreender de forma prática, o processo laboratorial de diagnóstico da COVID-19. Com o avançar da pandemia, foram publicados inúmeros trabalhos científicos que apontavam para alterações/disfunções nos diferentes sistemas do corpo humano, consequência da infeção por SARS-CoV-2. Nesse contexto, foram definidos os objetivos secundários do meu trabalho científico. O trabalho desenvolvido, permitiu-me desenvolver raciocínio crítico sobre como analisar, apresentar e discutir resultados.

De uma forma global, considero que a minha integração no SPC do CHUCB onde estagiei, e o trabalho científico que realizei, permitiu-me desenvolver capacidade de raciocínio laboratorial, e a autonomia e juízo crítico que vão definir a minha prática profissional futura.

1.1 Caracterização do Centro Hospitalar Cova da Beira

O Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira (CHUCB) E.P.E, é uma unidade do Serviço Nacional de Saúde Português que presta cuidados de saúde às populações residentes nos concelhos da Covilhã, Fundão, Belmonte e Penamacor. O CHUCB oferece serviços médicos na área da Cardiologia, Reumatologia, Imunoalergologia, Neurologia, Infeciologia, Nutrição e Atividade Física, Oncologia, Medicina Interna, Gastroenterologia, Hematologia, Medicina Paliativa, Pneumologia e Psiquiatria. Este centro hospitalar oferece ainda serviços cirúrgicos e de medicina preventiva, Medicina Reprodutiva, Neonatologia e meios complementares de diagnóstico. Todos os serviços anteriormente citados encontram-se integrados nas quatro unidades cruciais do CHUCB: Urgência, Urgência Pediátrica, Internamento e Consulta Externa¹.

1.2 Caracterização do Serviço de Patologia Clínica

O SPC situa-se no piso 0, no Hospital Pêro da Covilhã, e no piso 1 situa-se a Central de Colheitas e a Área de atendimento ao público. As análises clínicas são um importante meio de diagnóstico complementar, que permitem diagnosticar patologias ou doenças de maior ou menor gravidade, sendo que a maior parte das decisões médicas é tomada a partir dos resultados obtidos².

O SPC tem como missão:

Processar produtos biológicos dos utentes que recorrem ao serviço, efetuando a determinação analítica dos parâmetros solicitados, de forma a ajudar ao diagnóstico clínico e à instituição de uma terapêutica adequada;

- efetuar colheitas de sangue em segurança, tendo sempre presente o grau de satisfação dos utentes de forma a poder melhorar a qualidade dos serviços prestados;
- efetuar determinações analíticas fiáveis em tempo útil, baseadas na atualização técnica, na qualidade e na automatização;
- motivar os colaboradores, delegando níveis de competência e promovendo a formação profissional;
- participar no ensino pré-graduado e pós-graduado;
- participar em projetos de investigação.

Para além das áreas administrativas e de colheitas, o SPC encontra-se dividido em 6 secções: Hematologia, Microbiologia, Imunoquímica, Virologia, Autoimunidade e Urgência. O SPC atende os utentes do Internamento, Consulta Externa e Urgência Geral do CHUCB, utentes da ARS Sub-Região de Castelo Branco e outros Sub -Sistemas, numa média de 500 utentes por dia².

O SPC do CHCB conta com uma equipa multidisciplinar constituída por 3 médicos (sendo a diretora de serviço – Dr.^a M. Conceição Faria), 3 farmacêuticos, 3 técnicos superiores de saúde, 17 técnicos de diagnóstico e terapêutica, 3 assistentes operacionais e 6 assistentes técnicos.

O Serviço encontra-se informatizado, utilizando como sistema operativo o Sistema Informático de Laboratório – *Modulab Gold*®. Tem ligação informática aos Serviços de Urgência pelo Sistema *Alert*® e possui ainda o Sistema *Infinity*® que gere todo o processo laboratorial pré-analítico².

1.3 Secção de Microbiologia

A Secção de Microbiologia (SM) tem como principal objetivo contribuir para o diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças infecciosas, através do isolamento e identificação de microrganismos, bem como o estudo da resistência dos agentes infecciosos aos antibióticos, através da determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Na SM são processados diversos tipos de amostras biológicas, como são exemplo: urina, fezes, lavados bronco-alveolares, pus, biópsias. As diferentes amostras podem ser enviadas à SM em quatro tipos de recipientes: frasco asséptico, zaragatoa, portagerme e garrafa de hemocultura. As amostras são identificadas através de códigos de barras, e o seu processamento é realizado em condições de assepsia, perto do bico de Bunsen ou na câmara de fluxo laminar.

As bactérias são microrganismos unicelulares, procariontes, microscópicos, que podem ser encontradas na forma isolada ou em colónias e são responsáveis por inúmeras doenças a nível mundial, tais como a cólera, tuberculose e meningite bacteriana, etc³⁻⁴.

As bactérias são classificadas de acordo com a sua morfologia, estrutura da sua parede celular e características nutricionais. Quanto à sua morfologia podemos classificá-las em **cocos**, **bacilos** e **espiroquetas**. Os **cocos** (células de forma esférica) podem apresentar-se como uma célula única ou em aglomerados: diplococos (dois juntos), estreptococos (em cadeia), estafilococos (em aglomerados), sarcinas e tetradas. Os **bacilos** (células em forma de bastonete) também podem apresentar-se como uma célula única ou em cadeia, estreptobacilos. As espiroquetas têm uma forma espiralada (Figura 1)⁵.

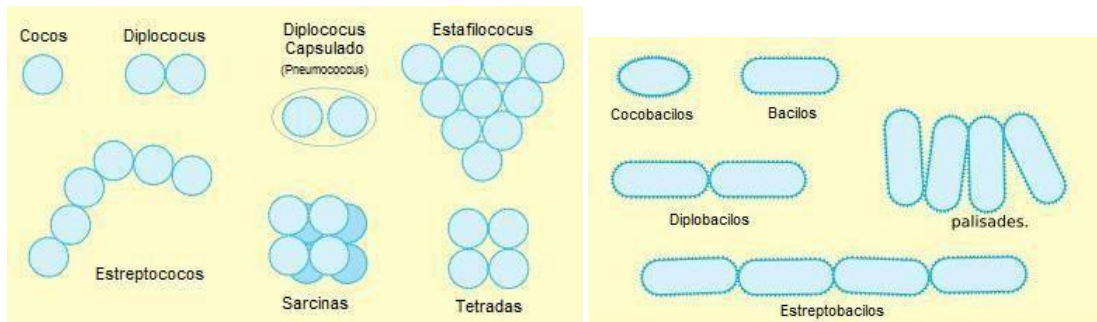


Figura 1- Classificação morfológica das bactérias⁵.

Todas as bactérias possuem parede celular, exceto os micoplasmas, que tem como função proteger a célula bacteriana da lise osmótica e evita contato com substâncias externas nocivas. Quanto à estrutura, a parede celular das bactérias pode ser dividida em dois grupos: bactérias Gram-positivo (BGP) e bactérias Gram-negativo (BGN) (Figura 2). As bactérias Gram-positivo possuem uma parede celular simples, constituída por membrana citoplasmática e uma camada espessa de peptidoglicano, um polímero que garante a estrutura da bactéria, por formar uma estrutura rígida. As bactérias Gram-negativo possuem uma parede celular mais complexa, constituída por uma membrana citoplasmática, um espaço periplasmático, que contém uma camada delgada de peptidoglicano, e uma membrana externa⁵.

Apesar da estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativo ser mais complexa, elas possuem uma camada de peptidoglicano muito fina, em comparação com as bactérias Gram-positivo. É devido a esta diferença nas características da parede celular que é possível fazer uma identificação preliminar das bactérias recorrendo a um método que é a coloração de Gram⁵.

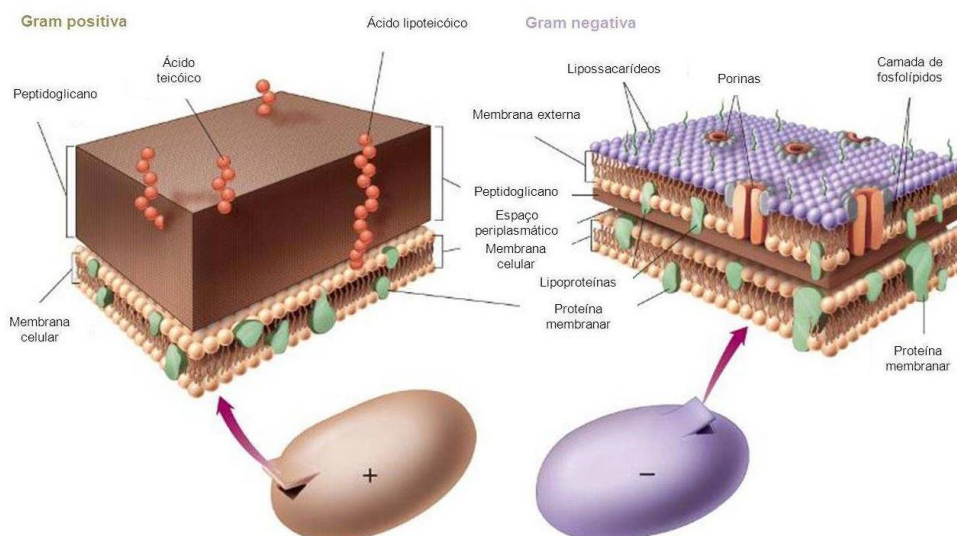


Figura 2- Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (Adaptado de 6).

De acordo com as categorias nutricionais as bactérias podem ser classificadas em **heterotróficas e autotróficas**. O metabolismo das bactérias heterotróficas baseia-se na oxidação de compostos orgânicos como hidratos de carbono, lípidos e proteínas. O metabolismo das bactérias **autotróficas** baseia-se na oxidação de compostos inorgânicos⁵.

As bactérias heterotróficas podem ainda ser classificadas em aeróbias, anaeróbias e fermentadoras. As bactérias aeróbias realizam a oxidação completa da glucose através da utilização de oxigénio, o aceitador final de eletrões, para a síntese de ATP. Nas bactérias anaeróbias, o recetor de eletrões são substâncias como NO₃⁻, SO₄⁻ ou CO₂, o que faz com que estas sejam menos eficientes na produção de ATP. A respiração anaeróbia ocorre em bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, como são exemplo as enterobactérias⁵.

As bactérias que conseguem sobreviver em ambientes com valores de pH muito baixos, utilizam a fermentação láctica para a obtenção de energia. Estas bactérias, como são exemplo os *Streptococcus* spp. e os *Lactobacillus* spp., não possuem a enzima catalase mas possuem enzimas peroxidases e superóxido dismutase. Os microrganismos podem ainda ser classificados em relação à sua fonte de carbono, oxigénio (Tabela 1) e azoto⁵.

Tabela 1- Classificação das bactérias quanto à sua fonte de carbono e oxigénio

Fonte de Carbono	Quimioautotróficos	Utilizam o CO ₂ como fonte de carbono
	Quimoheterotróficos	Utilizam fontes orgânicos como fonte de carbono.
Fonte de oxigénio	Aeróbios obrigatórios	São dependentes do oxigénio, só crescem na sua presença.
	Anaeróbios obrigatórios	O oxigénio é tóxico para estas bactérias.
	Anaeróbios facultativos	Podem utilizar ou não o oxigénio; conseguem crescer na presença ou na ausência de oxigénio, contudo o crescimento é mais produtivo na sua presença.
	Anaeróbias – aerotolerantes	O oxigénio não é tóxico, mas não é utilizado.
	Microaerófilicos	Bactérias que crescem melhor em concentrações. Baixas de oxigénio (2-10%) e 10% de CO ₂ .

1.3.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram é um dos métodos mais importante e mais valioso para a identificação bacteriana, que tem como principais vantagens a rapidez e o baixo custo. Esta coloração baseia-se na capacidade das bactérias reterem o corante cristal de violeta no interior da célula. A capacidade de reter o corante prende-se com as propriedades físicas e químicas da parede celular e bacteriana tais como espessura, densidade, porosidade e integridade.

Antes da realização da coloração é realizado um esfregaço numa lâmina de vidro, espalhando uma pequena quantidade da amostra biológica. A amostra pode ser obtida a partir de um meio de cultura líquido ou sólido, ou diretamente da amostra biológica original. Após a execução do

esfregaço, a lâmina é deixada a secar ao ar ambiente ou numa estufa a 35/37°C. Posteriormente, o esfregaço é fixado pelo calor ou utilizando etanol (fixação química). O principal objetivo da fixação consiste em aderir a amostra à lâmina, por forma a que a amostra não se perca durante o processo de coloração.

Após as etapas anteriormente descritas, a amostra é corada com o cristal de violeta (corante primário). Seguidamente é adicionada uma solução de iodo (fixador), que irá formar um complexo insolúvel cristal-violeta-iodo, que é absorvido quer pelas bactérias Gram-negativo, quer pelas Gram-positivo. Nesta altura, as bactérias adquirem uma coloração violeta.

Posteriormente, o esfregaço é descolorado com recurso a etanol ou acetona, que desidratam a camada de peptidoglicano das bactérias Gram-positivo. A desidratação da camada de peptidoglicano vai fazer com que a sua estrutura fique ainda mais compacta, permitindo a retenção do corante primário. Nas bactérias Gram-negativo o etanol dissolve a porção lipídica da membrana externa e, conseqüentemente, por terem uma fina camada de peptidoglicano, não conseguem reter o corante primário, levando à descoloração das células. Por último, os esfregaços são tratados com safranina (contra-corante). A safranina vai permitir evidenciar as bactérias **Gram-negativo**, por estas adquirirem uma coloração avermelhada, e as bactérias **Gram-positivo** por adquirirem uma coloração púrpura (Figura 3).

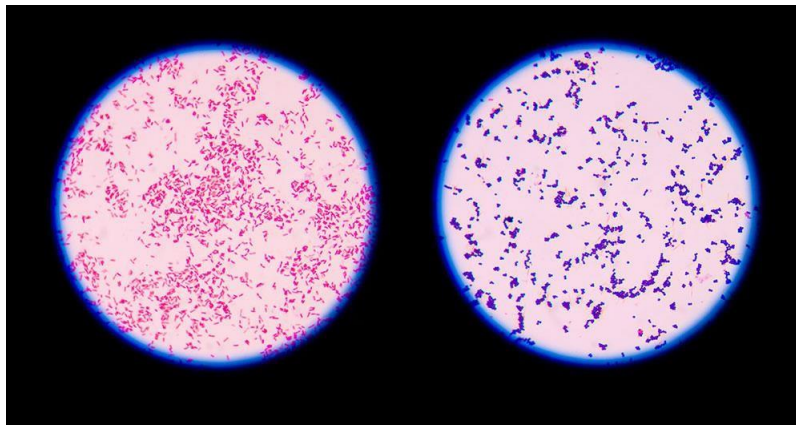


Figura 3- Observação ao microscópico de bactérias Gram-negativo (à esquerda) e bactérias Gram-positivo (à direita) (Adaptado de 7).

1.3.2 Coloração de Zhiel-Neelsen

A coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) é utilizada para corar bactérias pertencentes à família das *Mycobacteriaceae*, que não coram pela coloração de Gram. Estas bactérias são fortemente resistentes a descoloração por uma solução álcool-ácido forte, sendo denominadas por bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR). Esta característica é devida ao facto da parede celular ter um elevado teor de ácido micólico, que as protege de desinfetantes, antibióticos e corantes⁵.

Para se realizar a coloração de ZN faz-se um esfregaço numa lâmina de vidro, que se deixa secar, e que é fixado pelo calor. Em seguida, adiciona-se uma solução de fucsina fenicada, e aquece-se a lâmina até à emissão de vapores. O calor vai desintegrar os lípidos constituintes da membrana, tornando-a permeável, permitindo assim que as células bacterianas e outras estruturas

presentes no esfregaço sejam coradas de vermelho. A descoloração é realizada com uma solução álcool-ácido que irá descorar todas as bactérias exceto as ácido-álcool resistentes. Por fim a lâmina, é adicionada uma solução de azul de metileno que irá corar as bactérias que não possuem uma parede celular rica em lípidos. Após a coloração de ZN, ao serem observadas no microscópico, as bactérias ácido-álcool resistentes estarão coradas de vermelho e as não ácido-álcool resistentes estarão coradas de azul (Figura 4)⁵.

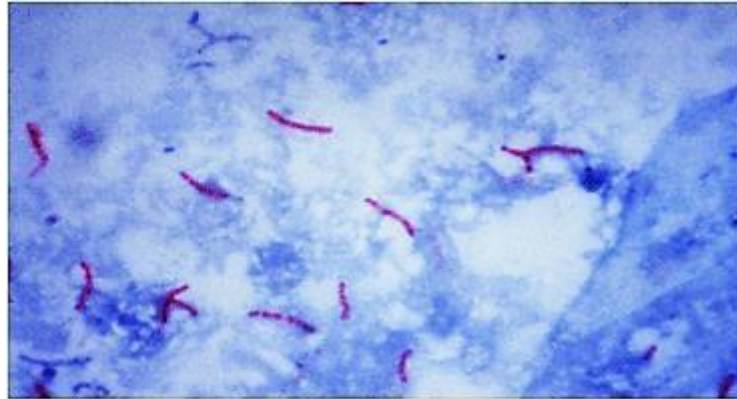


Figura 4- Observação de micobactérias ao microscópio coradas pela coloração de Ziehl-Neelsen. (Retirado de 8).

1.3.2.1 Meios de Cultura para Crescimento e Isolamento de microrganismos

Os meios de cultura fornecem os nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos. Para que os microrganismos possam crescer, eles também necessitam de condições ótimas de oxigênio (presença ou ausência), pH e pressão osmótica.

Os meios de cultura podem classificar-se em **meios líquidos** e **meios sólidos**. Os meios líquidos não contêm ágar, permitindo uma maior disponibilização dos nutrientes, e os meios sólidos, por conterem ágar na sua constituição, permitem o isolamento e a contagem das colônias. O crescimento bacteriano em meio líquido identifica-se pela turvação do mesmo, e em um meio sólido pela presença de colônias^{5,9}.

Os meios de cultura podem também ser classificados como meios enriquecidos, seletivos ou diferenciais.

Meios enriquecidos – meios de cultura que contém fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento de microrganismos exigentes, tais como vitaminas, aminoácidos ou componentes sanguíneos.

Meios seletivos – meios que contém antibióticos, ou outras substâncias, que impedem o crescimento de grupos de microrganismos específicos, permitindo o isolamento de um microrganismo particular.

Meios diferenciais – meios que permitem a distinção entre microrganismos semelhantes mas com características culturais diferentes (ex.: coloração das colônias)¹⁰.

1.3.2.2 Gelose de Sangue (GS)

É um meio de cultura não seletivo e diferencial, onde crescem a maioria dos microrganismos. É utilizado rotineiramente para o isolamento de microrganismos não fastidiosos, mas também na realização da prova de satelitismo, para identificação presuntiva de *Haemophilus* spp. E na diferenciação entre *Streptococcus* spp. E *Staphylococcus* spp. Esta diferenciação é possível devido ao facto da GS conter na sua constituição eritrócitos íntegros, que ao serem lisados pelos diferentes microrganismos, vai levar ao aparecimento de halos de diferentes tonalidades á volta das colónias^{9,11}.

Os *Streptococcus* spp. São classificados de acordo com a sua atividade hemolítica em β -hemólise, α -hemólise e γ -hemólise^{9,11}.

B-hemólise: presença de halo transparente em torno das colónias (lise total dos eritrócitos).

A-hemólise: presença de halo esverdeado em torno das colónias (lise parcial dos eritrócitos).

γ -hemólise (sem hemólise): ausência de halo em torno das colónias (eritrócitos permanecem íntegros) (Figura 5) ^{9,11}.

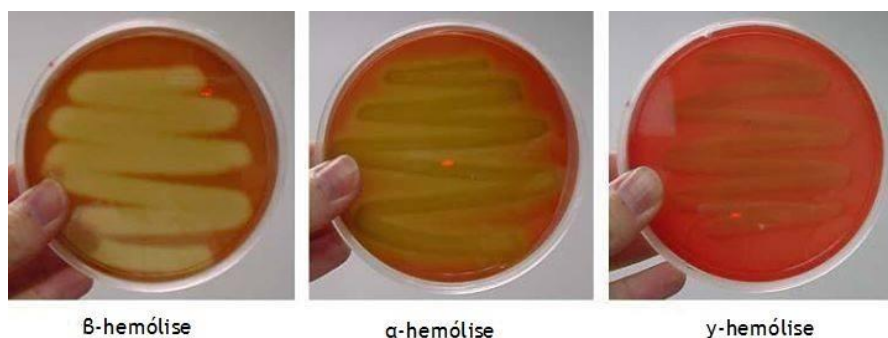


Figura 5- Tipos de hemólise observados na gelose de sangue (Adaptado de 12).

1.3.2.3 Gelose de Chocolate PoliVitex (PVX)

O PVX é um meio de cultura enriquecido, não seletivo. Embora no PVX cresçam quase todos os tipos de microrganismos, ele é utilizado para a cultura de microrganismos exigentes, como são exemplos os *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella* spp. O PVX tem na sua constituição sangue de cavalo, carneiro ou coelho aquecido a altas temperaturas. O facto de o sangue ser aquecido vai fazer com que haja lise dos eritrócitos, conferindo uma cor castanha escura ao meio de cultura. Por outro lado, a lise dos eritrócitos permite disponibilizar o Factor X (heme) e o Factor V (NAD), compostos fundamentais para o crescimento dos microrganismos exigentes^{13,14}.

O aparecimento no PVX de colónias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo é sugestivo de *Neisseria* spp, *Branhamella catarrhalis* ou *Moraxella* spp. Colónias pequenas, com pigmento de cor creme claro são sugestivas de *Haemophilus* spp.

1.3.2.4 Meio Chocolate Haemophilus (HAE2)

O meio de cultura HAE2 é um meio seletivo, utilizado para o isolamento de *Haemophilus influenzae* em amostras biológicas. Alguns serótipos de *H. influenzae* (b e f) são responsáveis por infecções graves como a meningite. O HAE2 para além de conter fator X e fator V, contém também bacitracina. A bacitracina inibe a maior parte da flora comensal, permitindo o desenvolvimento do *H. influenzae*, que é resistente a este agente antimicrobiano¹¹.

1.3.2.5 Meio de Chocolate VCAT3

O meio de cultura Chocolate VCAT3 é um meio seletivo, utilizado para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae*. A seletividade do meio de cultura é obtida pela junção de antibióticos e antifúngicos (VCAT= *vancomicina, colistina, anfotericina, trimetropim*), que permitem inibir a maior parte das bactérias e das leveduras presente nas amostras¹⁴.

1.3.2.6 Meio MacConkey (MCK)

O meio de cultura MCK é um meio de cultura seletivo e diferencial, que permite isolar bacilos Gram-negativo e aferir se estes fazem ou não a fermentação da lactose, pela cor que a colónia adquire. O meio contém cristal de violeta e sais biliares que inibem o crescimento de microrganismos Gram positivo, vermelho neutro (indicador de pH), lactose e peptona^{11,15}.

As bactérias fermentadoras de lactose (Lac+), como a *Escherichia coli*, utilizam a lactose e produzem ácido como produto final da fermentação, que diminui o pH do meio, resultando no desenvolvimento de colónias de cor rosa^{11,15}.

As bactérias não fermentadoras de lactose (Lac-), como a *Salmonella* e *Pseudomonas*, por não conseguirem utilizar a lactose, utilizam a peptona como fonte de carbono. Ao utilizarem a peptona ocorre a formação de amónia, que aumenta o pH do meio, resultando no desenvolvimento de colónias de cor branca ou incolares^{11,15}.

1.3.2.7 Meio Colistina e Ácido Nalidíxico (CNA)

É um meio seletivo que é utilizado para o isolamento de microrganismos Gram-positivo, em especial os estreptococos e os estafilococos. O CNA contém na sua composição dois antibióticos, a colistina e o ácido nalidíxico, que inibem os microrganismos Gram-negativo^{11,16}.

1.3.2.8 Meio Sabourad

É um meio utilizado para o cultivo e isolamento de fungos, por possui elevada concentração de glucose e um baixo nível de pH. A maioria das bactérias não consegue sobreviver em meios com esta composição, uma vez que o seu crescimento é inibido¹⁷.

1.3.2.9 Meio Salmonella-Shigella (SS)

É um meio seletivo e diferencial que permite a seleção e o isolamento de espécies de *Salmonella* e *Shigella* em amostras de fezes. O SS possui sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio, que inibem os microrganismos Gram-positivo; lactose, que permite diferenciar os microrganismos Lac- e Lac+; e tiosulfato de sódio e citrato férrico que permitem a deteção de sulfeto de hidrogénio (H₂S) que permite evidenciar colónias com o centro negro^{11,18}.

A presença no meio de SS de colónias com centro negro deve levar-nos a suspeitar de *Salmonella spp*. A presença de colónias incolores, podem ser indicativas de presença de *Shigella spp*.

O meio SS é mais seletivo para microrganismos Gram-negativo do que o meio MacConkey devido à maior concentração de sais de bile^{11,18}.

1.3.2.10 Meio Yersinia

Meio seletivo utilizado para o isolamento de *Yersinia*, agente causador de gastroenterite. O meio contém cristal de violeta que inibe seletivamente os microrganismos Gram-negativo e Gram-positivo. Este meio contém manitol, que ao ser fermentado pela *Yersinia*, juntamente com o vermelho neutro (indicador de pH), faz com que as colónias apresentem uma coloração rosa escuro a vermelho^{11,19}.

1.3.2.11 Meio Campylobacter

É um meio seletivo utilizado para o isolamento de espécies *Campylobacter* (as mais frequentes são o *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*), provenientes de amostras de fezes, e responsáveis por algumas infecções intestinais. O meio possui novobiocina e colistina que inibem as bactérias entéricas Gram-negativo, e contém cicloheximida que inibe grande parte dos fungos¹¹.

O meio é incubado em atmosfera de microaerofilia, à temperatura de 42°C durante 48h.

1.3.2.12 Meio Líquido Tetrionato

É um meio líquido enriquecido que, com adição de iodo e iodeto de potássio, torna-se seletivo para o cultivo de *Salmonella* spp., que pode estar em pequena quantidade na flora intestinal. A solução de iodo é adicionada no caldo no momento da sua utilização, antes de a amostra de fezes ser semeada, inibindo assim a flora comensal intestinal^{18,20}.

O meio é composto por:

- Peptonas >> fornecem nitrogénio, vitaminas, aminoácidos e carbono;
- Sais Biliares >> inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos;
- Carbonato de Cálcio >> neutraliza os ácidos produzidos pela redução do oxíclina.

O enriquecimento seletivo permite aumentar a probabilidade de recuperação de microrganismos exigentes e existentes em pouca quantidade, evitando resultados falsos negativos^{18,20}.

1.3.2.13 Meio Caldo de Carne

É um meio líquido enriquecido que contém extrato de carne bovina, nitrogénio, carbono, vitaminas e aminoácidos, que permitem o crescimento da maioria dos microrganismos. A utilização deste meio tem como objetivo favorecer o crescimento e a multiplicação de microrganismos que possam estar em pequena quantidade, para que depois possam ser semeados em meios sólidos, tornando possível a sua identificação¹¹.

1.3.2.14 Meio Líquido Todd

É utilizado para a cultura de estreptococos β -hemolíticos do grupo B, *Streptococcus agalactiae*. O meio é composto por: peptonas, para um bom crescimento; dextrose, cuja finalidade é estimular a produção de hemolisina, impedindo assim a inativação da mesma pelo meio ácido; antibióticos, gentamicina e ácido nalidixico, que favorecem o isolamento de *Streptococcus agalactiae* de amostras com flora mista^{13,11}.

1.3.2.15 Meio Mueller Hinton (MHE)

Meio não seletivo utilizado para a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, pelo método de difusão em discos ou E-test. O meio MHE é um meio que não possui suplementos e que proporciona um crescimento satisfatório para a maioria dos microrganismos não exigentes.

Contém baixas concentrações de timidina e concentrações definidas de cálcio e magnésio. Variações na concentração destes elementos têm implicação nos resultados obtidos (afecção das concentrações mínimas inibitórias), podendo levar à obtenção de falsos resultados de sensibilidade ou resistência²¹.

1.3.2.16 Mueller Hinton com sangue (MHF)

É uma variante do meio Muller Hinton, enriquecido com sangue de cavalo, que contém β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (β -NAD). É utilizado para testes de suscetibilidade antimicrobiana por difusão, em microrganismos exigentes, como pneumococos e outros estreptococos, *Haemophilus* spp. E *Moraxella* spp¹⁸.

1.3.2.17 Meio Pylori

É um meio seletivo, utilizado para o isolamento da *Helicobacter pylori* proveniente de amostras gástricas. O *H.pylori* é o agente infeccioso responsável por gastroenterites crônicas, úlceras pépticas e duodenais, e alguns tipos de cancro do estômago. Este meio de cultura contém uma combinação de vancomicina, anfotericina B, trimetoprim e cefsulodina, que permite inibir a flora contaminante, sem prejudicar o isolamento da *H. pylori*^{22,23}.

1.3.2.18 Meio Lowenstein-Jensen

Meio seletivo utilizado para o cultivo e isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies de micobactérias. O meio contém verde malaquite, que inibe o crescimento da maioria dos organismos contaminantes, e ovo e glicerol que fornecem os ácidos gordos e proteínas necessários ao metabolismo das micobactérias^{11,24}.

1.3.2.19 Meios de Cultura Cromogénicos

Os meios de cultura cromogénicos são meios diferenciais, que permitem a identificação presuntiva de patógenos importantes, tais como a *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Os meios possuem na sua composição substratos cromogénicos, que ao serem metabolizados pelas bactérias, originam compostos de cores específicas, que permitem a identificação presuntiva¹⁵.

A utilização deste tipo de meios de cultura é um método rápido, preciso, e económico, que não requer testes de confirmação adicionais.

1.3.2.19.1 Meio Granada

Meio seletivo utilizado para a deteção e identificação de estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*). O *S. agalactiae* é agente de infeção grave em recém-nascidos, sendo responsável por quadros de septicemia e meningite. Os recém-nascidos são infetado através da mãe, pelo que uma deteção rápida e adequada do patógeno pode reduzir significativamente as comorbidades associadas a este tipo de infeção^{25,26}.

O meio Granada possui metotrexato, soro de cavalo e amido, que após inoculação e incubação com estirpes β -hemolíticas, estas adquirem cor alaranjada.

1.3.2.19.2 Meio *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

Meio cromogénico seletivo e diferencial para o isolamento e identificação direta de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA).

O meio possui uma mistura de antibióticos/antifúngicos e uma concentração de sal otimizada, que inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, e de leveduras.

A metilina é um antibiótico e o MRSA tende a ser multirresistente, tornando as opções terapêuticas limitadas, sendo por isso uma bactéria difícil de tratar^{27,28}.

O exame cultural tem como objetivo detetar indivíduos colonizados por MRSA, por forma a reduzir a transmissão cruzada de microrganismos resistentes.

1.3.2.19.3 Meio Candida

Meio de cultura seletivo que permite a detecção, isolamento e diferenciação de *Candida spp.* Devido à presença de substratos cromogénicos, é possível a diferenciação da *Candida albicans* (apresenta uma coloração verde) das outras espécies de candida (*Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* e *Candida kefyr*, que apresentam uma coloração rosa)^{14,29}.

1.3.2.19.4 Meio SMAC (meio MacConkey com Sorbitol)

É um meio utilizado para o isolamento de *E.coli* enterohemorrágica O157:H7. O serotipo O157:H7 da *E.coli* está associado a quadros clínicos de diarreia, colite enterohemorrágica grave e Síndrome Hemolítico-Urémico. É possível diferenciar a estirpe O157 das outras estirpes de *E. coli* por estas apresentarem colónias incolores neste meio de cultura. As restantes estirpes de *E. coli*, apresentam colónias de cor rosa^{30,31}.

1.3.2.19.5 Meio Brilliance

É um meio cromogénico, utilizado para a detecção de Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenemos. Os carbapenemos são uma classe de antibióticos β -lactâmicos, de amplo espectro, conhecidos por serem muito eficazes na maioria das infeções causadas por bactérias Gram-negativo. As Enterobacteriaceae têm desenvolvido resistência aos carbapenemos através da produção de carbapenemases. As carbapenemases são β -lactamases com capacidade de inativarem a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Neste contexto, a sua detecção rápida e precoce é fundamental para a implementação de terapêutica adequada, e de medidas de controlo de infeção, que permitam diminuir a disseminação das estirpes produtoras de carbapenemases^{14,32}.

1.3.2.19.6 Meio Manitol Salgado (MSA)

Meio de cultura seletivo e diferencial utilizado para a detecção e isolamento de estafilococos. O meio MSA contém uma alta concentração de cloreto de sódio (7,5%) que inibe a maioria das bactérias Gram-positivo, exceto os estafilococos. Na sua composição contém também manitol e vermelho de fenol, um indicador de pH, que deteta o ácido produzido por estafilococos fermentadores de manitol^{11,33}.

Estafilococos fermentadores de manitol e coagulase-positivo, *Staphylococcus aureus*, desenvolvem colônias amarelas no meio de MSA, enquanto que estafilococos coagulase-negativo, não fermentadores de manitol, desenvolvem colônias rosas ou vermelhas, sem que ocorra alteração da cor do meio^{11,33}.

1.3.3 Tipos de Sementeira e Condições de Incubação

O sucesso da cultura depende da seleção apropriada dos meios, da utilização de condições de assépticas e da escolha e execução correta do tipo de sementeira. Existem diversas técnicas de sementeira em meio sólido, nomeadamente, sementeira por quadrantes ou por esgotamento, em rede, em profundidade ou por meio de incorporação, por inundação. As mais utilizadas na Seção de Microbiologia do CHUCB são a técnica de sementeira por quadrantes (Figura 6), por contagem de colônias (Figura 7) e em rede (Figura 8).

Na técnica de sementeira para contagem de colônias, as placas de *petri* são inoculadas com recurso a uma ansa calibrada estéril de 1 μ L, traçando inicialmente uma estria central na placa. Seguidamente são feitas estrias paralelas à estria central, de forma a inocular toda a superfície da placa. Esta é uma técnica quantitativa que tem como objetivo realizar a contagem de colônias através de uma estimativa do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro de volume inoculado (UFC/ml). Este tipo de sementeira é utilizado nas amostras de urina, esperma e lavados bronco-alveolares (no caso dos líquidos é utilizada uma ansa calibrada estéril de 10 μ L).

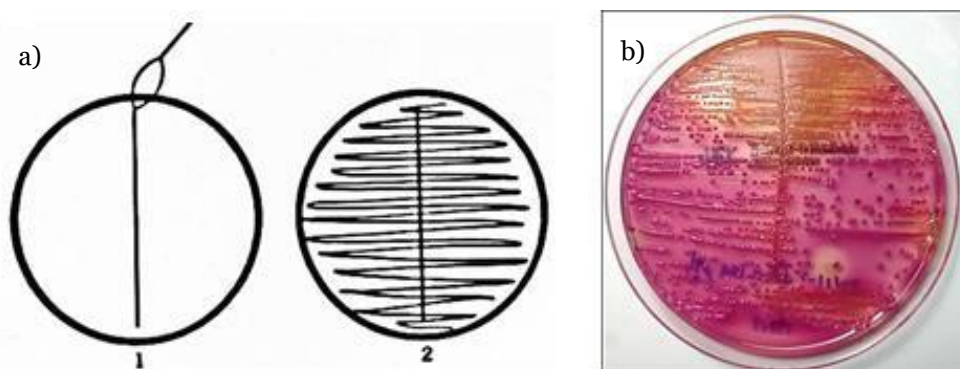


Figura 6- (a) Esquema da técnica de sementeira por contagem de colônias; (b) Uma placa inoculada pela mesma técnica (Retirado de 9)

A técnica de sementeira por quadrantes, ou por esgotamento, é uma técnica semi-quantitativa que permite avaliar se a amostra contém muitas, algumas ou poucas colónias. Esta técnica divide a placa em quatro quadrantes, com o objetivo de obter colónias isoladas no último quadrante. Com uma ansa calibrada estéril de $1\mu\text{L}$ contendo inóculo, são realizadas estrias em zigue-zague no meio de cultura até meio da placa (primeiro quadrante), correspondendo à região com maior concentração de inóculo. Em seguida, sem impregnar a ansa com mais produto, são realizadas estrias no segundo, terceiro e quarto quadrantes, de forma a obter quantidades significativamente menores de produto e, conseqüentemente, colónias isoladas no último quadrante. É importante não cruzar as estrias (não tocar com a ansa na estria anterior), para reduzir o inóculo em cada estria, e assim obter colónias isoladas. Esta técnica é utilizada em quase todos os produtos biológicos, exceto nos produtos onde é executado a técnica de sementeira por contagem de colónias.



Figura 7- (a) Esquema da técnica de sementeira por quadrantes; (b) Uma placa inoculada pela mesma técnica (Adaptado de 34).

A técnica de sementeira em rede é utilizada para a realização de antibiogramas manuais. Nesta técnica é preparada inicialmente uma suspensão bacteriana a 0,5 McF (McFarland), na qual é mergulhada uma zaragatoa, que posteriormente é utilizada para realizar a sementeira, em toda a superfície da placa. Para garantirmos que a sementeira é uniforme em toda a superfície da placa, esta é feita em pelo menos quatro direções diferentes, como ilustrado na Figura 8.

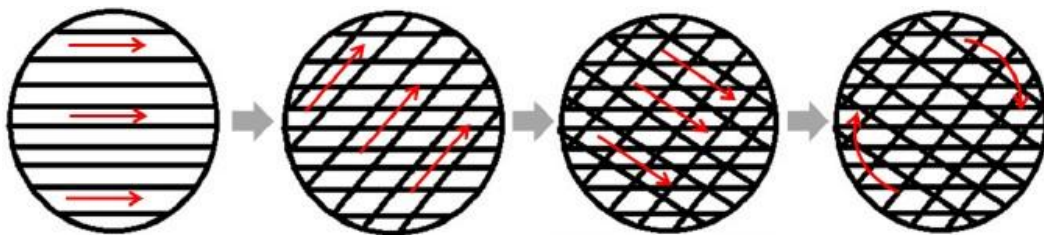


Figura 8- - Esquema de processamento da técnica de sementeira em rede

Após realização da sementeira nos meios de cultura apropriados, as placas são incubadas nas estufas de acordo com o tipo de atmosfera e temperatura necessárias para o desenvolvimento e crescimento dos microrganismos. O laboratório de microbiologia do CHUCB possui três estufas de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, uma estufa de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e uma estufa de $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Tabela 2).

Tabela 2- As estufas utilizadas na SM e as suas respetivas funções

Estufa de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Estufa 1 – para o crescimento de microrganismos aeróbios (21% de O_2 e 0,03% de CO_2).
	Estufa 2 – para o crescimento de microrganismos em atmosfera de CO_2 . As placas são colocadas numa jarra e é adicionado gerador de atmosfera de CO_2 .
	Estufa 3 – para o crescimento de microrganismos que necessitam de atmosfera de anaerobiose. São utilizados geradores de atmosfera de anaerobiose. Nesta estufa também são incubadas placas com o meio pylori, utilizando gerador de atmosfera de microaerofilia.
Estufa de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Utilizada para o crescimento de fungos e das bactérias <i>Yersinia spp.</i> Em atmosfera de aerobiose.
Estufa de $42^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Utilizada para o crescimento de espécies <i>Campylobacter spp.</i> Utilizando geradores de atmosfera de microaerofilia.

1.3.4 Urina

A urina é um líquido biológico estéril até à sua passagem na uretra que, durante a micção, arrasta os microrganismos que a colonizam. As infeções do trato urinário (ITU) são uma das infeções mais frequentes no ser humano, sendo causadas por bactérias que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra.

Os agentes etiológicos mais frequentes nas infeções urinárias são as *Enterobacteriaceae*, sendo a espécie mais prevalente a *E. coli*. São também agentes frequentes de infeções urinárias as espécies de *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*

Para diagnóstico das ITUs, a SM recebe amostras de urinas para exame cultural (urocultura) colhidas assepticamente. São válidas amostras de urinas colhidas pela técnica do jato médio, em saco coletor no caso de crianças e por meio de algaliação. É preferencialmente colhida a primeira urina da manhã ou, se não for possível, depois de duas horas sem urinar. Após realizar a assepsia dos órgãos genitais com soro fisiológico, é desprezado o primeiro jato de urina e é colhido o jato médio, para um recipiente estéril e de boca larga; a restante urina é desprezada.

Após a colheita, as amostras são enviadas de imediato ao laboratório e semeadas em primeiro lugar no meio Mac e depois no meio GS, com recurso a uma ansa de $1\mu\text{L}$, perto do bico de *Bunsen*, pela técnica de contagem de colónias. As placas são incubadas na estufa de 35°C durante 18 a 24 horas. No caso de não ser possível semear as amostras de urina de imediato, estas devem ser conservadas no frio a uma temperatura entre 2 a 8°C .

Após realização do exame cultural, separa-se uma alíquota para um tubo de centrífuga de 10 mL para o exame citológico, que é posteriormente colocado na cadeia de análise de urinas. Na primeira entrada (AutionMax[®]) são colocadas as amostras que tenham pedido de Urina tipo II e urocultura. Na segunda entrada (SediMax[®]), são colocadas as amostras para as quais tenha sido pedido apenas urocultura.

A validação dos sedimentos urinários deve ser feita no Software MenaSoft[®] e confirmado sempre que o equipamento dê indicação de “crowded”. A confirmação será feita após centrifugação da amostra de urina a 2000 rotações por minuto (r.p.m) durante 10 minutos e rejeição do sobrenadante. Coloca-se uma gota do sedimento entre lâmina e lamela e observa-se ao microscópio, com objetiva de 40X, os elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos, bactérias e cristais (de oxalato de cálcio e ácido úrico).

Quando solicitado, após a centrifugação da amostra de urina, rejeição do sobrenadante e concentração da amostra por *citospin*, é preparada uma lâmina para a pesquisa de BAAR. Para o exame cultural de BAAR, é separada uma alíquota da amostra, em frasco de centrífuga de 50 mL e enviada para a secção das Micobactérias. O *citospin* é um tipo de centrifugação que tem como objetivo deixar concentrar os elementos celulares do produto.

Também quando solicitado, é efetuada a pesquisa de *Streptococcus pneumoniae* e *Legionella pneumophila* utilizando um teste rápido imunocromatográfico (ImmuView[®]), que permite a detecção qualitativa dos antígenos destes dois microrganismos, em amostras de urina de doentes que apresentam sintomas de pneumonia.

1.3.5 Aparelho Respiratório

As infecções do aparelho respiratório são uma das patologias mais importantes, quer em meio hospitalar, quer na comunidade. As amostras provenientes do aparelho respiratório são a expetoração, as secreções brônquicas, os lavados e os aspirados brônquicos. A pesquisa de bactérias no aparelho respiratório é dificultada pela facilidade de contaminação das amostras com flora comensal da orofaringe, quando são colhidas. Por isso, ao chegarem ao laboratório, as amostras respiratórias são avaliadas macroscopicamente como purulenta, hemoptóica ou salivares. A par da avaliação macroscópica é feita também uma avaliação microscópica das amostras. São preparados dois esfregaços, um corado com a coloração de Gram, e outro com a coloração de Ziehl-Neelsen. O esfregaço corado com a coloração de Gram serve para avaliação do número de células epiteliais, o número de leucócitos polimorfonucleares e para observação dos microrganismos existentes. As amostras são consideradas produtivas para a realização do exame cultural quando apresentam uma contagem de células inferior a 5 células/campo e uma contagem de leucócitos superior a 20 leucócitos/campo.

O esfregaço corado com a coloração de Ziehl-Neelsen serve para a pesquisa de BAAR.

Quando as amostras são produtivas é realizada a sementeira por quadrantes na câmara de fluxo laminar nos meio GS (incuba em atmosfera de CO₂), MCK e HAE2 (incubam em atmosfera de aerobiose), à temperatura de 35 °C durante 24 a 48h. Para o exame cultural de BAAR, é separada uma alíquota da amostra em um frasco de centrifuga de 50mL e é enviado para a secção de micobactérias.

As amostras de lavados e aspirado brônquicos são sempre semeados e as duas colorações, Gram e Zhiel-Neelsen, são sempre efetuadas. Normalmente são enviadas três amostras de lavado bronco-alveolar: o primeiro frasco é utilizado para a pesquisa de BAAR, o segundo frasco é utilizado para o exame cultural e microscópico, e o terceiro frasco é encaminhado para a secção de hematologia para ser analisado por citometria de fluxo. No caso de enviarem apenas um frasco, este é utilizado para o exame cultural, microscópico e para pesquisa de micobactérias.

Para o exame cultural, a amostra é agitada no vórtex durante 30 a 60 segundos e semeada em meio PVX pela técnica de contagem de colónias com uma ansa calibrada estéril de 10 µL, sendo a placa incubada em atmosfera de CO₂ durante 24 a 48h. Após a sementeira, a amostra é centrifugada a 2000 r.p.m durante 10 min e as lâminas são preparadas a partir do sedimento. É preparada um esfregaço para coloração de Gram, para avaliação do número de células epiteliais, de leucócitos polimorfonucleares e observação dos microrganismos presentes. É também preparado um esfregaço para coloração de Zieh-Neelsen, por *citospin*, para pesquisa de BAAR.

As amostras de aspirado brônquico são centrifugadas a 2000 r.p.m durante 10 min, sendo a sementeira e os esfregaços para as duas colorações, Gram e ZN, efetuados a partir do sedimento. A sementeira é realizada por quadrantes nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂), MCK e HAE2 (incubam a atmosfera de aerobiose).

Quando solicitado é realizada a pesquisa de *M. tuberculosis* por PCR. A pesquisa é efetuada no equipamento GeneExpert® (*Kit* Xpert® MTB/RIF). O Xpert® MTB/RIF é um teste de diagnóstico semi-quantitativo de “*nested*” PCR em tempo real, concebido para a deteção de ADN do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e para a determinação da suscetibilidade a rifampicina, em amostras de doentes com suspeita clínica de tuberculose. Após misturar 1mL da amostra ou 1mL do sedimento, no caso de amostras de soro, com 2mL do “Sample Reagente” fornecido no *Kit*, a amostra é agitada vigorosamente no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após o tempo de incubação, são transferidos 2mL da mistura (utilizando a pipeta fornecida pelo *Kit*) para o cartucho e este é inserido no equipamento de acordo com as instruções da casa comercial.

1.3.6 Cateter Vascular

Antes de retirar o cateter para o exame cultural, deve ser realizado uma colheita sangue para duas garrafas de hemocultura (um frasco de aerobiose e um de anaerobiose), só assim será possível valorizar o exame cultural. A sementeira é realizada por rolamento da ponta do cateter no meio GS pela técnica de *Maki* e a placa é incubada à 35°C em atmosfera de CO₂. Após o rolamento, o cateter é colocado dentro de um frasco estéril e guardado no frigorífico a 2-8°C.

1.3.7 Hemocultura

A grande maioria das doenças infecciosas podem decorrer com bacteriemia transitória, intermitente ou persistente. Como o sangue é um produto biológico estéril, o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é geralmente o agente etiológico da infeção.

A colheita de hemoculturas está indicada em doentes com aumento da temperatura corporal ou com temperatura inferior a 36°C; doentes com leucocitose ou leucopenia; doentes com trombocitopenia ou alterações da coagulação de causa desconhecida; doentes com deterioração uni ou multiorgânica; *shock* ou instabilidade hemodinâmica; em recém-nascido, quando há suspeita de infeção sistémica.

No caso de doentes adultos é colhido sangue para 4 garrafas de hemocultura, 2 garrafas (uma de aerobiose e uma de anaerobiose) colhidas de uma veia periférica do braço direito e 2 garrafas (uma de aerobiose e uma de anaerobiose) colhidas de uma veia periférica do braço esquerdo. No caso dos adultos é necessário inocular um volume de 10mL de sangue em cada frasco de hemocultura. No caso das hemoculturas pediátricas são necessários 3mL de sangue por garrafa.

Após a colheita, as garrafas são enviadas para o SPC e incubadas no equipamento BacT[®]/ALERT 3D à temperatura de 37°C, durante um período de 5 dias. Se após esse tempo de incubação não for detetado crescimento bacteriano na garrafa, a hemocultura é considerada negativa. No fundo de cada frasco de hemocultura existem sensores que mudam de cor quando ocorre alteração do pH, devido ao aumento de CO₂, consequência do crescimento microbiano (Figura 9). O sistema BacT[®]/ALERT 3D mede a cor de 10 em 10 minutos e emite um alerta visual no ecrã tátil para garrafas positivas.

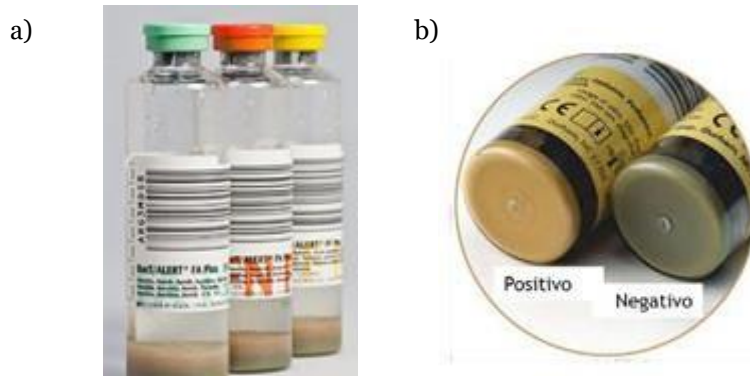


Figura 9- (a) Garrafa de hemocultura de aerobiose (tampa verde), de anaerobiose (tampa laranja) e pediátrica (tampa amarela); (b) Interpretação do seu resultado (Retirado de 14)

Após ser detetada a positividade da garrafa de hemocultura, esta é retirada do incubador, e numa câmara de fluxo laminar a sua tampa é desinfetada com álcool 70%. Após a desinfecção, com recurso a uma seringa, é retirada uma pequena quantidade de amostra e é dispensada uma gota em cada meio de cultura sólido e numa lâmina.

Das garrafas de hemocultura em aerobiose ou das garrafas de hemocultura pediátricas é realizada sementeira por quadrantes nos meios GS (incuba em atmosfera de CO_2), MCK (incuba em atmosfera de aerobiose), e é preparado um esfregaço para a coloração de Gram. Ambos os meios de cultura incubam durante 24 a 48h, à 35°C .

Das garrafas de hemocultura em anaerobiose é realizado a sementeira por quadrantes nos meios GS (incuba em atmosfera de anaerobiose) e PVX (incuba em atmosfera de CO_2), e é preparado um esfregaço para ser corado com a coloração de Gram. Ambos os meios de cultura incubam durante 48 a 72h, à 35°C .

As hemoculturas identificadas como positivas pelo equipamento, que não apresentem crescimento nos meios de cultura sólidos, mas que tenham um Gram sugestivo, são incubadas na estufa e deverão ser passadas novamente ao 5º dia após a colheita, com repetição do Gram, e ao 7º dia após a colheita, também com repetição do Gram.

1.3.8 Fezes

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com elevada morbidade em determinados grupos etários (crianças e idosos). Nas amostras de fezes os testes mais solicitados são o exame cultural (coprocultura), o exame parasitológico, a pesquisa de vírus e a pesquisa de sangue oculto.

1.3.8.1 Exame Cultural (Coprocultura)

A coprocultura só é realizada em amostras diarreicas (fezes que se moldam ao contentor), colhidas em 3 dias sucessivos. São rejeitadas amostras de fezes moldadas e de doentes internados há mais de 72h, sendo exceção apenas os doentes imunocomprometidos (ex.: com HIV).

A sementeira é realizada por quadrantes, perto do bico de *Bunsen*, nos meios MCK, YER, CAM, SS, meio líquido de oxitetraciclina e SMAC (apenas em amostras de crianças com idade ≤ a 5 anos). Os meios MAC, SS e SMAC são incubados durante 24h, a 35 °C em atmosfera de aerobiose. O meio líquido de oxitetraciclina é incubado durante 6 horas a 35°C. No fim deste período faz-se uma subcultura para o meio de cultura de SS. O meio YER é incubado durante 24 a 48h a 30°C e o meio CAM é incubado durante 48h em atmosfera de microfilia a 42°C.

1.3.8.2 Exame Parasitológico

No exame parasitológico é realizada a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp., por um teste imunocromatográfico que deteta em simultâneo os antígenos de ambos os géneros. A criptosporidiose é uma patologia que causa diarreia aquosa, e que é provocada pelos parasitas gastrointestinais do género *Cryptosporidium*. Estes parasitas estão protegidos por uma cápsula exterior que lhe permite sobreviver fora do corpo do hospedeiro por longos períodos, tornando-os resistentes a desinfetantes à base de cloro.

A giardíase é também uma patologia que provoca diarreia aquosa, e é causada pelos parasitas flagelados do género *Giardia*. O desenvolvimento de giardíase está associado com a ingestão de água contaminada, propagação pessoa-pessoa e viagens recentes a países onde existe elevada prevalência do parasita⁹.

Os testes imunocromatográficos para identificação destes parasitas contêm uma membrana pré-revestida com anticorpos monoclonais contra antígenos de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Durante o teste, a amostra move-se por capilaridade e no caso de um resultado positivo, os anticorpos específicos presentes na membrana ao reagirem com os conjugados da mistura, vão gerar uma ou duas linhas coloridas. Uma linha de cor verde deve aparecer sempre na linha de controlo e serve para verificar se foi adicionado volume de amostra suficiente, se foi obtido fluxo adequado e como controlo interno para os reagentes^{35,36}.

A amostra também é processada para o exame microscópico para pesquisa de parasitas. É retirada uma porção da amostra de fezes, a qual é adicionada a uma solução tampão. Seguidamente é feita uma centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante é descartado e o sedimento é utilizado para ser visualizado ao microscópio.

1.3.8.3 Pesquisa de Microrganismos nas Fezes

Quando solicitado é realizada nas fezes a pesquisa de rotavírus, adenovírus, norovírus e *Clostridium difficile*. Todos os testes são imunocromatográficos qualitativos. No caso de o resultado se positivo, não se realiza coprocultura.

O rotavírus e o adenovírus são os agentes mais comuns de gastroenterite grave em bebês, crianças e também em adultos. A transmissão ocorre por via fecal-oral e os principais sintomas da gastroenterite viral são a diarreia aquosa e vômitos⁹. A SM do SPC utiliza o teste “CERTEST® Rotavírus + Adenovírus”, para a detecção qualitativa e simultânea de rotavírus e adenovírus em amostras fecais. O teste possui duas tiras em que cada uma contém uma membrana de nitrocelulose fixada com anticorpos monoclonais contra a rotavírus (tira A) e adenovírus (tira B).

Os norovírus são vírus pequenos, de estrutura redonda que possuem um único filamento de RNA. Estes vírus constituem uma das principais causas de gastroenterites virais, principalmente em crianças, onde a taxa de incidência é elevada. A doença instala-se após a ingestão de alimentos e água contaminados⁹. A presença de norovírus é pesquisado pelo teste “RIDAQUICK® Norovirus”.

O *C. difficile* é uma bactéria anaeróbica oportunista que cresce no intestino devido a alteração da flora comensal, causada pelo uso de antibióticos. É utilizado o teste “C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®” para a detecção simultânea do antígeno glutamato desidrogenase, confirmando a presença do *C. difficile* em amostras fecais, e das toxinas A e B confirmando a presença de *C. difficile* toxicogénico, num único poço (40,41).

Quando solicitada a pesquisa de adenovírus e rotavírus, no caso de estas serem negativas é sempre realizada a pesquisa de norovírus, mesmo que não tenha sido solicitada pelo médico. Da mesma forma, no caso de a pesquisa de um dos vírus ser positiva, não é efetuada a pesquisa de norovírus. O mesmo acontece no caso de ser solicitada a pesquisa de *C. difficile*/Adenovírus, Rotavírus e o exame cultural, primeiro é realizada a pesquisa *C. difficile*/Adenovírus, Rotavírus e apenas no caso de serem negativos que é realizado o exame cultural.

1.3.9 Líquidos Biológicos

Os líquidos biológicos mais frequentemente enviados à SM são o líquido pleural, o líquido ascítico, o líquido sinovial/articular e o líquido cefalorraquidiano (LCR).

Quando os líquidos dão entrada no SPC, com exceção para o LCR, é registado o tipo de colheita que foi realizado. Isto é, se o produto veio em uma garrafa de hemocultura ou em contentor asséptico. Se a amostra for colhida para um contentor asséptico e se a quantidade for suficiente, são inoculados entre 1 e 3mL de líquido numa uma garrafa de hemocultura pediátrica que é colocada no equipamento BacT/Alert 3D. Se o volume for insuficiente, são inoculadas uma a três gotas de amostra em caldo de carne.

O exame cultural e as lâminas para a coloração de Gram e de ZN (se houver pedido de pesquisa para BAAR), são realizados a partir do sedimento, com a exceção do líquido pleural, em que as duas colorações são sempre efetuadas.

Nas amostras de **líquido pleural** a sementeira é realizada por quadrantes, nos meios GS (incuba a atmosfera de CO₂), HAE2 e MCK (incubam ambos em atmosfera de aerobiose), a 35°C durante 24h. As amostras de **líquido ascítico** são semeadas usando a técnica de sementeira por quadrantes, nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba a atmosfera de aerobiose), 35°C durante 24 h. Nas amostras de **líquido sinovial e líquido articular** o exame cultural é realizado pela técnica de sementeira por quadrantes nos meios GS, VCAT (incubam em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba a atmosfera de aerobiose), todos os meios incubam a de 35°C durante 24 h.

Quando solicitado, é realizada a pesquisa de micobactérias por PCR, e é separada uma alíquota da amostra para a realização do exame cultural de BAAR.

Nas amostras de **LCR**, colhidas por punção, é realizado o exame citológico, microscópico e cultural para confirmar o diagnóstico de meningite bacteriana. As amostras de LCR devem ser processadas imediatamente a seguir à sua colheita, pois alguns dos microrganismos que possam estar presentes são lábeis. Exemplos destes microrganismos são a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae*⁵. Devem chegar à SM três tubos contendo a amostra. O primeiro tubo é utilizado para os estudos bioquímicos e imunológicos, o segundo tubo é utilizado para o estudo microbiológico, o terceiro tubo é utilizado para a contagem celular e diferencial.

O exame citológico é realizado na câmara de contagem de *Nageotte* por um médico patologista, para avaliação da celularidade da amostra.

É realizado um teste de biologia molecular, PCR multiplex em tempo real, para pesquisa simultânea de bactérias, vírus e fungos na amostra.

Se o volume da amostra for suficiente, são inoculados 1 a 3 mL da mesma numa garrafa de hemocultura pediátrica. Se a quantidade de amostra for inferior a 1 mL, é inoculada em caldo de carne.

Para realizar o exame cultural, a amostra de LCR deve ser centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. Se houver volume suficiente de amostra; o sobrenadante é desprezado e processa-se o sedimento. A sementeira é realizada por quadrantes na câmara de fluxo laminar nos meios GS, PVX, Sabouraud, MCK e em meio de Lowenstein. São preparadas duas lâminas para a coloração de Gram e ZN. O restante volume da amostra deve ser guardado a 35°C na estufa.

1.3.10 Pus

As amostras de pus podem ser enviadas ao laboratório em meio portagerme ou em zaragatoas. O portagerme é um frasco estéril que contém um gel que permite verificar se durante o transporte houve contaminação da amostra com oxigênio. O gel é de cor transparente e se houver contato com o oxigênio muda para a cor azul¹⁴.

Para as amostras de pus enviadas em portagerme, antes de realizar o exame cultural (por quadrantes), a tampa do frasco é desinfetada na câmara de fluxo laminar com álcool 70%. A amostra é retirada do frasco com uma seringa e é dispensada uma gota no caldo de carne e nos meios GS (incuba em CO₂ a 35°C), MCK, GS (incuba em anaerobiose a 35°C). Para o exame microscópico, é preparada uma lâmina para a coloração de Gram.

Se a amostra de pus for colhida em zaragatoa, devem ser enviadas ao laboratório duas zaragatoas, uma zaragatoa seca e outra contendo meio de transporte. A zaragatoa seca é colocada em caldo de carne e é realizado o exame cultural com a zaragatoa enviada em meio de transporte. O exame cultural é realizado na câmara de fluxo laminar utilizando a técnica de sementeira por quadrantes. Inicialmente é realizado o inóculo com a zaragatoa e em seguida a sementeira é realizada com recurso a uma ansa, nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba em aerobiose a 35°C). Após a sementeira, a zaragatoa contendo o meio de transporte é utilizada para fazer um esfregaço para a coloração de Gram.

Caso sejam enviadas apenas zaragatoas secas, estas são colocadas em caldo de carne e após 24h de incubação em aerobiose, a 35°C, é realizado o exame cultural.

1.3.11 Biópsia

As biópsias são reduzidas a pequenos fragmentos com o auxílio de um bisturi, e a sementeira dos mesmos é realizada por quadrantes, na câmara de fluxo laminar, nos meios GS (incuba em atmosfera de CO₂) e MCK (incuba em aerobiose). A par das sementeiras, é colocado um fragmento da amostra a inocular em caldo de carne. São preparadas duas lâminas, uma para a coloração de Gram e outra para a coloração de ZN (se houver pedido de pesquisa de BAAR).

Caso não seja possível cortar a biópsia em pequenos fragmentos, esta deve ser colocada em caldo de carne.

1.3.12 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente

A pesquisa de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) é realizado através de uma amostra de exsudado nasal colhida com recurso a uma zaragatoa. É realizado o exame cultural no meio cromogénico MRSA. O inóculo é feito através da utilização da zaragatoa com a qual se colheu a amostra e em seguida, com uma ansa de 1 µL, é realizada a sementeira por quadrantes, perto do bico de *Bunsen*. A zaragatoa é colocada em meio líquido Todd-Hewitt, que incuba a 35 °C. Caso o exame cultural seja negativo passadas 24 horas, inocula-se um novo meio de MRSA com o meio líquido.

1.3.13 Pesquisa *Streptococcus agalactiae*

A pesquisa de *S. agalactiae* é realizada por rotina em grávidas, às 34/35 semanas de gravidez, sendo aconselhável realizar até às 37 semanas de gravidez. Para esta pesquisa são necessárias duas zaragatoas, uma vaginal e uma retal. Ambas as zaragatoas são colocadas em meio líquido Todd-Hewitt, na estufa a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, o meio líquido é repicado para meio Granada e coloca-se uma lamela sobre a sementeira. Este meio incuba em atmosfera de anaerobiose à temperatura de 35 °C. Caso o *S. agalactiae* se encontre presente na amostra são visualizadas colónias de cor laranja no meio Granada.

1.3.14 Espermocultura

Na amostra de esperma é realizado primeiramente o exame citológico, depois o exame cultural (espermocultura), em seguida a pesquisa de *Chlamydia/Neisseria* e, por fim, a pesquisa de *Mycoplasma/Ureaplasma*. O **exame citológico** deve ser realizado de imediato após a chegada do produto à SM, através do exame a fresco entre lâmina e lamela para avaliar o número de células epiteliais e de leucócitos presentes e para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. Simultaneamente é preparado um esfregaço para ser corado com a coloração de Gram.

No **exame cultural**, a sementeira é realizada, na câmara de fluxo laminar com recurso a uma ansa de 10µL, pela técnica de sementeira por contagem nos seguintes meios de cultura:

- GS (incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C, durante 24 a 48h), sendo valorizado o crescimento de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corinebacterium* spp., Esterobacteriáceas, *Pseudomonas* spp. E outros BGN não fermentadores;
- VCAT (incuba em atmosfera de CO₂ a 35°C, durante 48 h), sendo valorizado o crescimento de *Haemophilus* spp. E *Neisseria* spp.;
- Candida (incuba a 30°C, durante 24 h);
- MCK (incuba a 35°C, durante 24h).

A pesquisa de *Chlamydia/Neisseria* é realizada por PCR no equipamento automatizado GeneExpert®, é feita uma alíquota de 100 µL de amostra à qual é adicionado 900 µL de meio de cultura MEM (*Minimum Essential Medium*). Após agitar no vórtex, a amostra é colocada no equipamento ou congelada, se não for processada de imediato. O MEM é um meio de cultura que contém concentrações elevadas de nutrientes essenciais e que, neste caso, tem a função de estabilizar o pH, permitindo a conservação da amostra, de forma a que as bactérias não morram. A pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureoplasma* spp. É efetuada numa galeria que permite simultaneamente a identificação, a contagem de colónias destas estirpes e a determinação da sensibilidade a 9 antibióticos (doxiciclina, josamicina, ofloxacina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, axitromicina, claritromicina, pristinamicina).

A presença de substratos específicos (ureia para *Ureoplasma* spp. E arginina para *Mycoplasma homini*) e de um indicador (vermelho de fenol) permite, em caso de cultura positiva, visualizar uma mudança na cor do caldo, consequência da elevação do pH.

No que se refere ao processamento das amostras, inicialmente são colocados 200 µL da amostra no frasco Mycoplasma R1 que vem no Kit e, após homogeneização, são transferidos 3 mL dessa mistura para o frasco Mycoplasma R2. O frasco Mycoplasma R1 é composto por um caldo que contém elementos nutritivos estáveis, necessários para a preparação da amostra, e que assegura a seleção de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, e permite a reconstituição do reagente Mycoplasma R2. O frasco Mycoplasma R2 contém caldo de Ureia-Arginina sob forma liofilizada. Após a adição da mistura do frasco R2, o conteúdo é agitado no vórtex e distribuído pelas 22 cúpulas, na proporção de 55 µL por cúpula. Em seguida, são adicionadas duas gotas de óleo de parafina a cada cúpula. A galeria é colocada em incubação durante 24 e 48h a 36°C ± 2°C. A positividade é indicada pela mudança de cor do meio (passagem de amarelo para rosa escuro/vermelho). O poço 1 (controlo) deve ter uma ligeira alteração de cor: este fica rosa escuro/vermelho, para validar os testes como positivos. Caso não haja alteração de cor (este ficar amarelo) os testes são considerados negativos. É realizada a leitura do antibiograma apenas se a deteção de Micoplasma e/ou Ureoplasma for positiva. A estirpe é considerada sensível se as duas cúpulas (a de cima e a de baixo) continuarem amarelas; intermédia se uma continuar amarela e a outra mudar para rosa; resistente se as duas cúpulas mudarem para a cor rosa (Figura 10).



Figura 10- Galeria para deteção de *Mycoplasma* e *Ureoplasma* (Biomerieux®)

1.3.15 Visualização da Bancada

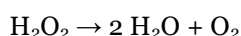
As amostras são entregues no laboratório, são processadas de acordo com o tipo de produto e incubadas nas diferentes estufas, de acordo com o tipo de atmosfera necessária. No dia seguinte, a primeira tarefa realizada na SM é a “preparação da bancada” (disposição das placas de *petri*, semeadas no dia anterior, para observação de crescimento/ausência de crescimento bacteriano). Na SM a bancada é organizada por produtos semeados, pela seguinte ordem: urinas, produtos respiratórios, hemoculturas, pús e outros produtos biológicos, coproculturas e, por fim, os controlos de qualidade internos e externos. De acordo com a observação de cada placa é determinado os passos seguintes, nomeadamente: se ainda não houver crescimento suficiente as placas são deixadas em incubação por mais 24h; se tiver havido contaminação da amostra, é solicitado uma nova colheita; se forem visualizadas diferentes tipos de colónias, é realizado o isolamento das mesmas, por forma a obter culturas puras dos diferentes agentes de infeção; no caso de se observar o crescimento de apenas um tipo de colónia (cultura pura), é realizada a identificação do microrganismo e o perfil de suscetibilidade/resistência aos antimicrobianos (antibiograma). Nas urinas é sempre realizada a identificação dos microrganismos e respetivos antibiogramas se nos meios de cultura tiver crescido até dois microrganismos. Uroculturas nas quais ocorre crescimento de mais de dois microrganismos são consideradas polimicrobianas, e não se prossegue o estudo. No caso dos pús, são estudados até três microrganismos.

1.3.16 Provas Para a Identificação Presuntiva de Microrganismos

As provas bioquímicas são ferramentas importantes na identificação presuntiva dos microrganismos. A generalidade das provas baseiam-se na capacidade dos microrganismos utilizarem enzimas, cujo produto final da reação permite ajudar na sua identificação.

1.3.16.1 Prova de Catalase

A catalase é uma enzima intracelular encontrada na maioria dos microrganismos cuja função é proteger os tecidos contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A catalase decompõe o peróxido de hidrogénio em oxigénio (O_2) e água (H_2O). Neste processo, ocorre libertação de oxigénio que é pela observação de bolhas de ar^{13,11}.



A prova da catálase é uma prova bioquímica simples que permite a distinção entre as bactérias Gram-positivo do género *Streptococcus* (catalase negativa), das bactérias Gram-positivo dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria* (catalase positiva) (Figura 11).

Na rotina da SM esta prova é realiza da seguinte forma: é colocada uma gota do reagente ID-catalase numa lâmina e com uma ansa estéril são colocadas uma a duas colónias, que são

misturadas com o reagente. Se o teste for positivo, ocorre a formação de bolhas devido à libertação de O₂ (*Staphylococcus*), e se o teste for negativo, não há formação de bolhas (*Streptococcus*). Na realização desta prova, deve-se ter o cuidado de não contaminar a ansa com o meio GS, pois a presença de fragmentos do meio de cultura pode levar a resultados falsos positivos, uma vez que este meio possui na sua composição a enzima catalase.



Figura 11- Formação de bolhas em bactérias que possuem a enzima catálase (Retirado de 37)

1.3.16.2 Prova de Coagulase

A coagulase é uma proteína com atividade similar à protrombina, capaz de converter o fibrinogénio em fibrina. O teste permite verificar a capacidade dos microrganismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo¹¹. A prova permite distinguir o *Staphylococcus aureus* das outras espécies de estafilococos, por ser a única espécie *Staphylococcus* coagulase positiva que é patogénica para o Homem³⁸.

Na prova da coagulase em lâmina é utilizado um reagente comercial constituído por partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais dirigidos para *S. aureus*. Na lâmina, são misturadas algumas colónias do microrganismo com uma gota do reagente comercial. Se após 10 segundos se observar aglutinação o resultado é positivo. Sempre que se obtiver um resultado positivo é necessário realizar um controlo para garantir que não ocorreu autoaglutinação. O kit comercial possui um controlo negativo e o procedimento é o mesmo que o realizado para o “reagente teste”. Se o controlo não aglutinar, confirma-se que o microrganismo é *S. aureus*; caso no “teste controlo” verificar aglutinação, o resultado deve ser indicado como “indeterminado”.

1.3.16.3 Prova da Oxidase

A prova da oxidase permite distinguir cocos Gram-negativos do género *Neisseria* e do género *Pseudomonas*, que são oxidase positiva, de outros bacilos Gram-negativos oxidase negativa, pertencentes ao género *Enterobacteriaceae*. A prova de oxidase é um procedimento rápido e qualitativo, que permite determinar a presença ou ausência de atividade da oxidase no citocromo C das bactérias⁵.

Na realização da prova é utilizada uma tira de teste impregnada com p-fenilenodiamina, para a qual são transferidas e emulsionadas na superfície da tira, uma ou duas colónias da estirpe a ser estudada. Os microrganismos que contêm o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória

são positivos para a oxidase, cuja atividade da enzima é observada pelo desenvolvimento de uma coloração púrpura na tira teste.

1.3.16.4 Teste da Optoquina

O teste de sensibilidade ao antibiótico optoquina permite fazer uma distinção presuntiva entre as estirpes α -hemolíticas de *Streptococcus pneumoniae*, sensíveis à optoquina, de outras estirpes de *Streptococcus* α -hemolíticos, resistentes à optoquina.

Este teste é realizado num meio de cultura sólido GS, em que após a sementeira é colocado um disco de optoquina, contendo 5 μ g do antibiótico, e incuba durante 24 horas a 35°C. Se após o período de incubação se observar uma zona de inibição de crescimento em torno do disco, ou seja, a presença de um halo de inibição ≥ 14 mm, assume-se que se estamos perante uma estirpe de *S. pneumoniae* (Figura 12).

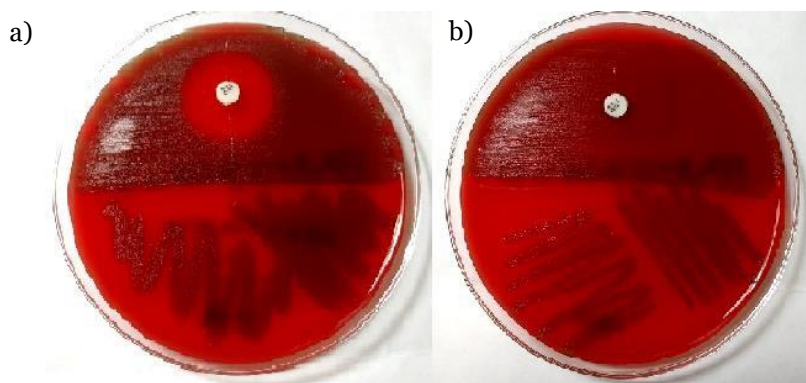


Figura 12- (a) Meio gelose de sangue com uma zona de inibição em torno do disco; (b) um teste negativo de optoquina (não se observa halo de inibição).

1.3.16.5 Teste dos Fatores V, X e VX

Este teste permite realizar a identificação do microrganismo *Haemophilus influenzae*. Para este microrganismo crescer em cultura é necessário a presença dos fatores de crescimento X e V. Neste teste é utilizado um meio de Muller Hinton, que não contém os fatores.

O meio Muller Hinton é inoculado por sementeira em rede e de seguida são colocados os discos dos fatores de crescimento V, X e VX. Os discos devem ser dispostos de forma a formarem um “triângulo”, ligeiramente afastados uns dos outros, para que não ocorra sobreposição dos fatores. As placas incubam durante 24 horas a 35 °C. Se após a incubação for possível visualizar crescimento microbiano apenas à volta do disco XV, é identificado o microrganismo *H. influenzae*. Se o crescimento microbiano apenas ocorrer à volta dos discos XV e V é identificado o microrganismo *H. parainfluenzae*.

1.3.17 Confirmação da Resistência à Colistina

A colistina é um antibiótico de última linha terapêutica, com elevada toxicidade, que é utilizado em infecções por bactérias Gram-negativo multirresistentes. A resistência e sensibilidade à colistina são sempre confirmadas por determinação da MIC, pelo método de microdiluição em meio líquido.

Para a realização da microdiluição em meio líquido é preparada uma suspensão bacteriana, numa solução salina, com uma concentração de 0,5 McFarland. Desta suspensão bacteriana são retirados 50 µL, que são inoculados em meio Mueller Hinton líquido. Do meio Mueller Hinton inoculado com a suspensão bacteriana são retirados 100 µL, que são colocados numa galeria de poços, com diferentes concentrações de colistina. A galeria incuba em aerobiose, a 35 °C durante 24 horas. Após incubação, observa-se se existe turvação nos diferentes poços. A presença de turvação indica que houve crescimento bacteriano e, conseqüentemente, que a estirpe estudada é resistente CIM presente nesse poço.

1.3.18 Tipagem de *Streptococcus* β-hemolíticos

Para a tipagem de estreptococos β-hemolíticos é utilizado um teste rápido de aglutinação (SSI® Streptococcus Latex Group Kit), que permite identificar os microrganismos *Streptococcus* β-hemolíticos dos grupos A, B, C, D, F e G da classificação de Lancefield. Os microrganismos *Streptococcus* β-hemolíticos contêm antígenos específicos, que após a sua extração reagem com os anticorpos presentes nos diferentes anti-soros, permitindo assim identificar o serogrupo a que pertencem. Os anti-soros são constituídos por anticorpos específicos de cada serogrupo, conjugados com partículas de látex. Quando ocorre interação dos antígenos com os anticorpos correspondentes ocorre aglutinação, visível macroscopicamente, que determina um resultado positivo para um determinado serogrupo.

1.3.19 Identificação e Antibiograma de Microrganismos

A identificação dos microrganismos e a sensibilidade aos antibióticos são realizados no equipamento VITEK® (Figura 13). Neste equipamento são utilizadas cartas descartáveis, com diferentes painéis de antibióticos, que são inoculadas com a estirpe a ser estudada. Esta metodologia tem como vantagens a redução do tempo de processamento e a obtenção de resultados em pouco tempo (de 5 à 8h).

As cartas de identificação possuem poços com determinados elementos bioquímicos (açúcares), que quando são fermentados pelo microrganismo originam a alteração da cor do poço. O *software* do equipamento atribui um bionúmero que identifica a espécie e a subespécie do microrganismo com base nos diferentes tipos de substratos fermentados¹⁴.

As cartas de antibiograma possuem micro-poços com concentrações padronizadas de vários antibióticos/antifúngicos, possibilitando a determinação da concentração mínima inibitória (MIC), pelo método da estimativa por microdiluição em concentrações pré-definidas e análise em gráficos. O crescimento microbiano é detetado pela turvação do poço e é indicativo de resistência ao antibiótico.

As cartas de antibiograma, ou antifungigrama conforme o microrganismo em estudo, possuem nos seus poços diversos antibióticos/antifúngicos com diferentes concentrações, permitindo identificar que substâncias ativas são eficazes no tratamento da infecção provocada por determinado microrganismo.

O equipamento *VITEK*® possui um leitor/incubador onde se encontram as cartas inoculadas, num ambiente com temperatura controlada. Este leitor/incubador é composto por sensores fotométricos que realizam leitura dos diferentes poços de hora a hora, detetando as alterações na cor e na turvação¹⁴.



Figura 13– (a) Equipamento Vitek® 2 Compact; (b) Cartas para identificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos (Retirado de 39).

Para a identificação dos microrganismos e respetivos perfis de resistência/sensibilidade aos antibióticos é preparada uma suspensão bacteriana, a partir de colónias puras, com concentrações de McFarland, de acordo com o microrganismo em estudo.

Na SM existem diferentes tipos de cartas para a identificação e estudo de sensibilidade aos antibióticos (Tabela 3).

Tabela 3- Diferentes tipos de cartas para a identificação e estudo de sensibilidade aos antibióticos

Cartas para Identificação	Cartas para Teste de sensibilidade
Bacilos Gram-Negativos (Enterobactérias e não fermentadores) Suspensão bacteriana = 0.55 – 0.65 McF	AST-N355 para bactérias aeróbicas Gram-negativo oxidase negativa AST-N373 para bactérias aeróbicas Gram-negativo oxidase positiva
Cocos Gram Positivos (Enterococos, estreptococos e estafilococos) Suspensão bacteriana = 0.55 – 0.65 McF	AST-P648 para bactérias Gram-Positivo catalase positiva AST-P586 para bactérias Gram-Positivo catalase negativa AST ST03 para <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S.pneumoniae</i> , <i>S.pyogenes</i> e <i>Streptococcus</i> do grupo <i>viridans</i>
Leveduras Suspensão bacteriana = 1.8 – 2.2 McF	AST YSo8
<i>Neisseria</i> / <i>Haemophilus</i> / <i>Campylobacter</i> / Suspensão bacteriana = 2.9 – 3.3 McF	
Bactérias Anaeróbias microaerofilicas/ corinebactérias/ lactobacilos Suspensão bacteriana = 2.7 – 3.3 McF	

Na suspeita de um bacilo Gram-positivo são dispensados 3 mL de uma solução salina em cada tubo (um para identificação e outro para teste de sensibilidade). Para a identificação é preparado uma suspensão bacteriana de 0.55 – 0.65 McF. Depois, a partir da suspensão e com uma ansa estéril de 1 µL, é feita uma sementeira em meio de GS, e transferidos 145 µL da suspensão para o tubo que será utilizado para fazer o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. São colocadas as devidas cartas em cada tubo e o suporte é colocado dentro da câmara de vácuo (FILLER) do Vitek®. Após o término do ciclo de inoculação dos cartões, os suporte contendo as cassetes é removida e colocada na porta LOADER. Depois do sinal sonoro, o suporte agora sem as cassetes é removido e, por fim é realizado a identificação através da leitura do código de barra do paciente/amostra correspondente.

Diariamente é realizado um controlo de esterilidade da solução salina (controlo interno). Este controlo faz-se através da inoculação de placas de GS com a solução salina e, após 24 horas de incubação a 35°C, observa-se a placa e verifica-se se houve ou não crescimento bacteriano.

Quando não há padronização e/ou carta comercial para realizar o antibiograma de determinado microrganismo no equipamento VITEK®, o estudo de suscetibilidade aos antimicrobianos é realizado manualmente. Nos antibiogramas manuais é utilizado o meio MHE ou o meio MHF, e, tal como nas cartas de antibiograma comerciais, os antibióticos a testar devem ser escolhidos de acordo com o seu espectro de ação e as suas propriedades farmacocinéticas. A preparação da suspensão bacteriana é realizada do mesmo modo que descrito acima. O meio é inoculado com

uma zaragatoa embebida na suspensão bacteriana e a sementeira é realizada em rede. Seguidamente, os discos dos antibióticos em estudo são colocados na superfície da placa de agar, com alguma distância entre si, de modo a não ocorrer interferência dos halos de inibição. A interpretação dos halos de inibição é feita com base em halos de inibição standard definidos para concentração inibitória mínima (MIC) específicas de cada substância ativa estudada (Figura 14).

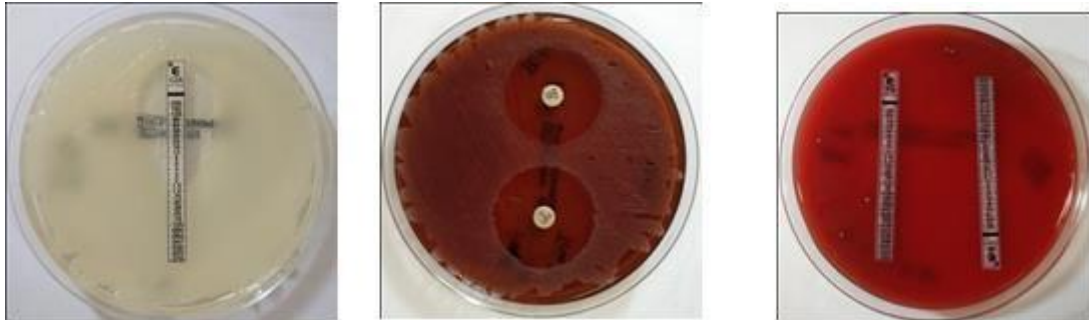


Figura 14– Antibiogramas manuais com antibióticos no formato de disco e fita

1.3.20 Serologia

Na secção de microbiologia também são realizados os testes serológicos para a pesquisa de *Salmonella*, *Brucella abortus* e do vírus Epstein-barr.

1.3.20.1 Teste de Rosa de Bengala

O teste Rosa de Bengala é um teste destinado à triagem serológica da brucelose. A brucelose é uma doença infecciosa de origem animal, causada por um cocobacilo Gram-negativo do género *Brucella*, cuja a contaminação humana ocorre por ingestão de leite proveniente de animais contaminados⁴⁰.

O teste consiste em colocar o soro do paciente em contato com um ácido tamponado, corado de Rosa Bengala. No caso de a amostra possuir anticorpos específicos contra o agente da brucelose, desenvolve-se uma reação de aglutinação, visível a olho nu, de intensidade variável⁴¹.

O teste Rosa de Bengala é um teste de rastreio que permite uma resposta precoce. Os casos reativos devem ser confirmados por outro teste sorológico mais específica (Wright).

1.3.20.2 Teste de Wright

É um teste confirmatório, que só é realizado quando o teste de Rosa de Bengala é reativo. O teste de Wright permite o diagnóstico das formas agudas da brucelose. É uma reação de aglutinação que utiliza, como antigénio, uma suspensão de *Brucella*, inativadas por formol e pelo calor. Um título superior ou igual a 1/80 (120 U.I./ml) indica brucelose ativa, um título mais baixo (1/40 até 1/20) indica forte suspeita⁴².

1.3.20.3 Teste de Widal

É um teste serológico presuntivo que permite diagnosticar a febre tifoide e paratifoide, cujos agentes etiológicos são a *Salmonella typhi* e a *S. paratyphi*, respetivamente. O teste baseia-se numa reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro do doente e os antígenos O (somático do grupo D), H (flagelar) e B (flagelar) da bactéria, presentes no reagente⁴³.

Este teste destina-se à quantificação do título de anticorpos contra a *S. typhi* H, *S. typhi* O e *S. paratyphi* B, em soro humano. Se o resultado do teste serológico apresentar um título de Ag O elevado (>1:160) estamos perante uma infeção ativa; caso o título serológico do Ag H for elevado (>1:160) estamos perante uma situação de imunização ou de uma infeção prévia⁵.

1.3.20.4 Monoteste

É um teste rápido que permite a determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos heterófilos, no soro de doentes com suspeita de mononucleose infecciosa (MI). A MI é uma patologia infecciosa aguda causada pelo vírus Epstein-Barr (EBV)⁴⁴.

O reagente comercial é uma suspensão de partículas de látex cobertas com o antígeno de Paul-Bunnell, que permite visualizar a reação antigénio-anticorpo. Se anticorpos heterófilos de MI estiverem presentes na amostra, a suspensão de látex perde o seu aspeto homogéneo, evidenciando-se uma clara aglutinação.

1.3.21 Controlo de Qualidade

Semanalmente e mensalmente é realizado, respetivamente, o controlo de qualidade interno (CQI) e o controlo de qualidade externo (CQE). Os controlos de qualidade têm como objetivo garantir a qualidade, reprodutibilidade, e fiabilidade dos procedimentos e dos resultados obtidos.

Todas as semanas são realizados os procedimentos que permitem fazer a identificação de um microrganismo, utilizando estirpes comerciais. São realizados todos os processos para chegar à identificação da espécie, como se fosse uma amostra de um doente. As estirpes comerciais vêm numa ansa, que é colocada em caldo de carne, e após 24h é realizada a sementeira em meio sólido de acordo com o tipo de microrganismo. O laboratório de microbiologia normalmente tem 5 amostras de diferentes microrganismos, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. O CQI avalia as diferentes fases do processo analítico até à obtenção dos resultados.

Ao contrário do CQI, em que sabemos a espécie do microrganismo, no CQE a espécie do microrganismo a estudar não é conhecida. No CQE utilizado em microbiologia, apenas é fornecida a informação sobre o tipo de produto (fezes, expetoração, urina, etc). Normalmente, é

enviada uma amostra liofilizada, é ressuspensa e após 24h é processada como se fosse uma amostra real. Os resultados obtidos são enviados para a entidade responsável, que os analisa. O CQE tem como objetivo a avaliação externa da qualidade comparando os resultados obtidos com os resultados de outros laboratórios. Os eventuais erros/desvios são analisados e registrados no relatório, que é posteriormente enviado para o laboratório. Os relatórios são depois arquivados e sempre que necessário são tomadas ações corretivas, com o objetivo de resultar no aperfeiçoamento, manutenção ou monitorização crítica do método/equipamento.

1.4 Seção de Hematologia

A hematologia é a área clínica que estuda os elementos figurados do sangue e a coagulação. Estuda, também, a produção desses elementos e os órgãos onde eles são produzidos (órgãos hematopoiéticos): medula óssea, baço e gânglios linfáticos. Além de estudar o estado de normalidade dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, estuda as doenças com eles relacionadas^{9,45}.

A esta seção chegam amostras de sangue total em tubos contendo o anticoagulante ácido etileno-diamino-tetracético tripotássico (EDTA K₃), para contagens hematológicas.; em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio para a determinação da velocidade de sedimentação e para fazer estudos de coagulação. O tubo de EDTA K₃, de tampa vermelha (Figura 15^a), é o anticoagulante mais utilizado para rotinas de hematologia por preservar a morfologia celular. Atua como agente quelante do cálcio bloqueando a formação da protrombina, impedindo que ocorra o processo de coagulação.

O tubo de colheita utilizado para o estudo da coagulação é o tubo de tampa verde (Figura 15b), que contém o anticoagulante citrato de sódio na proporção de 1:9 (uma parte de citrato de sódio para nove partes de sangue). As diferentes concentrações de citrato de sódio podem ter efeitos significativos nas análises de Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa), especialmente em doentes sob terapia de anticoagulantes.

O tubo de tampa roxa (Figura 15c) também contém o anticoagulante citrato de sódio, mas na proporção de 1:4 (uma parte de citrato de sódio para quatro partes de sangue), sendo utilizado para medir a velocidade de sedimentação.

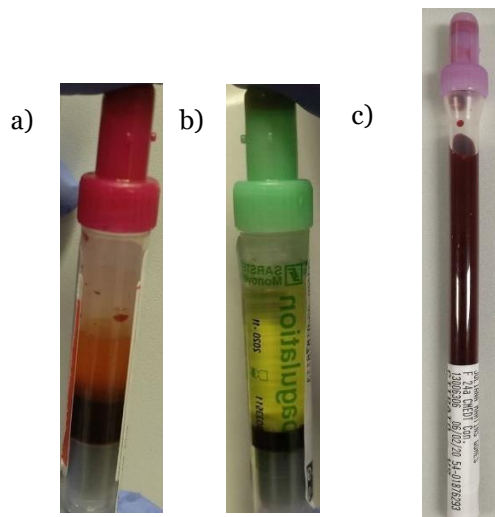


Figura 15- Tubos utilizados na secção de Hematologia. (a)Tubo de EDTA (tampa vermelha); (b e c) tubos contendo citrato (tampa verde e tampa roxa)

Na secção de Hematologia são realizados hemogramas, provas de coagulação, determinação de velocidade de sedimentação eritrocitária, doseamento de hemoglobina glicosilada, coloração e observação ao microscópio de esfregaços de sangue periférico e de medula óssea. Para a realização destes parâmetros, encontram-se disponíveis na secção os seguintes equipamentos: ACL TOP, Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER, ADAMS® A1c HA-8180T, INNOVANCE PFA-200, AEROSPRAY, Sediplus® S 2000, um citómetro de fluxo FASCalibur e dois microscópios óticos.

Antes do processamento das amostras, é efetuado diariamente CQI nos equipamentos ACL TOP, Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER e ADAMS® A1c HA-8180T. O CQI consiste no conjunto de procedimentos aplicados com regularidade na monitorização do desempenho dos métodos analíticos, deteção de possíveis erros devido ao mau funcionamento do sistema, condições ambientais adversas ou mau desempenho do operador, e correção de problemas antes da comunicação dos resultados ao doente ou ao médico⁴⁶.

As amostras para a realização do CQI são fornecidas pelas casas comerciais e a sua utilização permite monitorizar todas as determinações analíticas. O CQI é constituído por “diferentes níveis”, que são soluções com diferentes concentrações conhecidas, para os analitos pretendidos, de modo a avaliar a precisão dos ensaios. O método é considerado viável quando os valores dos controlos estão dentro dos limites inferior e superior, que correspondem a dois desvios padrões do valor de normalidade. Este controlo permite garantir a reprodutibilidade dos resultados, verificar a calibração dos sistemas analíticos e a ocorrência de não conformidades, que desencadearão ações corretivas.

O CQE é um controlo interlaboratorial, em que o resultado de cada parâmetro realizado no laboratório participante é comparado com a média de consenso do seu grupo. Para a determinação desta média os fornecedores do programa de CQE usam os resultados enviados pelos diferentes laboratórios participantes, agrupam-nos de acordo com as metodologias utilizadas nos diferentes ensaios, e fazem uma comparação entre os resultados obtidas pelas

diferentes instituições participantes, determinando assim a exatidão dos resultados de cada uma delas. Deste modo, o CQE tem como objetivo padronizar os resultados de amostras semelhantes, executadas em laboratórios diversos, permitindo determinar e ajustar a exatidão dos métodos utilizados^{46,47}.

1.4.1 Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER

O equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER é um analisador hematológico utilizado para a realização do hemograma. O hemograma é o exame utilizado para avaliar as três principais linhagens das células do sangue (os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas), sendo dividido em eritrograma, leucograma e plaquetograma (Figura 16). O hemograma permite o diagnóstico de várias doenças hematológicas benignas e malignas, nomeadamente, anemia, infecções e leucemia.

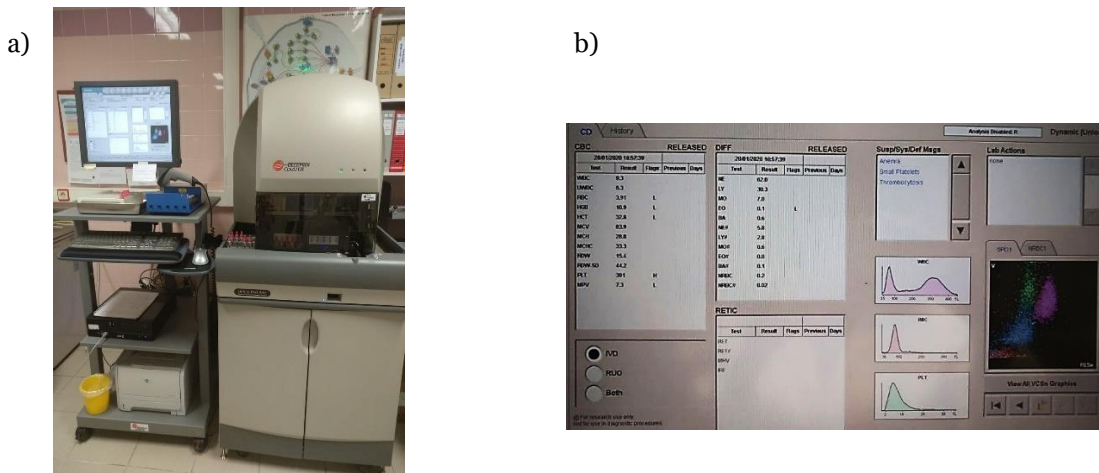


Figura 16- (a) Equipamento Unicel® DxH800 BECKMAN COULTER; b) o hemograma dividido em 3 partes: eritrograma, leucograma e plaquetograma.

A hematopoiese (formação das células sanguíneas) tem origem nas células-tronco pluripotentes da medula óssea. As células-tronco dão origem a células progenitoras, que após a divisão e diferenciação, dão origem aos eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos monócitos), plaquetas e linfócitos B e T⁴⁸.

Os **eritrócitos** são células pequenas, anucleadas, com forma de disco bicôncavo, cuja principal função é transportar O₂ a todos os tecidos do organismo, e libertar dióxido de carbono (CO₂) nos pulmões. São as células mais numerosas no sangue e possuem uma semi-vida de 120 dias^{46,48}.

Os **leucócitos** são os elementos figurados do sangue que estão envolvidos na proteção do organismo contra infecções, e estão presentes no sangue em menor número que os eritrócitos. São divididos em fagócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos) e linfócitos. Os

fagócitos constituem a principal linha de defesa do organismo contra infecções bacterianas, enquanto que os linfócitos estão envolvidos na produção de imunoglobulinas (células B) e na defesa do organismo contra infecções virais (células T) ⁴⁸.

No eritrograma (Tabela 4) é determinado o número de eritrócitos, em contagem absoluta, a hemoglobina, o hematócrito, os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) e a dispersão do volume eritrocitário (RDW). Os índices hematimétricos são determinados a partir da contagem global dos eritrócitos, do valor de hemoglobina e determinação do hematócrito. Estes parâmetros avaliam os eritrócitos quanto ao volume e ao conteúdo em hemoglobina, e servem para classificar as anemias. No eritrograma é também determinada a contagem de reticulócitos, células imaturas da linhagem eritróide, que correspondem a um estado de maturação imediatamente anterior ao eritrócito.

No leucograma (Tabela 5) é determinada a contagem absoluta de leucócitos e a contagem diferencial, absoluta e em percentagem, dos diferentes tipos de leucócitos. No plaquetograma (Tabela 6) determina-se a contagem absoluta das plaquetas, o volume plaquetar médio (VPM) e a dispersão do volume plaquetar (PDW).

Tabela 4- Parâmetros do eritrograma

Eritrograma – estudo da série vermelha (eritrócitos)	
Parâmetros	Definição
Eritrócitos	Números de eritrócitos por microlitro de sangue
Hemoglobina (Hb)	Avalia a concentração de hemoglobina no sangue
Hematócrito (Ht)	Volume ocupado pelos eritrócitos numa amostra de sangue total.
VCM	Tamanho médio dos eritrócitos, expresso em fentolitros. Classifica as anemias em microcítica, normocítica e macrocítica.
HCM	Conteúdo médio de hemoglobina nos eritrócitos
CHCM	Concentração de hemoglobina presente no eritrócito. Classifica as anemias em hipocrômica e normocrômica
RDW	Indica a variação de tamanho dos eritrócitos (anisocitose)
RET	Contagem de reticulócitos. Avalia a eritropoiese
RVM	Avalia o tamanho dos reticulócitos

Tabela 5- Parâmetros do leucograma

Leucograma – estudo da série branca (leucócitos)	
Parâmetros	Definição
WBC	Contagem de leucócitos
Neutrófilos	Células mais numerosas em adultos, possuem um núcleo com vários lóbulos. O seu aumento pode indicar infecção bacteriana, mas pode estar aumentada em infecção viral
Linfócitos	Nos adultos o seu aumento (linfocitose) pode ser indício de infecção viral ou leucemia linfocítica crônica
Eosinófilos	Células com grânulos grandes e alaranjados. O seu aumento (eosinofilia) ocorre em processos alérgicos ou em parasitoses
Monócitos	Uma das maiores células da série branca, quando o seu número está aumentado usa-se o termo monocitose e ocorre em infecções virais, leucemia mielomonocítica crônica e após a quimioterapia
Basófilos	Célula circulante menos numerosa (1% dos leucócitos). Possui um citoplasma cheio de grânulos.

Tabela 6- Parâmetros do plaquetograma

Plaquetograma	
PLT	Contagem de plaquetas
VPM	Determina o volume ocupado pelas plaquetas
PDW	Avalia a morfologia das plaquetas

As amostras de sangue total em tubos contendo EDTA para a realização do hemograma são colocadas a agitar durante 10 min e, posteriormente, são processadas no contador hematológico DxH800. Este equipamento mede a dispersão da luz, emitida por um laser de hélio-neon (HeNe), após esta atravessar a amostra em estudo. O DxH800 tem 2 detetores óticos que permitem avaliar a dispersão da luz em 5 ângulos distintos. Desta forma, são fornecidos 7 parâmetros de medição celular que valorizam a análise do diferencial, eritrócitos nucleados (NRBC) e reticulócitos.

Os dados que garantem uma melhor discriminação e classificação das populações celulares são representados em formato *data plot* (2D e 3D) e *surface plot*.

A identificação dos reticulócitos é feita com base na precipitação de RNA residual, utilizando o corante azul de metileno. A amostra é encaminhada para o *flow cell* (câmara de fluxo do equipamento) onde é analisado o tamanho, a forma e a morfologia celular.

1.4.2 Equipamento AEROSPRAY®

O equipamento AEROSPRAY® (Figura 17b) é um equipamento automático de bancada que permite a coloração de 12 esfregaços de sangue periférico, em simultâneo e em poucos minutos. Este equipamento utiliza como método de coloração a técnica de *May-Grünwald-Giemsa* modificada.

O esfregaço de sangue periférico é utilizado para o estudo morfológico das células sanguíneas e é realizado quando o contador automático não consegue fazer a contagem diferencial dos leucócitos, quando os valores obtidos no hemograma não são concordantes com os valores de referência, quando é pedido pelo médico prescriptor devido ao histórico clínico do doente e quando o histograma se encontra alterado, mesmo se o hemograma apresenta valores concordantes com os de referência.

O esfregaço consiste na formação de uma fina película de sangue, sobre a superfície de uma lâmina, de modo a poder observar-se ao microscópio, sem sobreposição de células. Antes de realizar o esfregaço, o sangue é homogeneizado para que as células estejam bem distribuídas. Em seguida, é colocada uma pequena gota de sangue sobre uma lâmina de vidro e, com a ajuda de outra lâmina de vidro a 45°, a gota é arrastada num movimento único e uniforme, formando uma película (Figura 17a). Uma hora após a secagem os esfregaços são corados no equipamento, sendo depois possível observá-los.

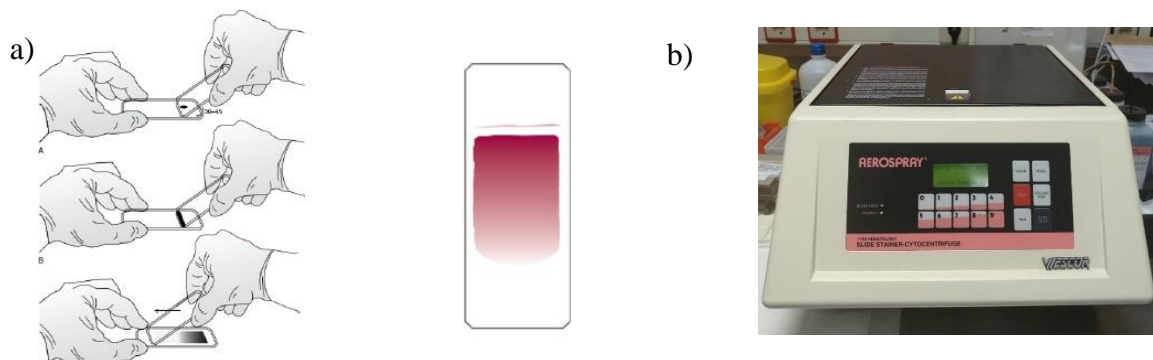


Figura 17- (a) Ilustração de como realizar um esfregaço de sangue periférico e o aspeto de um esfregaço com separação ótima para observação (Retirado de 49) ; b) Equipamento AEROSPRAY®.

A coloração de *May-Grünwald-Giemsa* é utilizada para a coloração de células sanguíneas e medula óssea. Esta coloração consiste numa mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células. São usados dois corantes: o corante de *May-Grünwald*, que contém eosina e azul de metileno em álcool metílico, e é responsável pela fixação do esfregaço e coloração dos núcleos a azul e do citoplasma de vermelho-rosa; o corante de *Giemsa* contém eosina e derivados de azul de metileno e aumenta a

intensidade da coloração nuclear e a capacidade de evidenciar seletivamente os elementos nucleares (Tabela 7)⁵⁰.

Tabela 7- Coloração de May-Grünwald-Giemsa⁵⁰

Estruturas Celulares	Resultado Esperado
Núcleos	Vermelho-violeta
Citoplasma basófilo	De azul-celeste a azul escuro
Citoplasma acidófilo	De vermelho claro a rosado
Granulações acidófilas	Laranja
Granulações neutrófilas	Castanho
Granulações basófilas	Violeta escuro
Granulações azulófilas	De púrpura a violeta-púrpura
Hemácias/ eritrócitos	Rosa-púrpura com ponteados basófilos (azul cobalto)

Na secção de Hematologia também é realizada a coloração de Perls em esfregaços de medula óssea. Esta coloração permite identificar ferro libertado da hemoglobina na sua forma iónica (Fe^{3+}). No decorrer da reação com azul da Prússia, o ferro iónico do grupo heme reage em solução de ácido clorídrico (HCl) com o hexocianeto (II) de potássio e precipita na forma de um complexo de sal insolúvel, com coloração azul, permitindo localizar o ferro celular livre. A solução “*Nuclear Fast Red*” permite corar os precipitados de ferro ao nível do citoplasma, com uma coloração ligeiramente rosada⁵⁰.

1.4.3 Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T

O equipamento ADAMS A1c HA-8180T é um analisador automático que permite quantificar a hemoglobina glicada (HbA1c, HbA2) e hemoglobina fetal (HbF), pela metodologia de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), cromatografia de troca catiónica de fase reversa (Figura 18)⁵¹. A hemoglobina glicada é um indicador de grande utilidade clínica para o controle da glicémia a longo prazo em doentes com diabetes *mellitus*. A análise da hemoglobina fetal é utilizada para diagnosticar talassemias.



Figura 18- Equipamento ADAMS® A1c HA-8180T

A hemoglobina é uma proteína responsável por executar as trocas gasosas nos eritrócitos. É um tetrâmero formada por uma porção proteica denominada de globina e por um grupo heme que contém ferro, que se liga ao oxigênio. A globina é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma ligada a um grupo heme (Figura 19)⁴⁸.

O sangue normal de um adulto contém três formas de hemoglobinas:

- **Hemoglobina A (HbA)**- é a hemoglobina predominante no adulto (97%), e é composta por duas cadeias α e duas cadeias β ; é a hemoglobina que existe em maior quantidade após 3-6 meses de vida.
- **Hemoglobina A2 (HbA2)** – composta por duas cadeias α e duas cadeias δ , é encontrada em pequenas quantidades (entre 1,5-3,5%) no sangue normal de um adulto.
- **Hemoglobina Fetal**- composta por duas cadeias α e duas cadeias γ , é a hemoglobina encontrada em menor quantidade (< 2%) no sangue normal de um adulto; a maior parte da mudança de HbF para HbA ocorre 3-6 meses após o nascimento⁴⁸.

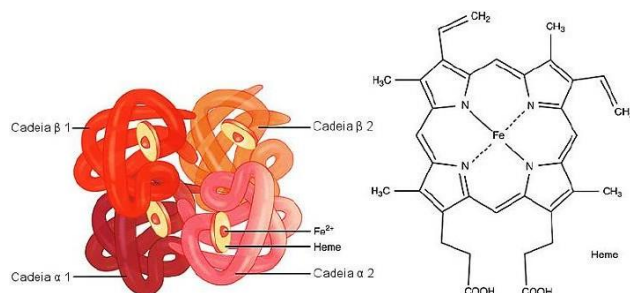


Figura 19– Constituição e estrutura molecular da hemoglobina (Retirado de 52).

A HbA1c resulta de uma reação não enzimática, irreversível, entre a glicose que circula no sangue e os grupos amina livres existentes na hemoglobina dos eritrócitos. A determinação da HbA1c permite a monitorização da glicemia média, nas últimas 8 a 12 semanas antes da

colheita, uma vez que a vida útil média funcional dos glóbulos vermelhos no corpo humano é de aproximadamente 120 dias⁵³.

A HbA1c também é utilizada como preditor do risco para desenvolver complicações crônicas da diabetes, e de complicações relacionadas com a gravidez e o parto nas mulheres com diabetes prévia à gravidez⁵⁴.

No equipamento ADAMS A1c HA-8180T, as moléculas de Hb são separadas com base na sua capacidade de interagir com uma matriz hidrofóbica. O fato de HbA1c e Hb não glicada terem pontos isoeletrônicos diferentes, permite a separação das diferentes frações de Hb e a quantificação de HbA1c, por HPLC⁵³. Ao entrar no equipamento, a amostra de sangue total a ser analisada é hemolisada com recurso a uma solução de hemólise, na proporção de 1: 100. As moléculas de Hb vão ligar-se à coluna da matriz hidrofóbica (fase estacionária não polar) e vão ser eluídas com tampões de fosfato inorgânico de baixa e alta polaridades. As diferentes frações de Hb são detetadas e quantificadas pelo método colorimétrico, nos comprimentos de onda 420 nm e 500 nm, à medida que vão sendo eluídas na coluna. Os resultados são apresentados em cromatogramas, nos quais é possível identificar picos das diferentes frações de Hb, os seus tempos de retenção e percentagem em que estão presentes^{54,55}.

1.4.4 Sediplus® S 2000

O Sediplus® S 2000 é um aparelho que permite medir a Velocidade de Sedimentação (VS), com recurso a luz infravermelha. O aparelho deteta a inserção do tubo de citrato de sódio, contendo sangue total, e inicia a medição (Figura 20). No decorrer do processo de medição, a placa de medição desloca-se para cima e para baixo, e o tubo contendo a amostra passa por um ligeiro feixe de luz. Por detrás do tubo, o feixe atinge um detetor. A superfície da camada de eritrócitos é detetada como uma alteração da intensidade luminosa durante o movimento. A medição é realizada durante o período de 1 hora.



Figura 20- (a) Equipamento Sediplus® S 2000; b) A diferença entre os 0 e 60 minutos

A VS é definida como a distância entre a superfície líquida do plasma e a superfície de sedimentação dos eritrócitos, e é expressa em milímetros. A determinação da VS é uma análise inespecífica na documentação de processos infecciosos, inflamatórios ou neoplásicos, na avaliação do grau de atividade ou da extensão da doença de base e, em alguns casos, da resposta à terapêutica instituída. Apesar de inespecífica, a VS é indispensável na investigação e acompanhamento de casos de artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistêmico e a doença reumática⁵⁶.

1.4.5 Equipamento INNOVANCE PFA-200

O equipamento INNOVANCE PFA-200 (Figura 21a) é um analisador automático que avalia a hemostase primária, e auxilia na detecção rápida da disfunção plaquetária. Neste equipamento é simulado *in vitro* o processo de adesão e agregação plaquetária, consequente de uma lesão vascular. A disfunção plaquetária detectada pelo sistema pode ser adquirida, hereditária ou induzida por agentes inibidores da atividade plaquetária.

O sistema permite a avaliação rápida da função plaquetária em pequenas amostras de sangue total anticoagulado. O cartucho de teste de utilização única, com colagénio/ADP e colagénio/epinefrina, consiste em várias peças integradas, incluindo um capilar, um reservatório da amostra e uma membrana bioquímica ativada por um orifício central (Figura 21b). O sangue total anticoagulado é aspirado, a partir do reservatório da amostra, através do capilar e do orifício, de forma às plaquetas ficarem expostas a condições de elevado fluxo.

No início, a solução ativadora é distribuída para humedecer a membrana e dissolver os reagentes ativos. Durante o teste, as plaquetas aderem à membrana revestida. Seguidamente, as plaquetas são ativadas, libertam o conteúdo dos seus grânulos e inicia-se o processo de adesão plaquetária. Como uma medição da função plaquetária, o processo de agregação plaquetária forma um trombo de plaquetas no orifício, diminuindo assim gradualmente o fluxo sanguíneo e parando-o finalmente. O sistema determina o tempo desde o início do teste até o tampão de plaquetas fechar o orifício, indicando esse intervalo de tempo como o tempo de fecho (CT). O CT é um indicador da função plaquetária na amostra sangue analisada⁵⁷.

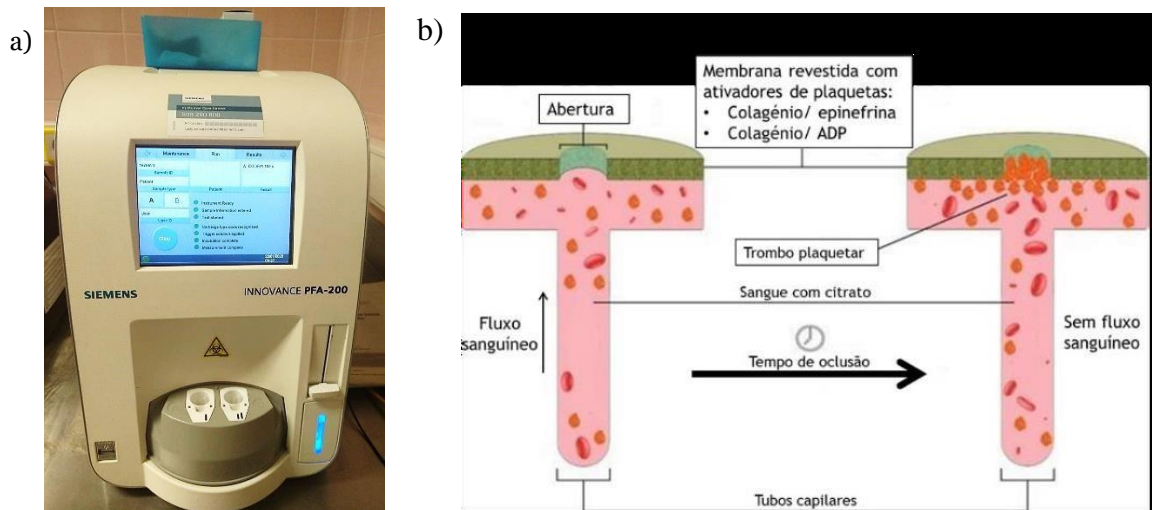


Figura 21- a) Equipamento INNOVANCE PFA-200; (b) Princípio do teste da hemostase primária (Adaptado de 57).

A hemostase é um processo fisiológico, que pode ser definido como uma série complexa de fenômenos biológicos que ocorrem como resposta imediata à lesão de um vaso sanguíneo, com objetivo de conter a hemorragia. A hemostase é o equilíbrio entre mecanismos pro-coagulantes e anticoagulantes, aliado a um processo de fibrinólise. O mecanismo hemostático está dividido em **hemostase primária**, **hemostase secundária** (coagulação) e **fibrinólise**⁴⁸.

A **hemostase primária** é o processo inicial da coagulação, desencadeado pela lesão celular. Após a lesão, ocorre a vasoconstrição dos vasos sanguíneos, diminuindo o fluxo de sangue, com o intuito de minimizar a perda de sangue. A lesão tecidual expõe fator de von Willebrand (FvW), que é o elemento chave no desencadear do processo de adesão das plaquetas às paredes dos vasos. Quando isto ocorre, as plaquetas tornam-se ativadas e libertam os grânulos citoplasmáticos. A adenosina difosfato (ADP) é responsável pela ativação de outras plaquetas, estas plaquetas ativadas vão se agregar umas às outras formando um trombo plaquetário instável que necessita ser consolidado pela fibrina^{48,58}.

Na **hemostase secundária** a trombina transforma o fibrinogênio, uma proteína solúvel, em fibrina (polímero insolúvel) formando um coágulo estável (17). Na **fibrinólise** ocorre a degradação do coágulo de fibrina, mediada pela plasmina. A fibrinólise é estimulada pela Proteína C ativada e pela Proteína S, e é inibida indiretamente pela trombina⁴⁸.

1.4.6 Equipamento ACL TOP®

O ACL TOP 500® da Instrumentation Laboratory (Figura 22) é um analisador automático projetado especificamente para analisar a hemóstase secundária e a fibrinólise, *in vitro*. Este equipamento é capaz de executar testes de turbidimetria e imunoturbidimetria. Nos testes de avaliação da coagulação sanguínea é utilizado o princípio turbidimétrico, sendo avaliado o decréscimo de luz transmitida à medida que ocorre a formação do coágulo. Para a pesquisa do anticoagulante lúpico (AL) e determinação de D-dímeros é utilizado o princípio imunoturbidimétrico. Estes últimos, são testes baseados na formação de um complexo antígeno-anticorpo, o qual afeta a transmissão da luz pela amostra⁵⁰.



Figura 22- Equipamento ACL TOP.

Na hemostase secundária ocorre a cascata de coagulação, que se divide em 3 vias: a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum (Figura 23).

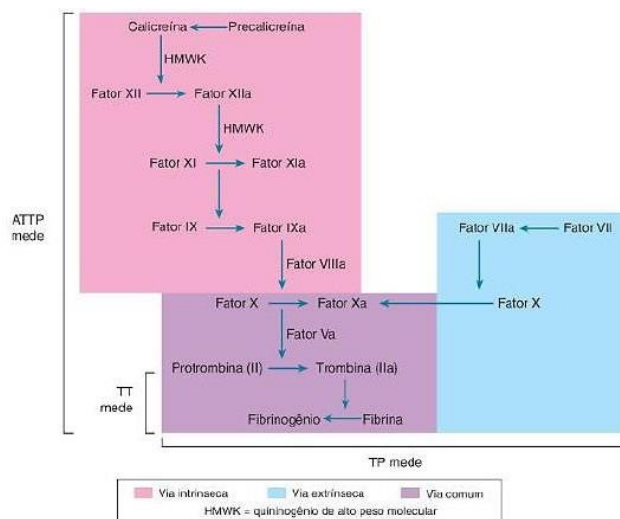


Figura 23- Cascata da coagulação (Retirado de 48).

Para realizar o estudo da coagulação, as amostras de sangue total contendo o citrato como anticoagulante, são centrifugadas a 3000 r.p.m durante 10 min. Os testes da função hemostática incluem o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), determinação específica dos fatores de coagulação e do Fator de von Willebrand. Também são doseados os inibidores da coagulação (anti-trombina (AT), proteína C (PC) e proteína S livre (PS)), o anticoagulante lúpico (AL), D-dímeros e fibrinogénio.

1.4.6.1 Tempo protrombina

O TP avalia a via extrínseca da cascata de coagulação. Quando ocorre uma lesão das células endoteliais, a tromboplastina tecidual é ativada e libertada para a circulação. O fator VII forma um complexo com a tromboplastina tecidual e o cálcio. Este complexo converte o fator X (forma inativa) em fator Xa (forma ativa), que por sua vez transforma a protrombina em trombina. Em seguida, a trombina transforma o fibrinogénio em fibrina⁴⁸.

Um TP prolongado pode ser indicativo de deficiência nos fatores II (protrombina), V, VII, X, na vitamina K, no contexto de doenças hepáticas, de utilização de anticoagulantes orais ou em situações de coagulação intravascular disseminada⁴⁸.

O TP é expresso em segundos e expresso em INR (Razão Normalizada Internacional) para o controlo do tratamento de doentes que tomam anticoagulantes orais. O INR é um método de calibração do tempo de protrombina com o objetivo de reduzir a variação e uniformizar os resultados de TP, entre os diferentes laboratórios clínicos, independentemente dos reagentes utilizados para a sua determinação⁴⁸.

$$INR = \left(\frac{TP (doente)}{TP (controlo)} \right)^{ISI}$$

No cálculo do INR, o TP controlo corresponde ao valor médio calculado para uma população não sujeita a terapia com anticoagulantes orais. O ISI é um valor associado à tromboplastina utilizada e é obtido através da calibração do reagente com a tromboplastina de referência internacional⁴⁸.

1.4.6.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

O TTPA avalia a via intrínseca da cascata de coagulação. Este teste possui um ativador de contato (que estimula a produção de fator XIIa), cloreto de cálcio (que irá desencadear as reações posteriores) e fosfolípidos (necessário à formação dos complexos que ativarão o Fator X e a Protrombina)⁴⁸.

O prolongamento do tempo de coagulação pode ser devido a um déficit de Fator XII, XI, X, IX, VIII, V, II ou fibrinogénio, déficit de vitamina K, presença de heparina, anticoagulante lúpico ou outros inibidores⁴⁸.

Um prolongamento no TTPA e um TP normal ou pouco alterado é um indicativo da presença de heparina. Se descartado a presença de heparina, então é investigado a presença do AL. Se o AL não se deteta deve proceder-se à determinação dos fatores de coagulação da via intrínseca. Se um dos fatores está diminuído, esta é a causa de um prolongamento do TTPA. No entanto, deve-se também analisar se este déficit é devido à presença de um inibidor. O TTPA-mistura consiste em averiguar se o TTPA prolongado é devido a presença de algum inibidor da coagulação ou se é devido a uma deficiência de um dos fatores da via intrínseca. É feito uma mistura na proporção de 1:1, do plasma do doente com o plasma de calibração. Se o TTPA não for corrigido é devido a presença de um inibidor da coagulação, mas se o TTPA for corrigido, indica uma deficiência de um dos fatores da via intrínseca da coagulação⁴⁸.

Um prolongamento no TP e um TTPA normal ou pouco alterado pode estar associado ao déficit do fator VII (único fator exclusivo da via extrínseca)⁴⁸.

Um prolongamento no TP e no TTPA, simultaneamente, é indicativo de deficiência de fatores da via comum (fatores II e V)⁴⁸.

1.4.6.3 Tempo de trombina

O TT mede o tempo em segundos que demora a formação do coágulo de fibrina. O TT é utilizado para determinar alterações na transformação do fibrinogénio em fibrina, pela ação da trombina. O teste consiste em adicionar ao plasma citrato e uma quantidade conhecida de trombina, em condições padronizadas⁴⁸.

1.4.6.4 Fibrinólise

Os coágulos normalmente dissolvem-se poucos dias depois da sua formação, por um processo chamado fibrinólise, o qual envolve a atividade da plasmina, uma enzima ativada por proteólise a partir do seu precursor inativo, o plasminogénio. O plasminogénio é responsável pela clivagem da fibrina em vários fragmentos de degradação. O teste de fibrinólise consiste na deteção dos produtos de degradação do fibrinogénio e da fibrina, como os D-dímeros e o fibrinogénio⁴⁸.

O fibrinogénio é quantificado quando ocorre uma hemorragia inexplicada ou uma coagulação anormal. O fibrinogénio é também um marcador útil na avaliação do estado de diversas doenças incluindo a Coagulação Intravascular Disseminada, disfunções hepáticas e quadros inflamatórios⁴⁸.

Os D-Dímeros são derivados solúveis formados devido à degradação da fibrina pela plasmina. Estes produtos de degradação da fibrina contêm um neo-antigénio (domínio D-Dímero) que não

está presente na molécula original de fibrinogénio, nos seus produtos de degradação ou na fibrina solúvel⁴⁸.

1.4.6.5 Inibidores da Coagulação

A proteína C, a proteína S livre e a antitrombina são inibidores da cascata da coagulação. A antitrombina é o principal inibidor da coagulação sanguínea e é essencial para que a terapêutica anticoagulante. Ao inibir a trombina, o FXa e o FIXa, a antitrombina evita processos descontrolados da coagulação e possíveis acidentes trombóticos. Deficiências na antitrombina estão associados a um risco elevado de doenças tromboembólicas⁴⁸.

A Proteína C é uma proteína vitamina K-dependente que está presente no plasma, como uma proenzima. A deficiência de Proteína C está associada a trombose venosa recorrente, especialmente em adultos jovens⁴⁸.

A Proteína S é uma glicoproteína também vitamina K-dependente, que atua como um cofator da Proteína C ativada, aumentando os seus efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos. Os défices de Proteína S estão associados a um risco maior de tromboembolismo venoso⁴⁸.

1.4.6.5.1 Anticoagulante Lúpico

Os AL pertencem ao grupo dos anticorpos antifosfolipídicos que são dirigidos contra fosfolípidos com carga negativa ou complexos entre fosfolípidos e proteínas (fatores de coagulação como a protrombina). Estes anticoagulantes interferem com as provas de coagulação em que participam os fosfolípidos, como por exemplo o TTPA. Doentes com AL têm um risco aumentado de complicações clínicas, tais como, trombose e abortos de repetição⁴⁸.

São realizados dois testes para a deteção de AL: o de rastreio (SCT Screen) e o de confirmação (SCT Confirm). O SCT Screen possui uma concentração baixa de fosfolípidos, o que faz com que o reagente seja altamente sensível à presença de AL, alargando o tempo de coagulação na presença destes. O SCT Confirm possui uma alta concentração de fosfolípidos que neutraliza o AL e encurta os tempos de coagulação. Com os valores obtidos do doente e com a média do limite de normalidade, é calculado o rácio do SCT Screen e SCT Confirm. Em seguida o rácio do SCT Screen é dividido pelo rácio do SCT Confirm, para obter o Rácio Normalizado de SCT (onde o resultado será expresso).

Se o rácio for $>1,6$ indica presença de AL; se o rácio for $\leq 1,6$ e se os tempos de SCT Screen e SCT Confirm forem prolongados, então devem-se realizar estudos de misturas para investigar deficiências de fatores ou de inibidores. Se o teste de mistura continuar a ser prolongado, tal indica que pode estar presente na amostra um outro coagulante que não seja AL.

1.4.6.5.2 Fator de von Willdbrand

O FvW é uma glicoproteína multimérica, sintetizada exclusivamente por células endoteliais e megacariócitos. Está envolvido na adesão das plaquetas à parede vascular, sendo também responsável pelo transporte do fator VIII, protegendo-o de sua ativação prematura e impedindo a sua degradação proteolítica. A doença de von Willebrand (DvW) é a doença hemorrágica hereditária mais frequente e apresenta diferentes expressões fenotípicas com sinais e sintomas de intensidade variável. A DvW tipo 1 caracteriza-se pela deficiência quantitativa parcial do fator. A DvW tipo 2 caracteriza-se pela alteração funcional do fator, e na DvW do tipo 3 ocorre deficiência completa do fator. A formação inadequada do FvW ou a formação normal em quantidade reduzida, leva a uma adesão plaquetária deficiente, com prejuízo na hemostasia primária e diminuição da semi-vida do fator VIII⁴⁸.

O diagnóstico só pode ser confirmado após a avaliação do rácio entre o teste do antigénio do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) e o teste da atividade do cofator ristocetina do FvW (R:CoF). A atividade antigénica plasmática do FvW (FvW:Ag) é, portanto, considerada universalmente como um marcador de disfunção endotelial e assim utilizada em várias doenças. A atividade do cofator da ristocetina é o teste mais específico para a função plaquetária e pode apresentar-se diminuído, mesmo na doença leve.

A ristocetina é um antibiótico que induz a ligação do FvW à glicoproteína Ib e é utilizado para o exame diagnóstico.

1.4.7 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica multiparamétrica, que por meio de um feixe de laser incidente faz a medição da dispersão da luz e da fluorescência do feixe de laser refletido, a partir da amostra celular. A CF tem como função realizar a separação, a contagem individual de células e deteção de biomarcadores proteicos⁵⁹.

Atualmente, a CF é a metodologia mais aplicada na análise celular, como por exemplo, na quantificação de células CD4 em pacientes portadores do vírus HIV, na investigação de doenças hematológicas com características de malignidade, bem como no desenvolvimento de fármacos.

Para utilizar a CF como ferramenta de estudo, as amostras devem estar em suspensão. A amostra pode ser de sangue periférico, de cultura celular, de medula óssea, de tecido, ou de líquido. Em todas as situações, as células devem estar dissociadas, de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. Amostras de tecidos sólidos como fígado ou fragmentos de tumores também podem ser estudados, desde que as células sejam separadas por métodos mecânicos ou enzimáticos⁵⁹.

A CF mede parâmetros em células que fluem através de um sistema de análise. O processo inicia-se com a seleção de anticorpos, marcados com fluorocromos, específicos para o antigénio celular, que permite caracterizar a população das células de interesse. Após o processamento da

amostra, uma suspensão de células é introduzida no aparelho, fluindo em direção a um laser posicionado no caminho das células. Como o fluxo das células é laminar e o diâmetro do tubo se afunila, as células são forçadas a passar em “fila única” pela luz emitida pelo laser. O fluorocromo ligado ao anticorpo absorve a energia do laser e rapidamente emite essa energia em forma de luz, em comprimentos de ondas específicos, de acordo com o fluorocromo utilizado. A luz emitida é captada por um sistema ótico que é sensível a diferentes comprimentos de onda, permitindo que um ou mais marcadores sejam lidos ao mesmo tempo, e que integra e disponibiliza essa informação num computador acoplado ao sistema⁵⁹.

Capítulo 2: Estudo Epidemiológico da Incidência do Vírus SARS-CoV-2 na Beira Interior

2.1 Introdução

As pandemias são surtos de doenças infecciosas em grande escala que podem aumentar a morbidade e mortalidade numa ampla área geográfica e causar perturbações económicas, sociais e políticas significativas⁶⁰. São conhecidas como as grandes pandemias do século passado a gripe espanhola em 1918, a gripe asiática em 1957, a gripe de Hong Kong em 1968 e a gripe suína em 2009. Para além dessas, a síndrome da insuficiência respiratória aguda grave (SARS) em 2002, o Coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) em 2012, o Ébola em 2014 e o vírus Zika em 2016 provocaram a morte de muitas pessoas em todo mundo⁶⁰. Atualmente, a humanidade encontra-se novamente perante o desafio de uma nova pandemia, cujo agente de doença é um coronavírus.

Os coronavírus (CoV) são vírus de RNA, cujo o seu tamanho varia entre 65 a 125 nm de diâmetro, sendo o seu genoma constituído por uma cadeia simples de RNA de 26 a 32 kilobases (kb) de comprimento⁶¹. Na superfície da sua cápside contém glicoproteínas de membrana de grandes dimensões, distribuídas uniformemente, que quando observadas por microscopia eletrônica, parecem ter uma forma típica de coroa^{62,63} (Figura 24).

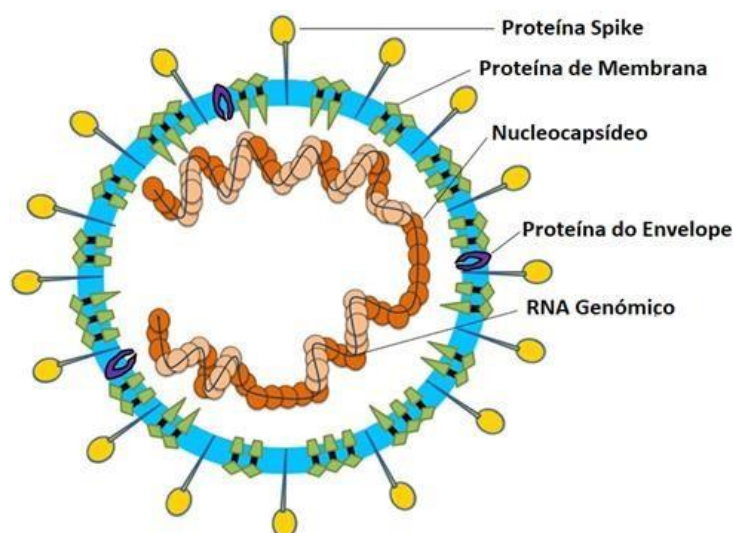


Figura 24- Estrutura e constituição dos coronavírus (Adaptado de 63).

Os coronavírus são a maior subfamília de vírus pertencente à ordem *Nidovirales*. A ordem *Nidovirales* inclui as famílias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* e *Mesoviridae*, sendo a família *Coronaviridae* constituída por duas subfamílias: *Coronavirinae* e *Torovirinae*⁶⁴.

Com base nas suas relações filogenéticas e nas suas estruturas genómicas, a família *Coronavirinae* foi dividida em quatro géneros – alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ), sendo que no seu conjunto são responsáveis por 15 a 30% de todas as infeções respiratórias mundiais. Os coronavírus α e β infetam apenas mamíferos, enquanto que os coronavírus γ e δ infetam principalmente aves^{65,64}.

Antes da atual pandemia estavam identificados seis linhagens de coronavírus capazes de infetar os seres humanos, quatro com baixa patogenicidade (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 e HCoVHKU1) e duas (MERS e SARS-CoV) altamente patogênicas, que foram responsáveis pelos surtos em 2002 e 2012, repectivamente⁶⁶.

O HCoV-229E e HCoV-NL63 pertencem ao género α -coronavírus, o HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV pertencem ao grupo β -coronavírus (Figura 25)⁶⁵. No contexto da atual pandemia, foi incluído no género β o novo coronavírus - SARS-COV-2. Os coronavírus pertencentes aos géneros α e β são conhecidos por causar infeções respiratórias leves a graves do trato respiratório inferior⁶⁴. O género β -coronavirus é ainda classificado em quatro subgéneros: *Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus* e *Nobecovirus*⁶⁷.

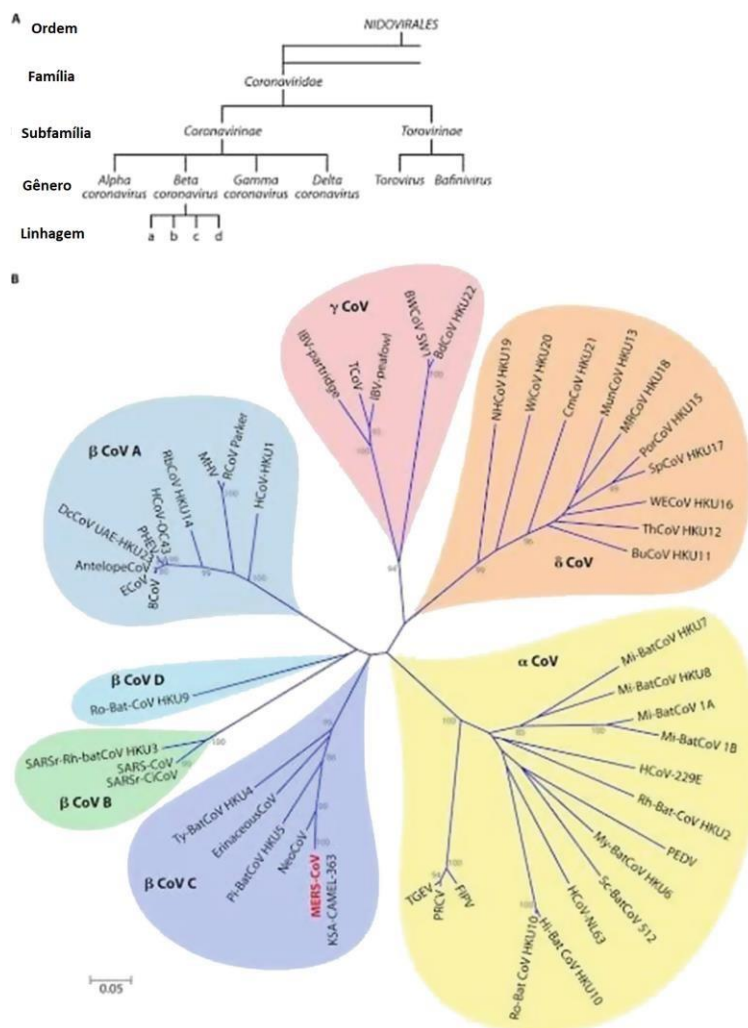


Figura 25- Classificação filogenética dos coronavírus (Adaptado de 68).

2.1.1 Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda Grave

A SARS é uma doença respiratória aguda, potencialmente grave, que surgiu em Novembro de 2002 e teve origem em Guandgong na China. Até Junho de 2003, já tinha afetado 33 países, tendo sido reportados 8450 casos e 810 mortes a nível mundial⁶⁵. Atualmente, não se conhece a existência de transmissão da SARS-CoV a nível mundial. Os últimos casos de infeção por SARS-CoV foram relatados na China em abril de 2004, um surto que resultou de infeções adquiridas em laboratório⁶⁴.

As principais manifestações clínicas da SARS foram febre, calafrios, tosse seca e dificuldade respiratória. Contudo, as pessoas podem desenvolver doença grave, que culmina com insuficiência respiratória e morte⁶².

Os morcegos e os pássaros são os principais reservatórios do SARS-CoV, podendo transmitir o vírus a outros animais que vivem perto ou em contato próximo com humanos, como animais de estimação ou animais exóticos, destinados a consumo humano. Durante a transmissão entre diferentes hospedeiros, o SARS-CoV pode sofrer mutações genéticas, que resultam em aquisição

de novos genes ou modificação de genes existentes por meio de mecanismos de recombinação. Essas alterações no seu genoma resultam em adaptações que o tornam mais habilitados a cruzar a barreira das espécies e, conseqüentemente, a ter a capacidade de provocar a doença em novas espécies. Exemplo disso é a alteração conformacional da proteína Spike (S), no domínio de ligação ao recetor (RBD), que contribuí para tornar mais eficaz a ligação do SARS-CoV e do MERS-CoV às células humanas⁶⁴.

2.1.1.1 A Origem Zoonótica do SARS-CoV

A semelhança genética entre os coronavírus isolados nos mamíferos *Paguma larvata* e *Nyctereutes procyonoides* (ambos originários do sudoeste asiático) e o coronavírus responsável pela SARS em humanos, levou a assumir que estas duas espécies de mamíferos eram os hospedeiros naturais do SARS-CoV. Contudo, estudos mais aprofundados mostraram que os *Paguma larvata* que habitavam perto dos mercados de animais não tinham o SARS-CoV. Este fato levou a assumir que esta espécie não era um hospedeiro natural, mas sim um hospedeiro intermediário da infecção em humanos⁶⁴.

Posteriormente foi identificado na espécie de morcegos *Rhinolophus affinis* um coronavírus semelhante ao SARS-CoV, o BatCoV RaTG13. Estudos em laboratório, utilizando culturas celulares de células humanas HeLa, que expressam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), mostraram a capacidade do BatCoV RaTG13 de se replicar nas células humanas utilizando a ACE2 como receptor. Por outro lado, os estudos revelaram também a existência de cerca de 88-92% de homologia genética entre o BatCoV RaTG13 e o SARS-CoV, levando a concluir que o *Rhinolophus affinis* é o hospedeiro natural do SARS-CoV (Figura 26)⁶⁴.



Figura 26- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do SARS-CoV (Adaptado de 64).

2.1.2 Síndrome Respiratória do Oriente Médio

Em 2012 surgiu, na Arábia Saudita, uma doença respiratória causada por um coronavírus, denominada Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV)⁵. Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), desde essa altura foram reportados casos em 26 países, num total de mais de 1 milhar e meio de pessoas infetadas e mais de 500 óbitos. A maioria dos casos ocorreu no Médio Oriente, na Península Arábica, principalmente na Arábia

Saudita. Fora da Península Arábica foi registado um surto na Coreia do Sul, entre Maio e Julho de 2015, tendo sido reportados 185 casos e 36 óbitos^{64,69}.

Os doentes com infeção por MERS-CoV geralmente apresentam sintomas relacionados com a pneumonia que desenvolvem, nomeadamente, febre, mialgia, tosse e dispneia. Os casos graves podem desenvolver síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA), choque séptico, falência de múltiplos órgãos e morte⁶².

2.1.2.1 A Origem Zoonótica do MERS-CoV

Á semelhança do que acontece com o SARS-Cov, os estudos apontam os morcegos como o hospedeiro natural do MERS-CoV e os dromedários como hospedeiros intermediários (Figura 27)⁶⁴.



Figura 27- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do MERS-CoV (Adaptado de 64).

Foi demonstrado que MERS-CoV infecta as células de morcego por meio da dipeptidil peptidase-4 (DPP4), o mesmo receptor utilizado pelo vírus para infectar as células humanas⁶⁴.

Até ao momento, não se conseguiu saber quando é que ocorreu a passagem do MERS-CoV dos morcegos para os dromedários. Por outro lado, persiste a dúvida sobre se os dromedários são o hospedeiro intermediário uma vez que houve muitos casos de MERS-CoV em que os doentes não tinham tido contato com esses animais antes de desenvolver a doença. Contudo, assume-se que provavelmente esse fato se deve à transmissão do vírus de pessoa para pessoa ou através de rotas de transmissão desconhecidas, envolvendo espécies animais não identificadas que eram portadoras do MERS-CoV⁶⁴.

2.1.3 O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é um vírus de RNA de cadeia simples com formato esférico, de aproximadamente 26 a 32 kb, que infeta o sistema nervoso central (SNC) e respiratório de animais e humanos ^{66,70}.

Como o SARS-CoV e o MERS-CoV, o SARS-CoV-2 surgiu no Oriente⁶⁴. Em Dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, começaram a surgir os primeiros casos de uma pneumonia inexplicável, com características semelhante à pneumonia desenvolvida na SARS⁶⁵. Nessa altura, identificou-se como agente da infeção um novo coronavírus, que foi classificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus como SARS-CoV-2 por pertencer ao subgénero *Sarbecovirus* (género β -Coronavírus), o mesmo do SARS-CoV^{60,71}. A Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou a doença causada pelo novo coronavírus de COVID-19, e declarou o estado de pandemia mundial no dia 11 de Março de 2020^{64,72}.

A pandemia por SARS-CoV-2 atingiu mais de 200 países e os continentes mais afetados foram a América e a Europa (Figura 28)⁶⁵. A disseminação rápida e global da COVID-19 foi consequência do fluxo diário de pessoas que todos os dias circulam entre países, em todo o mundo⁶⁴. Até 1 de Setembro de 2020, de acordo com a OMS, havia mais de 25 milhões de casos confirmados e 848.255 óbitos em 216 países. Em Portugal, na mesma data, havia 58.243 casos confirmados e 1.824 óbitos^{73,74}.



Figura 28- Países com casos de COVID-19 (Retirado de 75).

A transmissão inicial do SARS-CoV-2 ocorreu em pessoas que tinham tido contato com animais que estavam à venda num mercado de rua na cidade de Wuhan. Mais tarde, os dados epidemiológicos revelaram o desenvolvimento da doença em pessoas que tinham tido apenas contato com indivíduos que estavam infetados com SARS-CoV-2, e que não tinham visitado o mercado. Este fato foi indicativo da existência de transmissão direta do vírus de humano para

humano^{64,65}. Dos primeiros casos de COVID-19 identificados em Wuhan, apenas 22% dos doentes estiveram expostos diretamente ao mercado, 32% dos casos estiveram em contato próximo com casos positivos e 51% não tiveram contato com nenhuma destas fontes de contágio⁶¹.

A China tem sido considerada o *hotspot* para doenças virais emergentes devido à elevada densidade populacional do país, ao fluxo de pessoas que se deslocam de e para a China, e ao hábito cultural de consumo de animais exóticos. A maioria dos mercados na China proporcionam um cenário ideal para o surgimento de novos vírus, capazes de cruzarem a barreira entre espécies, por esses locais serem normalmente ambientes húmidos, por reunirem vários animais de diferentes espécies num mesmo local, e pelo fato de estarem localizados próximos de áreas residenciais, permitindo o contato direto entre humanos e animais portadores de novas doenças virais⁶⁴.

Por outro lado, o comércio ilegal de animais, a distribuição em grande escala de alimentos de origem animal sem critérios de controlo de qualidade, a desflorestação e a alteração dos ecossistemas (que resultam na privação viral de seus hospedeiros naturais), são outros fatores que favorecem a infeção entre as espécies⁶⁴.

2.1.3.1 Origem Zoonótica do SARS-CoV-2

No que diz respeito à origem zoonótica do SARS-CoV-2, os primeiros estudos apontavam o pangolim (*Manis javanica*) como o hospedeiro natural mais provável e que a transmissão do SARS-CoV-2 ocorria diretamente desse animal para os humanos. Contudo, os estudos genéticos realizados não conseguiam corroborar essa hipótese, uma vez que a sequenciação genética do SARS-CoV-2, isolado de indivíduos infetados, apresentava maior homologia com o vírus BatCoV RaTG13 isolado de morcegos, do que com o coronavírus isolado do pangolim⁶⁴.

O que na realidade acontece é que o coronavírus do pangolim tem uma homologia de 97,4% com o SARS-CoV-2 apenas na região do RBD (implicado na infeção das células). Enquanto que o BatCoV RaTG13, apesar de ter apenas uma homologia de 89,2% para a região RBD, tem maior homologia com o SARS-CoV-2 para o restante genoma. Neste contexto, foi assumido que os morcegos são também os hospedeiros naturais do SARS-CoV-2 e, até ao momento, não se tem a certeza de quais possam ser os hospedeiros intermediários (Figura 29)⁶⁴.



Figura 29- Origem zoonótica e hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 (Adaptado de 64).

2.1.4 Os Morcegos como Hospedeiros Naturais do Vírus (Coronavírus)

Uma em cada quatro espécies de mamíferos na Terra é um morcego. Estes mamíferos pertencem à Ordem *Chiroptera*, que compreende cerca de 1240 espécies, e são considerados como um dos principais hospedeiros naturais e agentes de transmissão de vírus⁶⁴.

O sistema imunológico dos morcegos não consegue eliminar de forma eficaz a generalidade dos vírus, permitindo o perpetuar de infeções virais assintomáticas no seu organismo, o que os torna bons hospedeiros naturais. Esta capacidade de perpetuar as infeções deve-se em grande parte ao fato de algumas espécies de morcegos hibernarem durante o inverno, reduzindo a sua temperatura corporal e a sua taxa metabólica, o que faz com que não consigam produzir anticorpos dirigidos ao agente infeccioso⁶⁴.

Os morcegos são considerados bons agentes de transmissão por terem uma ampla distribuição geográfica mundial, uma esperança de vida de cerca de 20 anos e por viverem em grandes comunidades (10 a 200.000 morcegos/comunidade)⁶⁴.

2.1.5 Virologia do SARS-CoV-2

A capacidade de infeção do SARS-CoV-2 é maior em comparação com a do SARS-CoV. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estipulou o número reprodutivo básico (R_0) do SARS-CoV-2 em 5.7, ou seja, cada pessoa infetada tem capacidade de infetar 5.7 indivíduos. Enquanto que o R_0 do SARS-CoV é de 2 a 5⁶⁵.

O período de incubação do SARS-CoV-2 varia de 1 a 14 dias e a transmissão pessoa a pessoa ocorre por inalação de gotículas respiratórias ou aerossóis provenientes de uma pessoa infetada, que podem ser gerados durante espirros, tosse e exalação^{64,65}. Os estudos epidemiológicos mostraram que a transmissão direta do SARS-CoV-2 pode ocorrer por meio de doentes COVID-19 sintomáticos, pré-sintomáticos e assintomáticos⁷⁶. Contudo, a transmissão do SARS-CoV-2 pode também ser indireta, através do contato com superfícies e materiais contaminado com o vírus⁶¹. Os estudos mostram que o SARS-CoV-2 pode ficar viável até 3 horas após aerossolização, até 24 horas em cartão, e até 2-3 dias em plástico e aço inoxidável⁷⁷. Ambientes fechados, com pouco arejamento, contribuem para a transmissão secundária do vírus, promovendo assim o fenómeno de super-propagação⁷⁶.

Os sintomas da COVID-19 não são específicos. As pessoas contaminadas podem não desenvolver nenhuma manifestação da doença (assintomáticas) ou desenvolverem infeção

respiratória grave (pneumonia), que em alguns casos culmina na morte dos doentes. De acordo com um relatório da OMS baseado em 55.924 casos de COVID-19, confirmados laboratorialmente, os sinais e sintomas típicos incluem febre, tosse seca, fadiga, produção de expectoração, falta de ar e dor de garganta⁷⁸. Alguns estudos sugerem que o SARS-CoV-2 pode desencadear sintomas neurológicos que incluem dor de cabeça, náuseas e vômitos, confusão mental e perda do olfato ou paladar^{62,70}.

Pessoas de todas as idades são suscetíveis ao novo coronavírus, sendo que os idosos e os indivíduos com doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e diabetes, são mais vulneráveis. Estas pessoas, por apresentarem comorbidades, pertencem ao grupo de pessoas de risco por terem maior probabilidade de desenvolverem doença respiratória grave, que em alguns casos pode ser fatal^{61,65}. No que se refere às crianças, estas têm sido consideradas menos vulneráveis que os idosos. Já no que toca às grávidas, estas são consideradas mais vulneráveis que uma pessoa saudável, devido à capacidade que o vírus tem de alterar as respostas imunológicas na interface materno-fetal e afetar o bem-estar de mães e bebês⁶¹.

Até ao momento não existe nenhum medicamento específico que permita curar a COVID-19, nem nenhuma vacina eficaz para prevenir a infecção por SARS-CoV-2. Contudo, existe um painel de recomendações de tratamento farmacológico para pacientes com COVID-19 com base na gravidade da doença (Figura 30)⁷⁹.



Figura 30- Painel de recomendações de tratamento farmacológico para pacientes com COVID-19 com base na gravidade da doença (Adaptado de 79).

Existe um conjunto de medidas que se acredita que ajudem a diminuir a sua propagação, como são exemplo: o distanciamento social, a limitação do fluxo de pessoas, o cancelamento/diminuição de atividades públicas e o uso de máscara em locais públicos⁶⁵. Para além dessas medidas, a lavagem frequente das mãos e a manutenção de uma distância de pelo menos um metro são considerados os principais cuidados a ter para não contrair a doença⁶⁴.

2.1.6 Biologia Molecular do SARS-CoV-2

A estrutura genômica do SARS-CoV-2 mostra uma organização típica dos β -coronavírus: uma região 5' não traduzida (UTR); a presença dos genes ORF1 e o ORF2 que codificam proteínas não estruturais importantes para a multiplicação do vírus; uma região 3' UTR que codifica proteínas estruturais funcionais, nomeadamente a proteína spike (S), a proteína de envelope (E), proteína de membrana (M), o nucleocapsídeo (N) e outras proteínas acessórias (Figura 31)^{61,65,76}.

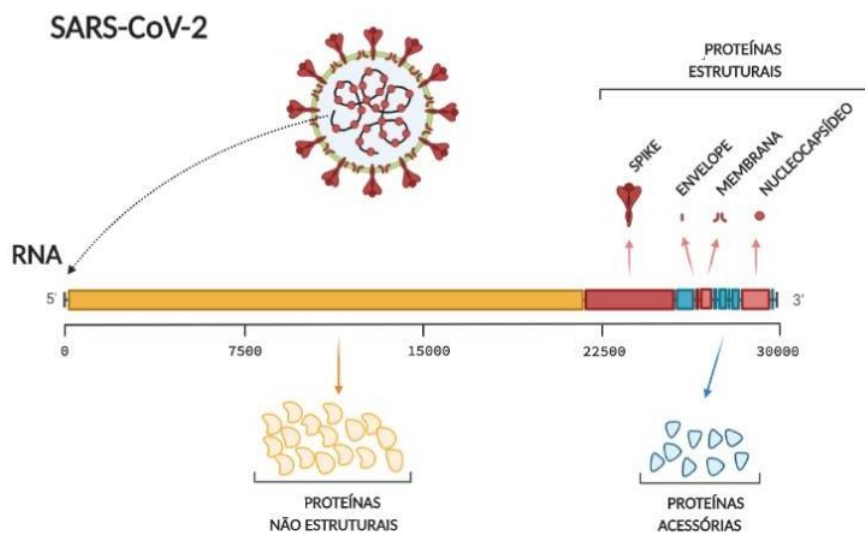


Figura 31- Estrutura genômica do SARS-CoV-2 (Retirado de 80).

O SARS-CoV-2 e o SARS-CoV têm um elevado grau de homologia nas suas sequências genômicas e utilizam o mesmo recetor de entrada nas células humanas (ACE2).^{65,81,82,83} A ACE2 é uma enzima ancorada na membrana plasmática das células de diversos tecidos do corpo humano, principalmente nas do trato respiratório inferior, do coração, dos rins e do trato gastrointestinal. O SARS-CoV-2 tem uma afinidade dez vezes superior para a ACE2, comparativamente ao SARS-CoV⁶¹.

O SARS-CoV-2 é sequestrado pelas células hospedeiras por endocitose. Neste processo, a proteína S do SARS-CoV-2 liga-se ao recetor celular ACE2, ativando-o, e possibilitando a fusão da membrana viral com a membrana celular. Esta fusão permite que o vírus entre nas células. Uma vez no interior da célula, o material genético do SARS-CoV-2 é transcrito originando poliproteínas de replicase viral pp1a e pp1ab. A pp1a e pp1ab são então clivadas por proteinases virais para formar proteínas não estruturais funcionais (NSPs), como uma helicase (Hel) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A RdRp é responsável pela replicação do RNA da proteína estrutural.

A cadeia positiva de RNA do SARS-CoV-2 vai servir para sintetizar cadeias negativas subgenômica que servem como modelos para a síntese de mRNA. A transcrição desses mRNAs por ribossomos origina as proteínas estruturais S1, S2, E, M e N, que vão ser parte estrutural das nucleocapsides virais. As nucleocapsides são montadas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) originando os viriões. Os viriões formados serão então transportados do RE através do aparelho de Golgi para a superfície da célula, e libertados por exocitose, como mostra a Figura 32⁶¹.

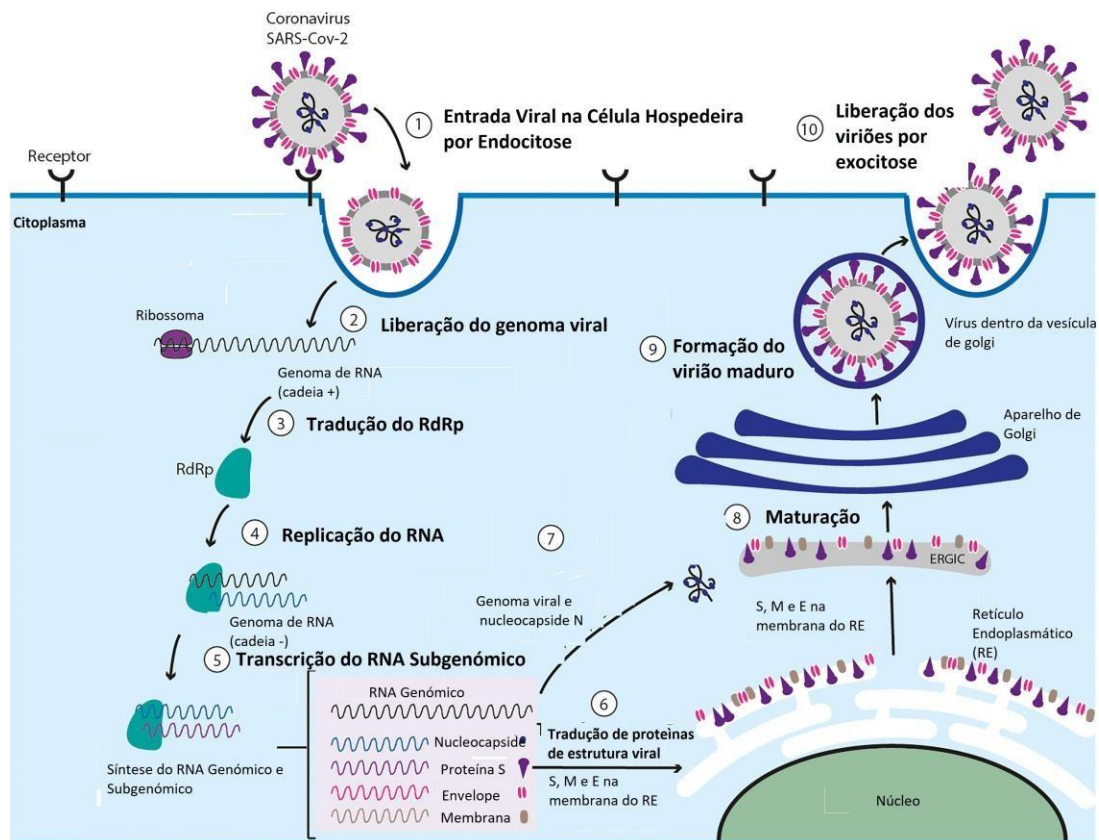


Figura 32- Mecanismo que o SARS-CoV-2 utiliza para entrar nas células hospedeiras e conseguir replicar-se (Adaptado de 61).

2.1.7 Fatores que Favorecem a Transmissão dos SARS-CoV

Os coronavírus têm os maiores genomas de RNA de cadeia simples. Este facto, é responsável pela sua grande capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e capacidade de infecção inter-espécies.

A capacidade dos vírus SARS-CoV de colonizar e infectar novos hospedeiros deve-se, essencialmente, aos seguintes fatores:

- baixa capacidade de traduzir corretamente a RdRp, que leva a altas taxas de mutação e, conseqüentemente, a uma alta variabilidade genética e uma maior capacidade de adaptação a novos hospedeiros;

- alta frequência de recombinações homólogas do RNA;
- elevada capacidade de adaptação da proteína S para se ligar a diferentes recetores do hospedeiro, como a ACE2 no caso de SARS-CoV e SARS-CoV-2, e a dipeptidil peptidase 4 (DDP4) no MERS-CoV⁶⁴.

No que se refere em específico à capacidade de recombinações homólogas de RNA nos coronavírus, foi proposto que esta acontece por um mecanismo de “cópia aleatória” durante a replicação de RNA. Este processo acontece em duas etapas: replicação do genoma e transcrição do RNA subgenômico. No caso dos coronavírus a síntese de mRNA ocorre de forma descontínua, na qual o complexo RNA replicase salta entre diferentes posições do genoma. Este processo leva, inevitavelmente, a eventos recombinantes frequentes⁶⁴.

Para além do referido anteriormente, outro determinante chave da transmissão inter-espécies e especificidade para o hospedeiro é a interação da proteína S com o recetor ACE2. A proteína S dos SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, é constituída por duas subunidades: a subunidade S1, que é o domínio de ligação ao recetor (RBD), e a subunidade S2, que medeia a fusão entre o vírus e a membrana celular (Figura 33). Recentemente, foi demonstrado que o SARS-CoV-2 tem um local de clivagem na junção entre a S1 e a S2, que parece estar na base da maior capacidade de infeção desta espécie. Contudo, o mecanismo exato pelo qual isto acontece ainda não está completamente compreendido^{64,84}.

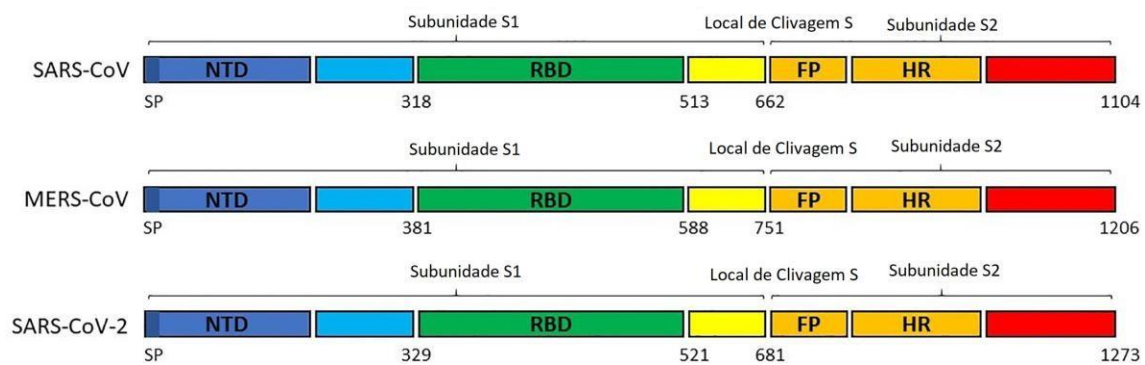


Figura 33- Diagramas estruturais das glicoproteínas S de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. As proteínas S contêm subunidades S1 e S2, que são divididas pelos locais de clivagem S. FP: peptídeo de fusão; FC: repetição do heptal 1 e repetição do heptal 2; RBD: domínio de ligação ao receptor, contém motivo de ligação ao núcleo no subdomínio externo; SP: peptídeo sinal (Adaptado de 64).

2.1.8 Diagnóstico da COVID-19

A triagem rápida e precisa de pessoas infetadas com SARS-CoV-2 é essencial para identificar e colocar em quarentena as pessoas infetadas, limitando ou potencialmente eliminando a propagação do vírus⁸⁵. A sequenciação do genoma completo do SARS-CoV-2 no início da

epidemia facilitou o desenvolvimento de *primers* específicos e protocolos de laboratório padronizados, que permitiram o diagnóstico rápido da COVID-19⁸⁶.

O diagnóstico laboratorial da COVID-19 é realizado numa primeira fase pela extração do RNA viral de células do trato respiratório humano colhidas com recurso a zaragatoas naso e orofaríngeas, seguida pelo teste de biologia molecular de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real (Figura 34)^{72,78}. A RT-PCR em tempo real é, atualmente, considerado o método de diagnóstico de eleição devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que permite detetar quantidades muito pequenas de material genético nas amostras^{85,87}.

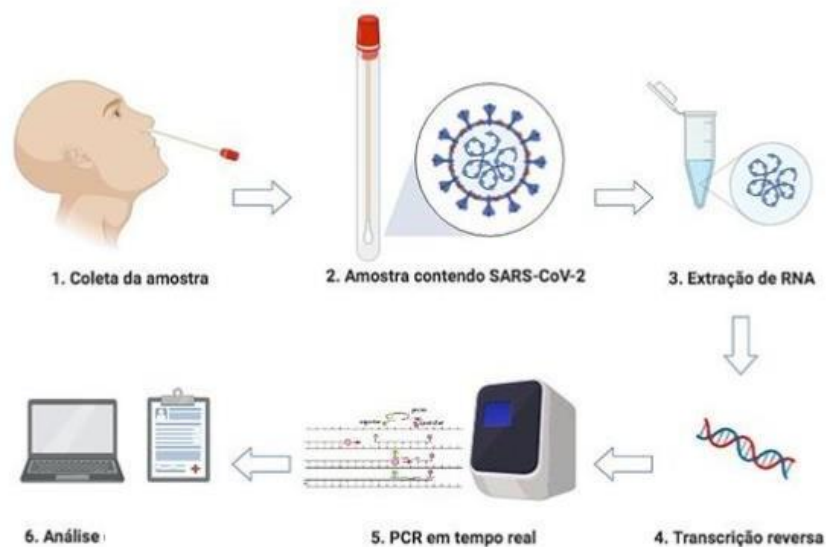


Figura 34- Etapas do diagnóstico do COVID-19 (Retirado de 88).

A RT-PCR em tempo real é uma técnica de etapa única derivada da PCR, em que a enzima transcriptase reversa converte o RNA viral em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), seguido do método de PCR para a amplificação do cDNA. Nesta técnica são usados fluoróforos ou sondas específicas que permitem a visualização dos resultados em tempo real, enquanto o processo está a ocorrer^{87,89}.

Para a realização da técnica, é preparada uma mistura que contém a enzima transcriptase reversa, a DNA polimerase, fragmentos curtos de DNA complementares a partes específicas do DNA viral transcrito (*primers*), oligonucleotídeos e sais bivalentes, como o $MgCl_2$. Alguns dos fragmentos de DNA adicionados são usados para sintetizar novas cadeias de DNA durante a amplificação, e outros fragmentos para além de sintetizarem o DNA também adicionam sondas às cadeias para detetar o vírus^{89,90}.

Mais especificamente, a mistura é colocada num equipamento de RT-PCR (termocilador), e o processo inicia-se com a transcrição reversa a $\approx 60^{\circ}\text{C}$, seguida por uma inicialização a $\approx 93^{\circ}\text{C}$ que destrói a transcriptase reversa e ativa a DNA polimerase. Em seguida começa o ciclo para criar cópias novas e idênticas de cDNA viral hibridizadas com uma sonda que, quando clivada, emite um sinal fluorescente. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração das cadeias de cDNA presentes na amostra. Normalmente, a RT-PCR em tempo real ocorre por 35-45 ciclos, em que cada ciclo consiste em 3 etapas: a etapa de desnaturação do DNA de cadeia dupla a 93°C , a de ligação dos *primers* entre 55°C e 65°C e, por fim, a etapa de extensão do novo fragmento de DNA viral a 72°C . Durante o processo de amplificação, a sonda liga-se a uma sequência alvo específica localizada entre os *primers forward* e *reverse*. Na fase de extensão do ciclo de PCR, a atividade de 5' nuclease da Taq DNA polimerase degrada a sonda ligada, fazendo com que o “*corante repórter*” se separe do “*corante quencher*”, gerando um sinal fluorescente (Figura 35)^{89,90,91}.

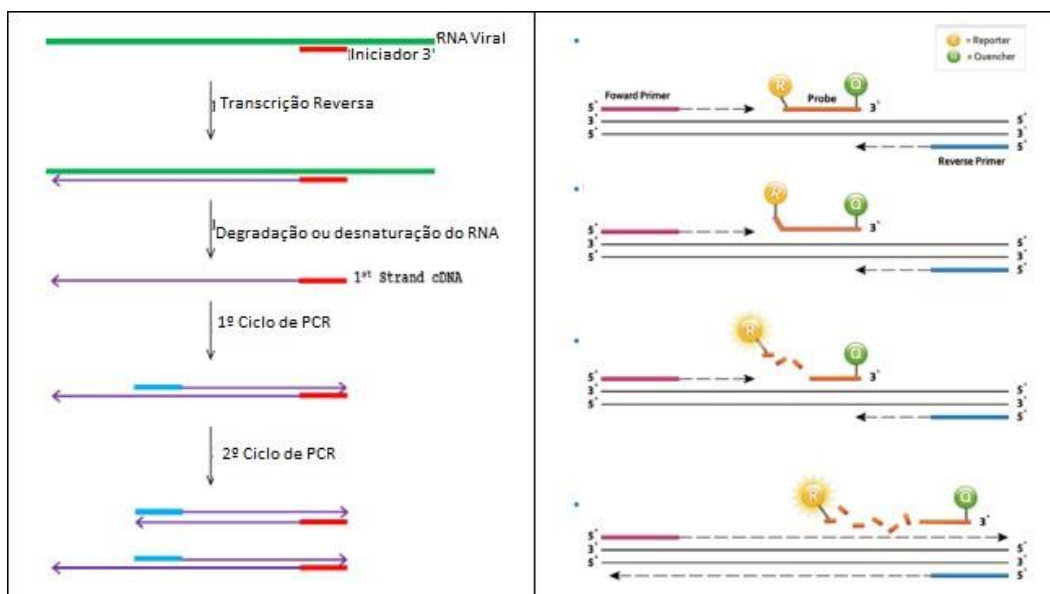


Figura 35- Processo de amplificação do cDNA viral na RT-PCR em tempo real (Adaptado de 92).

Os ensaios de RT-PCR em tempo real têm como alvo diferentes regiões genômicas. No caso concreto do SARS-CoV-2, a RT-PCR deteta os genes específicos RdRp e N, e o pangene E. Num estudo publicado em Janeiro de 2020 mostrou que os *primers* para deteção do gene RdRp têm maior sensibilidade analítica, comparativamente aos *primers* dos outros genes⁸⁹.

A interpretação dos resultados é realizada com base nos valores de Ct para cada gene, conforme a Tabela 8. O Ct é o número de ciclos de replicação necessários para produzir um sinal fluorescente, com valores mais baixos de Ct representando maiores cargas de RNA viral na amostra estudada. Na pesquisa de SARS-CoV-2, um valor de Ct menor que 40 é reportado como positivo⁹³.

Tabela 8- Interpretação dos resultados dos ensaios de RT-PCR em tempo real

Valor de Ct				Interpretação do resultado
ORF1ab	N	E	CI	
+	+	+	/	Deteção positiva para o SARS-CoV-2
+	-	+	/	
+	+	-	/	
-	-	-	+	Deteção negativa para o SARS-CoV-2
-	-	-	-	Inválido ; Repetir o teste e recolher nova amostra
-	+	+	/	Inconclusivo
-	-	+	/	
+	-	-	/	
-	+	-	/	

“+” representa um sinal de deteção positiva, que é definido com $Ct \leq 41$

“-” representa um sinal de deteção negativa, que é definido com $Ct > 41$

“/” não representa nenhum requisito. A deteção do controlo interno não é necessária se o resultado positivo em qualquer um dos outros três canais de deteção

2.2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização epidemiológica da população com suspeita de infeção por SARS-CoV-2, estudada no CHUCB, de acordo com os boletins informativos da Direção Geral da Saúde (DGS) sobre a situação epidemiológica em Portugal (total de casos suspeitos, total de casos confirmados, total de casos não confirmados e óbitos). Como objetivos secundários, foram feitas a caracterização demográfica da população estudada (por género, idade e proveniência geográfica) e a caracterização clínica dos casos estudados em contexto hospitalar no CHUCB (sintomas de infeção respiratória, alterações hematológicas, renais e hepáticas).

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Amostra

As zaragoas colhidas a indivíduos suspeitos de infeção ou por contacto com indivíduos infetados por SARS-CoV2 são resultados dos testes de Biologia Molecular (RT-PCR em tempo real) para deteção de SARS-CoV-2 realizados de 17 de Março a 31 de Julho de 2020 (5 meses),

em dois laboratórios diferentes (no Serviço de Patologia Clínica do CHUCB e no Laboratório de Testes COVID-19 do CICS-UBI).

2.3.2 Desenho de estudo

O presente trabalho consiste num estudo observacional retrospectivo de âmbito laboratorial, em que a população em estudo são pessoas suspeitas de terem infeção por SARS-CoV-2, avaliados no CHUCB em contexto hospitalar ou encaminhados pela Saúde 24 (Covilhã, Fundão, Belmonte). O estudo analisa 8609 amostras de pessoas com idades compreendidas entre 4 meses e 102 anos, de ambos os sexos.

2.3.3 Inativação e Extração de RNA Viral

A metodologia utilizada em ambos os laboratórios foram idênticos, mas foram utilizados reagentes de marcas comerciais diferentes. A inativação e extração de RNA foi realizada com recurso a *Kits* comerciais de extração por coluna, de acordo com indicações da casa comercial. Todo o procedimento de inativação e extração das amostras foi realizado numa câmara de fluxo laminar. Seguidamente serão descritos todos os procedimentos realizados no tratamento de cada amostra estudada.

Exemplo de um dos protocolos de inativação:

Inicialmente foi feita a inativação do RNA viral das amostras. Para um volume de 200 µL de amostra foram adicionados 350 µL do *Buffer NVL* + 1µL do controlo interno, após o qual foram agitadas no *vortex* e incubadas 10 min à temperatura ambiente (15-25°C).

Procedimento de extração:

1. para a extração do RNA viral, inicialmente foram adicionados 350 µL de etanol absoluto (96-100%) a cada amostra inativada (de acordo com o descrito anteriormente), e feito um *vortex* de modo a obter uma solução completamente homogénea;
2. Em seguida, foram transferidos 700 µL da amostra lisada para uma coluna de extração, inserida previamente num tubo coletor, e centrifugada durante 1 min a 8.000 x g. Após a centrifugação o conteúdo do tubo coletor (eluído) foi descartado e a coluna de extração transferida para um novo tubo coletor;
3. Posteriormente, foram adicionados 200 µL do *Buffer NV* (solução de lavagem) e as amostras foram novamente centrifugadas (1 min a 8.000 x g). Após centrifugação, o eluído foi novamente descartado e a coluna de extração foi inserida num novo tubo coletor;

4. Seguiu-se a adição de 600 µL de *Buffer NVW*, centrifugação (1 min a 8.000 x g) e eliminação do eluído, com posterior transferência da coluna de extração para um novo tubo coletor;
5. Realizou-se uma nova lavagem das amostras com 300 µL de *Buffer NVW* e posterior centrifugação (1 min a 8.000 x g). O eluído resultante foi eliminado e a coluna de extração transferida para um novo tubo coletor.
6. As amostras foram sujeitas a uma nova centrifugação (2 min a 8.000 x g), para assegurar uma boa secagem da membrana da coluna de extração.
6. Por fim, foram adicionados 50 µL de água livre de RNase a cada amostra estudada, seguindo-se uma incubação durante 5 min, à temperatura ambiente, com posterior centrifugação (1 min a 8.000 x g), que permitiu eluir o RNA da coluna. Este eluído final, foi o produto analisado por RT-PCR, para a identificação de SARs-CoV-2 nas amostras.

2.3.4 Protocolo de RT-PCR em Tempo Real

A presença ou ausência do vírus SARS-CoV-2 foi analisada por RT-PCR em tempo real. Foi utilizado vários *kits* comerciais, o qual utiliza *primers* e sondas específicas para a amplificação em RT-qPCR multiplex, das sequências dos genes RdRp, N e E.

Uma das metodologias da preparação das amostras e da *Master Mix* (*Super Mix* de Novo CoV + *Mix* de Enzimas RT-PCR) foi feita de acordo com as instruções da casa comercial (Figura 36). Todo o processamento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar e feito de acordo com o número total de reações. Em cada série de amostras, foi incluído um controlo positivo e um controlo negativo.

As condições de amplificações foram as seguintes:

- Fase 1: 1 ciclo (10 min a 45°C) + 1 ciclo (3 min a 95°C)
- Fase 2: 45 ciclos (15 seg a 95 °C + 30 seg a 58°C)

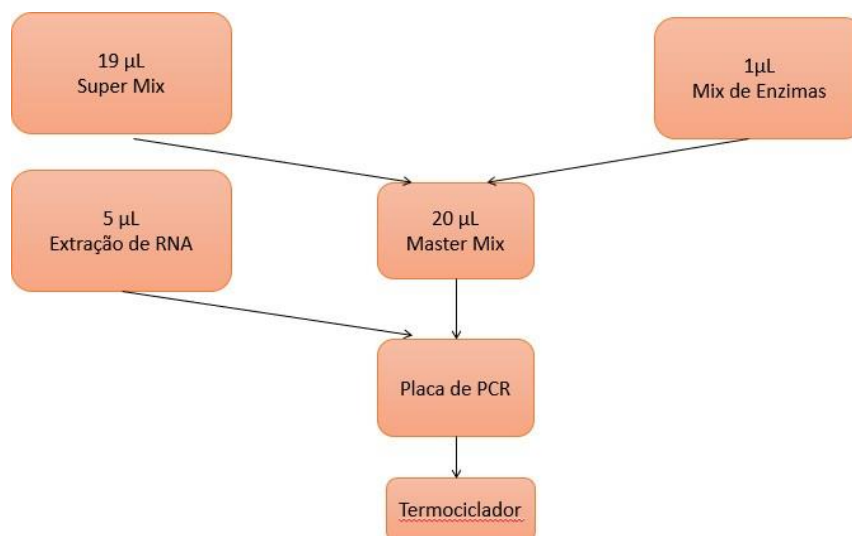


Figura 36- Esquema das etapas de preparação das amostras para RT-PCR em tempo real.

A validação dos resultados foi realizada de acordo com a tabela 8. Em cada corrida foram adicionados os controlos positivos e negativos, e o controlo interno foi incluído na fase de extração.

2.3.5 Análise dos Dados

A análise de dados foi realizada com recurso ao *software Microsoft Office 365 Excel®*- versão 2002.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Caracterização Demográfica da População Estudada

Do total das 8609 amostras recebidas no Serviço de Patologia Clínica do CHUCB para estudo, a grande maioria foi colhida em contexto hospitalar, a destacar 2733 provenientes do Serviço de Medicina (urgência, internamento e consulta) (Figura 37). A análise dos dados revelou também que os serviços cirúrgicos como Cirurgia Geral, Ginecologia/Obstetrícia e Ortopedia, registaram o maior número de pedidos. No que toca a amostras provenientes da comunidade, foram processadas 2505, colhidas no *drivethru* da Câmara Municipal da Covilhã (Figura 37).

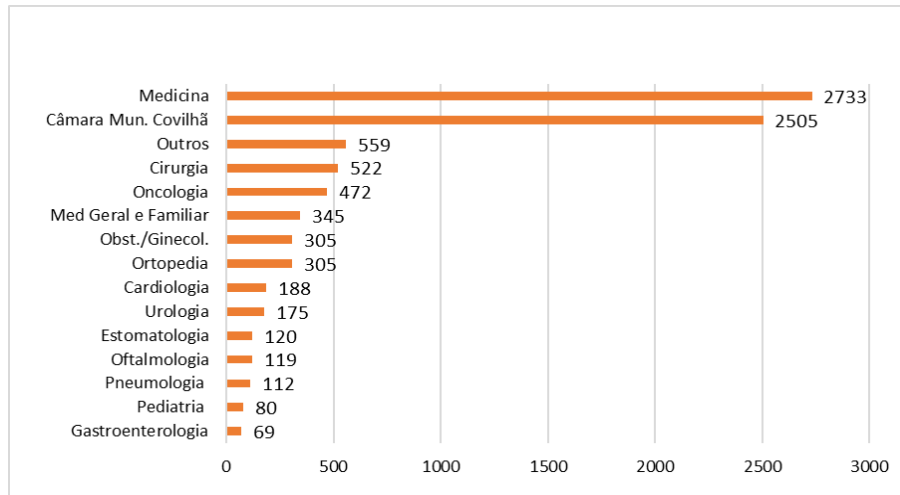


Figura 37- Proveniência das amostras

Da população estudada, 5068 amostras eram de indivíduos do sexo feminino e 3541 amostras foram obtidas de indivíduos do sexo masculino (Figura 38a). Apesar do espectro de idades da população estudada variar de 0 a 102 anos, a idade média dos indivíduos do sexo masculino foi de $57,9 \pm 22,4$ anos e $55,8 \pm 22,4$ anos para o sexo feminino (Figura 38b). Os resultados revelam que foram estudadas mulheres mais jovens comparativamente à população masculina.

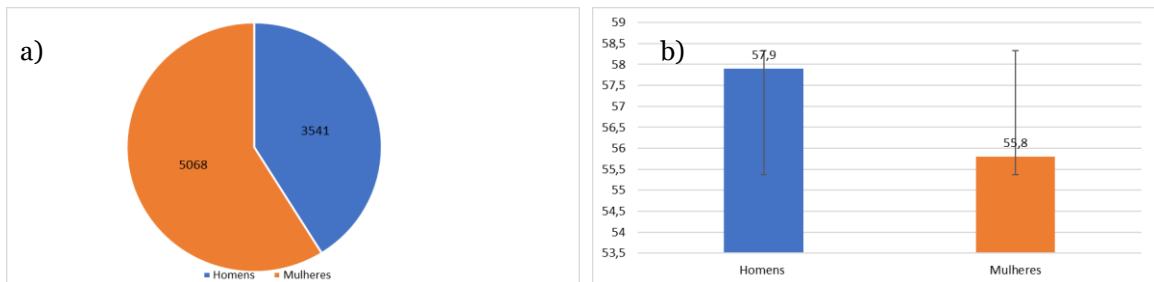


Figura 38- a) Número de testes realizados por género; b) Idade média por género e respetivo desvio padrão

Das 8609 amostras estudadas, apenas 60 foram positivas (0,7 %), correspondentes a 33 doentes positivos. Destes doentes que testaram positivo, 16 correspondem a indivíduos do sexo masculino e 17 do sexo feminino. Dos doentes positivos, apenas 4 foram “casos importados” (pessoas que contraíram a infeção por SARS-CoV-2 noutros países). Além disso, 1 dos casos positivos deu origem a óbito e, tratava-se de um indivíduo do sexo feminino pertencente ao grupo de risco por ser uma pessoa idosa e por já ter complicações cardíacas (Figura 39).

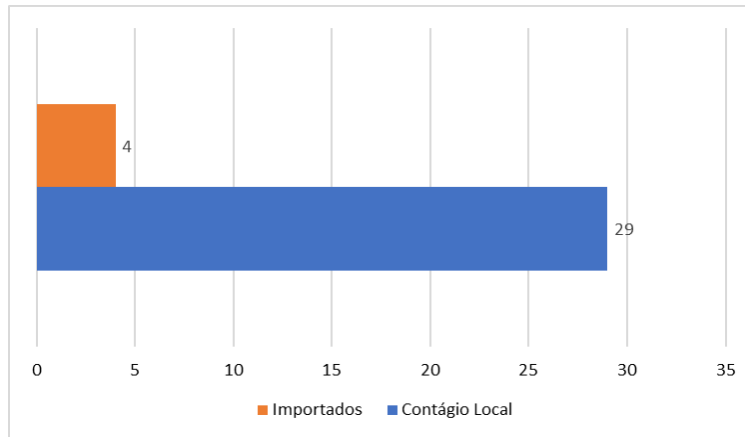


Figura 39- Tipo de contágio

2.4.2 Caracterização Clínica dos Casos Estudados em Contexto Hospitalar no CHUCB

Dos 33 casos positivos, apenas para 13 destes casos foi possível recolher informação clínico-laboratorial ao diagnóstico (tempo zero – t₀) e quando tiveram o primeiro teste negativo para SARS-CoV-2 (tempo um – t₁).

Analisando os casos positivos, do ponto de vista clínico, o sintoma mais frequente foi a febre, seguido de tosse e expectoração. Num reduzido número de casos, os doentes referiram anorexia e astenia (Figura 40).

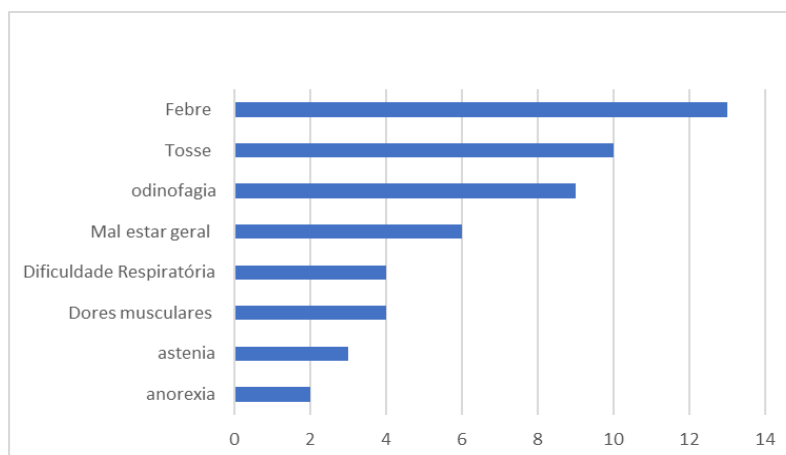


Figura 40- Sintomas registados no CHUCB

Do ponto de vista laboratorial, relativamente aos parâmetros hematológicos, os valores médios de hemoglobina (Hb), leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e plaquetas não revelaram

alterações nos tempos t0 e t1. Contudo, quando analisado os dados caso a caso, verificou-se no t0, 15% (n=2) apresentou anemia e trombocitopenia, e 23% (n=3) apresentou leucopenia (Tabela 9).

Tabela 9- Valores médios dos parâmetros hematológicos; V.R= valores de referência

	Hemoglobina (g/dL)	Leucócitos (10 ³ /uL)	Neutrófilos (10 ³ /uL)	Linfócitos (10 ³ /uL)	Plaquetas (10 ³ /uL)
t0	14,0 ± 1,8	5,6 ± 1,8	3,7 ± 2,0	1,5±0,6	191,5 ± 62,7
t1	13,7 ± 1,8	6,6 ± 1,4	3,8 ± 1,5	2,3±1,0	256,4 ± 48,9
V.R	13.6 - 18.0	4-10	1.5- 8.0	0.8 - 4.0	140 - 440

Apesar dos valores de referência para alguns dos parâmetros analisados serem diferentes entre os sexos (ex: Hb, AST, ALT e creatinina), a totalidade dos dados foi tratada conjuntamente uma vez que quando houve alteração dos valores esta foi bastante significativa.

No que se refere aos parâmetros que avaliam a função hepática, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ALT e AST), verificou-se que ambos estavam alterados no t0. O valor médio de AST era de 46,3 ± 37,9 e o de ALT era 54,0 ± 46,7. No caso específico da AST, verificou-se que 100% dos doentes, no t1, tiveram valores normais para este parâmetro. Ao contrário do que se verificou na AST, o valor médio de ALT no t1 manteve-se fora do intervalo de normalidade, apesar de se ter verificado uma diminuição dos valores do t0 para o t1. Ao t1 63% (n=8) dos doentes ainda mostravam alteração dos valores de ALT (Tabela 10).

A par da avaliação da função hepática, foi estudada a função renal dos doentes. Contudo, quer no t0 e quer no t1, não se verificou alteração dos valores de creatinina na totalidade dos doentes (Tabela 10).

Por último, é de referir que em todos os doentes foi doseada a PCR em ambos os tempos (t0 e t1). Os resultados revelaram que houve uma melhoria dos valores médios da PCR do t0 para o t1. No t0, 75% (n=10) dos doentes apresentavam alteração deste parâmetro, enquanto que no t1, apenas 46% (n=6) tinham valores de PCR elevados (Tabela 10).

Tabela 10- Valores médios dos parâmetros que avaliam a função hepática, renal e a PCR

	AST (U/L)	ALT (U/L)	PCR (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
t0	46,3 ± 37,9	54,0 ± 46,7	2,1 ± 2,1	0,92 ± 0,23
T1	29,3 ± 10,3	46,0 ± 18,0	0,71 ± 0,86	0,87 ± 0,10
V.R.	0 - 38	0 - 41 U/L	0.00 - 0.50	0.70 - 1.20

Os resultados dão indicação que, entre os casos positivos, houve um número superior de infeções por SARS-CoV-2 em mulheres do que em homens, embora esta diferença não apresente significância estatística. Num estudo epidemiológico realizado em Wuhan, em que foram estudados 99 doentes infetados com SARS-CoV-2, foi observado uma tendência contrária, uma maior incidência de casos positivos em homens⁹⁴. De forma semelhante, estudos epidemiológicos feitos no contexto dos surtos por SARS-CoV e MERS-CoV, revelaram também uma maior incidência de casos positivos em homens^{95,96}. Contudo, em Portugal, os dados da Direção Geral da Saúde apontam para um maior número de mulheres afetadas⁹⁷. Como a amostragem deste trabalho foi muito pequena, não se consegue obter um resultado com significância estatística que permita afirmar com certeza, qual tendência que se verifica na Cova da Beira. Estudos com uma amostragem maior seriam necessários para perceber se existe essa tendência.

Do ponto de vista clínico, a febre foi o sintoma mais frequentemente observado. Apesar da febre ser apontada, pela bibliografia, como o sintoma mais comum, um estudo realizado em Nova York com 5700 doentes, hospitalizados com COVID-19, reportou febre apenas em 30% dos casos⁹⁸.

Os achados laboratoriais que avaliam a função hepática (AST e ALT) mostraram que os doentes, diagnosticados com COVID-19 no CHUCB, apresentaram alteração dos valores de normalidade das enzimas hepáticas. O presente estudo, apesar de não ter um número de amostras significativo, revelou ser concordante com outros estudos, relativamente à alteração da função hepática dos doentes com COVID-19^{99,100,101,102,103}. Um estudo recente, com 156 doentes com COVID-19, revelou que 41% dos doentes apresentavam alteração das enzimas hepáticas, sendo essa alteração mais significativa na ALT. Nesse mesmo estudo, para além de ter mostrado que o comprometimento hepático é uma característica comum nos doentes infetados com SARS-CoV-2, mostrou também que a alteração das enzimas hepáticas está intimamente associada à gravidade da doença¹⁰³. Apesar de ainda não estarem identificadas as causas que levam à disfunção hepática na COVID-19, pensa-se que esta pode estar correlacionada com a replicação do vírus no organismo humano, com comorbidades prévias à infeção, ou ser consequência da

toxicidade das terapêuticas instituídas aos doentes¹⁰⁴. Contudo, estudos mais robustos serão necessários para compreender este fenómeno.

O presente estudo revelou também que os doentes do CHUCB com COVID-19 apresentavam níveis elevados de PCR, principalmente ao diagnóstico. De acordo com a literatura, isso ocorre devido à hiperativação do sistema imunológico em resposta à infeção viral, que conduz a uma resposta inflamatória intensa¹⁰⁵. Está também descrito que níveis elevados de PCR, em doentes SARS-CoV-2 positivos, estão associados a produção elevada de citocinas e lesão hepática¹⁰⁶.

Apesar de não se terem observado alterações na função renal nos doentes estudados, está descrito que o SARS-CoV-2 pode afetar diretamente os rins, devido a sobreexpressão da ACE2. De acordo com um estudo realizado recentemente, a expressão da ACE2 nestes doentes pode ser 100 vezes superior ao normal nos rins, comparativamente aos valores de ACE2 nos pulmões. Está descrito que este aumento tão elevado de ACE2 ao nível renal causa dano nas células tubulares renais ¹⁰⁵.

2.5 Conclusão e Perspectivas Futuras

Desde o início da pandemia COVID-19, têm sido realizados inúmeros estudos para tentar compreender ao pormenor como é que esta patologia se transmite e afeta os humanos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo compreender como é que a região da Cova da Beira foi afetada pelo SARS-CoV-2 no início da pandemia. A análise dos dados mostrou-nos que esta região foi pouco afetada na primeira vaga da COVID-19 em Portugal. Infelizmente, não foi possível realizar uma caracterização epidemiológica pormenorizada da população testada na Cova da Beira por ausência de dados. Na realidade, o presente estudo tem algumas limitações, nomeadamente: ausência de informação sobre origem geográfica das amostras, bem como de sintomas clínicos de todos os suspeitos; número reduzido de casos positivos e ausência de informação clínica e laboratorial para todos eles. Contudo, apesar das limitações descritas anteriormente, foi possível perceber que nos doentes COVID-19 positivos, acompanhados no CHUCB, o órgão mais afetado parece ter sido o fígado. Uma amostragem maior seria necessária, para que pudessemos afirmar com certeza esta e outras hipóteses. Assim, como perspectivas futuras, será interessante fazer-se um estudo mais exaustivo e detalhado do impacto da COVID-19 na região da Cova da Beira, sobre uma amostragem maior de casos positivos, que certamente resultará da segunda vaga desta pandemia no país.

Referências Bibliográficas

1. Centro Hospitalar Cova da Beira - Centro Hospitalar Cova da Beira. <http://www.chcbeira.pt/?cix=457&ixf=seccao&lang=1>. Acedido 16 de Novembro de 2019.
2. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA - Centro Hospitalar Cova da Beira. <http://www.chcbeira.pt/?cix=729&lang=1>. Acedido 16 de Novembro de 2019.
3. Fredrickson, J. K. *et al.* Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4230–4241 (2004).
4. Dudek, N. K. *et al.* Novel Microbial Diversity and Functional Potential in the Marine Mammal Oral Microbiome. *Curr. Biol.* **27**, 3752-3762.e6 (2017).
5. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical Microbiology - 8th Edition*. (Elsevier Health Sciences, 2016).
6. Differences between Gram Positive and Gram Negative Bacteria. <https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>. Acedido 16 de Novembro de 2019.
7. <https://www.shutterstock.com/es/image-photo/gram-staining-called-grams-method-differentiating-298524665>. Acedido 17 de Novembro de 2019.
8. medtechrush.blogspot: Histopathology – Special Stains. <http://medtechrush.blogspot.com/2009/10/histopathology-special-stains.html>. Acedido 17 de Novembro de 2019.
9. McPherson, R. A. & Pincus, M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods - 22nd Edition*. (Elsevier Health Sciences, 2011).
10. Seeley, H.W. Jr., VanDemark, P.J., Lee, J. J. *Microbes in action - A laboratory manual for Microbiology*. (Freeman and Company, San Francisco, USA, 1991).
11. Murray, P *et al.* *Manual of clinical microbiology - 8th Edition Vol 1*. (ASM, Washington, DC, 2003).
12. Hemolysis of Streptococci- Types and Examples with Images. <https://microbenotes.com/hemolysis-of-streptococci/>. Acedido 20 de Novembro de 2019.
13. KONEMAN, E. *et al.* *Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology - 6th Edition*. (Lippincott Williams &Wilkins, U.S.A, 2006).

14. bioMérieux Portugal | Pioneering diagnostics. <https://www.biomerieux.pt/>. Acedido 24 de Novembro de 2019.
15. Zimbardo, M. *Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media - 2th Edition*. (BD Diagnostics—Diagnostic Systems: Sparks, MD, USA, 2009).
16. Ellner, P. D., Stoessel, C. J., Drakeford, E. & Vasi, F. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 502–504 (1966).
17. Ajello, L., L.K. Georg, W. Kaplan, and L. K. *CDC laboratory manual for medical mycology*. (U.S. Government Printing Office, 1963).
18. Faddin, J. Mac. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*. (Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1985).
19. Schiemann, D. A. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1298–1304 (1979).
20. Garcia, L.S. *Clinical microbiology procedures handbook*. vol. 1 (American Society for Microbiology, 2010).
21. Casillas, E., Kenny, M. A., Minshew, B. H. & Schoenknecht, F. D. Effect of ionized calcium and soluble magnesium on the predictability of the performance of Mueller-Hinton agar susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* with gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 987–992 (1981).
22. Goodwin, C. S. & Armstrong, J. A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* vol. 9 1–13 (1990).
23. Stevenson, T. H., Lucia, L. M. & Acuff, G. R. Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 723–727 (2000).
24. Silcox, V. A., Good, R. C. & Floyd, M. M. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 686–691 (1981).
25. Schuchat, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 11 497–513 (1998).
26. de La Rosa, M., Villareal, R., Vega, D., Miranda, C. & Martinezbrocal, A. Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 779–785 (1983).
27. Barrett, S. P., Mummery, R. V. & Chattopadhyaya, B. Trying to control MRSA causes more

problems than it solves. *Journal of Hospital Infection* vol. 39 85–93 (1998).

28. Aires De Sousa, M. *et al.* Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2590–2596 (1998).

29. Stelzner, A. F. C. Odds, *Candida* and Candidosis, A Review and Bibliography (Second Edition). X + 468 S., 97 Abb., 92 Tab. u. 22 Farbtafeln. London—Philadelphia—Toronto—Sydney—Tokyo 1988. Baillière Tindall (W. B. Saunders). £ 35.00. ISBN: 0-7020-1265-3. *J. Basic Microbiol.* **30**, 382–383 (1990).

30. March, S. B. & Ratnam, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 869–872 (1986).

31. Kudva, I. T., Hatfield, P. G. & Hovde, C. J. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin- producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 892–899 (1997).

32. Cohen Stuart, J. & Leverstein-Van Hall, M. A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents* vol. 36 205–210 (2010).

33. Chapman, G. H. The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci. *J. Bacteriol.* **50**, 201–3 (1945).

34. Abordagem Genética da Doença de Alzheimer Familiar e Relatório de Estágio- Universidade de Lisboa. <https://docplayer.com.br/89168995-Universidade-de-lisboa-faculdade-de-farmacologia.html>. Acedido 25 de Novembro de 2019.

35. Coupe, S. *et al.* Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas: A one-year prospective study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 351–359 (2006).

36. Guerrant, R *et al.* *Tropical infectious diseases : principles, pathogens & practice.* (Elsevier Churchill Livingstone, 2006).

37. Provas de identificação bacteriana aplicadas na microbiologia clínica. https://AIA1317.fandom.com/pt-br/wiki/Aula_prática:_provas_de_identificação_bacteriana_aplicadas_na_microbiologia_clínica. Acedido 05 de Dezembro de 2019.

38. Loeb, L. The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. *J. Med. Res.* **10**, 407–19 (1903).

39. VITEK® 2 Compact | bioMérieux Portugal.

<https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-compact>. Acedido 10 de Dezembro de 2019.

40. Young, E. An Overview of Human Brucellosis. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **21**, (1995).
41. Toma, B., André, G., Pilet, C. & Thibault, D. Diagnostic sérologique de l'infection brucellique de l'homme par l'épreuve à l'antigène tamponné (card test). *Médecine Mal. Infect.* **2**, 25–32 (1972).
42. Bauriaud, R., Lefevre, J. C., Dabernat, H., Lareng, M. B. & Alliaga, D. Diagnostic sérologique de la fièvre de Malte. Etude comparative des tests classiques et d'un test rapide (Rose Bengale). *Médecine Mal. Infect.* **7**, 323–327 (1977).
43. Sultana, S. *et al.* Comparative study of immunochromatographic assay (IgM) and widal test for early diagnosis of typhoid fever. *Mymensingh Med. J.* **21**, 600–604 (2012).
44. Balfour, H. H., Dunmire, S. K. & Hogquist, K. A. Infectious mononucleosis. *Clinical and Translational Immunology* vol. 4 (2015).
45. Bain, B. J. *Blood Cells: A Practical Guide - 4th Edition*. (Wiley-Blackwell, 2007).
46. Kong, H. *A Practical Guide to Internal Quality Control (IQC) for Quantitative Tests in Medical Laboratories (Proposed Guidelines) Educational Material*. (2009).
47. Fuentes-Arderiu, X. *et al.* Internal quality control and ISO 15189. *Accredit. Qual. Assur.* **12**, 369–375 (2007).
48. Hoffbrand, A. V. & Moss, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand*. (Artmed Editora, 2018).
49. Hemostasis. <https://docplayer.info/93182497-Adang-durachim-s-pd-m-kes-dewi-astuti-ssi-m-biomed-fahreis-hertansyah-pohan-s-sn.html>. Acedido 15 de Janeiro de 2020.
50. Bain, B. J., Clark, D. M. & Wilkins, B. S. *Bone Marrow Pathology*. (Wiley-Blackwell, 2010).
51. Kunwandee, J., Srivorakun, H., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K. & Fucharoen, S. ARKRAY ADAMS A1c HA-8180T analyzer for diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies common in southeast Asia. *Lab. Med.* **45**, E112–E121 (2014).
52. A Level Biology OCR Revision. <https://studyrrocket.co.uk/revision/a-level-biology-ocr/exchange-and-transport/transport-in-animals>. Acedido 20 de Janeiro de 2020.
53. Weykamp, C. HbA1c: A review of analytical and clinical aspects. *Annals of Laboratory Medicine* vol. 33 393–400 (2013).

54. Goldstein, D. E. *et al.* Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* vol. 27 1761–1773 (2004).
55. *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography Principles and Methods* GE Healthcare. <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=14026>. Acedido 05 de Fevereiro de 2020.
56. Thomas, P. D. & Goodwin, J. S. Diagnostic importance of an elevated erythrocyte sedimentation rate in the elderly. *Clin. Rheumatol.* **6**, 177–180 (1987).
57. Casso, G., Lanzi, F. & Marcucci, C. E. In Perioperative Hemostasis. in 45–63 (Springer, 2015).
58. Mackie, I., clinics, R. P.-I. anesthesiology & 1985, undefined. Vascular integrity and platelet function. *journals.lww.com*.
59. *Flow Cytometry Flow Cytometry Basics Guide*. <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/flow/flow-cytometry-basics-guide.pdf>. Acedido 05 de Março de 2020.
60. Bektaş, O. *et al.* The relationship between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS - COV - 2) pandemic and fragmented QRS. *J. Electrocardiol.* **62**, 10–13 (2020).
61. Bchetnia, M., Girard, C., Duchaine, C. & Laprise, C. The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. *Journal of Infection and Public Health* (2020) doi:10.1016/j.jiph.2020.07.011.
62. Wu, Y. *et al.* Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain, Behavior, and Immunity* vol. 87 18–22 (2020).
63. Li, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology* vol. 92 424–432 (2020).
64. da Silva, P. G., Mesquita, J. R., de São José Nascimento, M. & Ferreira, V. A. M. Viral, host and environmental factors that favor anthroozoonotic spillover of coronaviruses: An opinionated review, focusing on SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Sci. Total Environ.* **750**, 141483 (2021).
65. Ma, C. *et al.* From SARS-CoV to SARS-CoV-2: safety and broad-spectrum are important for coronavirus vaccine development. *Microbes Infect.* **22**, 245–253 (2020).
66. Liu, H. L. *et al.* Gene signatures of SARS-CoV/SARS-CoV-2-infected ferret lungs in

short- and long-term models. *Infect. Genet. Evol.* **85**, 104438 (2020).

67. Gorbalenya, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology* vol. 5 536–544 (2020).

68. Jaiswal, N. K. & Saxena, S. K. Classical Coronaviruses. in 141–150 (Springer, Singapore, 2020). doi:10.1007/978-981-15-4814-7_12.

69. Direção-Geral da Saúde. <https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/coronavirus/mers-cov.aspx>. Acedido 29 de Agosto de 2020.

70. de Sousa, A. K., Magalhães, D. de A., Ferreira, J. dos S. & Barbosa, A. L. dos R. SARS-CoV-2-mediated encephalitis: Role of AT2R receptors in the blood-brain barrier. *Med. Hypotheses* **144**, 110213 (2020).

71. Prathiviraj, R., Kiran, G. S. & Selvin, J. Phylogenomic proximity and comparative proteomic analysis of SARS-CoV-2. *Gene Reports* **20**, 100777 (2020).

72. Péré, H. *et al.* Unexpected diagnosis of COVID-19-associated disorders by SARS-CoV-2-specific serology. *J. Clin. Virol.* 104568 (2020) doi:10.1016/j.jcv.2020.104568.

73. Doença por coronavírus (COVID-19). <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acedido 1 de Setembro de 2020.

74. Ponto de Situação Atual em Portugal - COVID-19. <https://covid19.min-saude.pt/ponto-de-situacao-atual-em-portugal/>. Acedido 1 de Setembro de 2020.

75. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Acedido 11 de Setembro de 2020.

76. Hossain, M. G., Javed, A., Akter, S. & Saha, S. SARS-CoV-2 host diversity: An update of natural infections and experimental evidence. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2020) doi:10.1016/j.jmii.2020.06.006.

77. Van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine* vol. 382 1564–1567 (2020).

78. Bae, T. W., Kwon, K. K. & Kim, K. H. Mass Infection Analysis of COVID-19 Using the SEIRD Model in Daegu-Gyeongbuk of Korea from April to May, 2020. *J. Korean Med. Sci.* **35**, E317 (2020).

79. Gestão Terapêutica | Diretrizes de tratamento COVID-19. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapeutic-management/>. Acedido 18 de

Outubro de 2020.

80. A joia da coroa | Coronavírus (COVID-19). <https://www.blogs.unicamp.br/covid-19/a-joia-da-coroa/>. Acedido 14 de Setembro de 2020.
81. Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* **12**, 135 (2020).
82. Li, B. *et al.* Discovery of Bat Coronaviruses through Surveillance and Probe Capture-Based Next-Generation Sequencing. *mSphere* **5**, (2020).
83. Xu, X. *et al.* Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. **63**, 457–460 (2020).
84. Tai, W., Zhang, X., He, Y., Jiang, S. & Du, L. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. *Antiviral Res.* **179**, 104820 (2020).
85. Zhu, H. *et al.* The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 130 115984 (2020).
86. Chan, J. F. W. *et al.* Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 58 (2020).
87. Hoffmann, B. *et al.* A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology* vol. 139 1–23 (2009).
88. Protótipo para apoiar o diagnóstico do Covid-19 - Agência Unesp de Inovação. <https://auin.unesp.br/noticias/516/pesquisadores-do-campus-de-sao-vicente-e-startup-filha-da-unesp-desenvolvem-prototipo-para-apoiar-o-diagnostico-do-covid-19>. Acedido 17 de Setembro de 2020.
89. Corman, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
90. Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* vol. 26 112–125 (1999).
91. Ryazantsev, D. Y. *et al.* Two-dye and one- or two-quencher DNA probes for real-time PCR assay: Synthesis and comparison with a TaqMan™ probe. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 59–68 (2012).
92. *Instructions for Use Rx USE ONLY In Vitro Diagnostic GeneFinder™ COVID-19 Plus*

RealAmp Kit. <https://www.fda.gov/MEDIA/137116/download>. Acedido 5 de Outubro de 2020.

93. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 2249–2251 (2020).
94. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* **395**, 507–513 (2020).
95. Badawi, A. & Ryoo, S. G. Prevalence of comorbidities in the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* vol. 49 129–133 (2016).
96. Channappanavar, R. *et al.* Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J. Immunol.* **198**, 4046–4053 (2017).
97. Ponto de Situação Atual em Portugal - COVID-19. <https://covid19.min-saude.pt/ponto-de-situacao-atual-em-portugal/>. Acedido 1 de Setembro de 2020.
98. Richardson, S. *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* **323**, 2052 (2020).
99. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
100. Zhao, X.-Y. *et al.* Clinical characteristics of patients with 2019 coronavirus disease in a non-Wuhan area of Hubei Province, China: a retrospective study. *Springer* doi:10.1186/s12879-020-05010-w.
101. Cai, Q. *et al.* COVID-19: Abnormal liver function tests. *J. Hepatol.* **73**, 566–574 (2020).
102. Guan, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020).
103. Wang, Y. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J. Hepatol.* **73**, 807–816 (2020).
104. Lozano-Sepulveda, S. A., Galan-Huerta, K., Martínez-Acuña, N., Arellanos-Soto, D. & Rivas-Estilla, A. M. SARS-CoV-2 another kind of liver aggressor, how does it do that? *Annals of Hepatology* (2020) doi:10.1016/j.aohep.2020.08.062.
105. Tsatsakis, A. *et al.* SARS-CoV-2 pathophysiology and its clinical implications: An integrative overview of the pharmacotherapeutic management of COVID-19. *Food Chem. Toxicol.* **146**, 111769 (2020).

106. Li, L. *et al.* Risk factors related to hepatic injury in patients with corona virus disease 2019. *medRxiv* 2020.02.28.20028514 (2020) doi:10.1101/2020.02.28.20028514.

Anexo I- Declaração de Estágio Na Secção de Microbiologia

DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que Janise Giselle Caetano Rodrigues efectuou estágio na secção de microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do CHUCB durante o período de 9 de Setembro até 20 de Dezembro de 2019. Durante esse período efectuou os diferentes procedimentos inerentes a um laboratório de microbiologia, com empenho e dedicação, efectuando tarefas com um grau de complexidade crescente. Demonstrou sempre um elevado grau de responsabilidade pelo que progressivamente passou a efectuar as suas tarefas de forma autónoma supervisionada por um elemento mais diferenciado da equipa.

Aprendeu e executou as diversas metodologias laboratoriais, desde sementeiras dos diferentes tipos de amostras nos respectivos meios de cultura. Efectuou testes de identificação presuntiva dos diferentes microrganismos. Efectuou colorações de Gram e Zhiel-Neelsen, bem como antibiogramas manuais e automatizados e por testes de microdiluição. Efectuou testes imunocromatográficos e testes serológicos de aglutinação e titulação de anticorpos;

Processou amostras para pesquisa micobactérias por PCR em equipamento automatizado GenExpert.

Por ser verdade passo a assinar e datar a presente declaração.

1
P 7 de Maio de 2020
Directora do Serviço de Patologia Clínica do CHUCB
M. Conceição Faria



Anexo II- Declaração de Estágio na Secção de Hematologia

DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que Janise Giselle Caetano Rodrigues efectuou estágio na secção de hematologia do Serviço de Patologia Clínica (SPC) do CHUCB durante o período de 6 de Janeiro até 6 de Março de 2020.

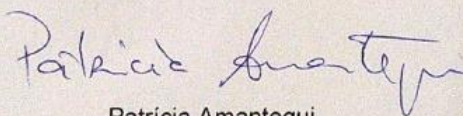
Durante esse período efectuou os diferentes procedimentos inerentes a um laboratório de hematologia, com empenho e dedicação, efectuando tarefas com um grau de complexidade crescente. Demonstrou sempre um elevado grau de responsabilidade pelo que progressivamente passou a efectuar as suas tarefas de forma autónoma, supervisionada por um elemento mais diferenciado da equipa.

No decorrer do estágio conheceu e compreendeu os princípios de funcionamento dos equipamentos utilizados na secção de hematologia, bem como as metodologias específicas de cada um. Acompanhou e executou o processamento das amostras nos diferentes equipamentos. Executou e corou esfregaços de sangue venoso periférico de forma automática e manual.

Por ser verdade passo a assinar e datar a presente declaração.

25 de Outubro de 2020

Responsável pela Secção de Hematologia de SPC do CHUCB



Patrícia Amantegui

(Assistente Graduada de Patologia Clínica)

Anexo III- Declaração do Laboratório de Testes de Diagnóstico do COVID-19 do CICS-UBI



DECLARAÇÃO

Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro, na qualidade de Coordenadora do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), e responsável pelo laboratório de testes de diagnóstico da COVID-19 do CICS-UBI, localizado nas instalações do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, declara que *Janise Giselle Caetano Rodrigues* exerceu atividade neste laboratório, como bolsista do Instituto do Emprego e Formação Profissional, entre 5 de junho e 31 de julho de 2020, desempenhando funções relacionadas com os processos de inativação viral e extração de RNA.

Covilhã e UBI, 24 de agosto de 2020

SÍLVIA
CRISTINA DA
CRUZ
MARQUES
SOCORRO

Assinado de forma digital por SÍLVIA CRISTINA DA CRUZ MARQUES SOCORRO
Dados: 2020.08.24 17:55:16 +01'00'

Sílvia Socorro
(*Professora Catedrática*)

CICS-UBI, Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Av Infante D. Henrique
6200-506 Covilhã
Tel.: +351 275 329 053 | E-mail: ssocorro@fcsaude.ubi.pt

Universidade da Beira Interior | Faculdade de Ciências da Saúde
Avenida Infante D. Henrique
6200-506 Covilhã | PORTUGAL
Tel.: +351 275 319 700 | E-mail: pcabral@ubi.pt
www.ubi.pt