

Relatório de Estágio em Biopatologia Molecular no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de São João

Ana Catarina Duarte Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Sandra Paula da Costa Pinto da Silva Rebelo

Co-orientadora: Prof^a. Doutora Isabel Maria Theriaga Mendes Varanda
Gonçalves

abril de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Ana Catarina Duarte Gomes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11992 do Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 24/04/2024

***“However difficult life may seem,
there is always something
you can do and succeed at.”***

Stephen Hawking

Agradecimentos

Ao concluir este ciclo de estudos, gostaria de agradecer a algumas pessoas, que de alguma forma, foram essenciais durante este percurso e contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço ao Professor Doutor Tiago Guimarães, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), pela oportunidade de realização do estágio nesta instituição.

À minha orientadora, Professora Doutora Sandra Rebelo, pela orientação dedicada, pelo conhecimento partilhado e pelo apoio constante, que foram fundamentais, tanto para o meu crescimento pessoal como acadêmico.

Aos técnicos do Laboratório de Biopatologia Molecular (LBM), à Sílvia, à Ana Luísa, ao Sérgio, ao Emanuel, à Sara, à Patrícia Jegundo, à Barbara, à Patrícia Vieira e à Rosário, que gentilmente me acolheram e compartilharam o seu conhecimento comigo ao longo de todo o estágio.

À Dona Rosalina, ao Miguel e ao Doutor Rui Farinha, pelo carinho e companhia durante esta nova etapa.

Não posso deixar de agradecer, à Professora Doutora Isabel Gonçalves, que aceitou ser a minha co-orientadora, e foi crucial na orientação e correção do meu trabalho.

Aos meus amigos, pela amizade, pela companhia, pelas brincadeiras, pelo incentivo mútuo e por tornarem esta cidade na minha segunda casa.

Ao meu namorado, pelo companheirismo, compreensão, motivação e suporte incondicional, que foram essenciais para que eu pudesse enfrentar os desafios e celebrar as conquistas desta etapa.

Por último e mais importante, aos meus pais, Clara e Rui, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e pelo exemplo de determinação e dedicação que sempre me inspiraram. Aos meus irmãos, Diana e Rui Filipe, pelo incentivo, motivação, ajuda e pela presença fundamental em todos os momentos da minha vida. A toda a minha família, particularmente a minha avó e o meu primo Luís, por toda a ajuda, apoio e impulso nesta nova etapa. Sem vocês nada disto seria possível, muito obrigada por tudo!

Resumo

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades realizadas no estágio curricular no âmbito do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior.

O estágio teve a duração de nove meses e decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ) no Porto, no laboratório de Biopatologia Molecular.

Durante o período de estágio foi possível integrar a equipa técnica e realizar a identificação molecular de vários microrganismos, aplicar diversos conhecimentos adquiridos no percurso académico e obter uma visão abrangente sobre a importância do diagnóstico clínico-laboratorial num hospital de referência, como é o caso do CHUSJ.

Neste relatório também está descrito um pequeno projeto de investigação onde se realizou o diagnóstico diferencial de duas patologias com lesões macroscopicamente semelhantes, nomeadamente Monkeypox e o Molusco contagioso, com abordagens clínicas completamente diferentes.

Palavras-chave

Centro Hospitalar Universitário de São João; Laboratório; Análises; Patologia Clínica; Biopatologia Molecular; Monkeypox; Molusco contagioso.

Abstract

The aim of this report is to describe the activities carried out during the curricular internship as part of the Master's Degree in Biomedical Sciences at the University of Beira Interior.

The internship lasted nine months and took place at the Clinical Pathology Service of the University Hospital Center of São João (UHCSJ) in Porto, in the Molecular Biopathology Laboratory.

During the internship period, it was possible to integrate a laboratory work routine, apply various skills acquired during my academic career and gain a comprehensive overview of the importance of clinical diagnosis in a clinical analysis laboratory at a reference hospital, such as UHCSJ.

This report also describes a small research project in which the differential diagnosis of two pathologies with macroscopically similar lesions was carried out, namely Monkeypox and Molluscum contagiosum, with completely different clinical approaches.

Keywords

University Hospital Center of São João; Laboratory; Analysis; Clinical Pathology; Molecular Biopathology; Monkeypox; Molluscum contagiosum.

Índice

Parte 1: Relatório de Estágio

1. Introdução	1
2. Serviço de Patologia Clínica	2
2.1. Biopatologia Molecular	2
3. Obtenção, conservação e processamento das amostras biológicas	4
3.1. Infecções Respiratórias	4
3.1.1. Infecções Respiratórias Víricas	5
3.1.2. Infecções Respiratórias Bacterianas	14
3.1.3. Infecções Respiratórias Fúngicas	17
3.2. Infecções Gastrointestinais	22
3.2.1. Infecções Gastrointestinais Víricas	22
3.2.2. Infecções Gastrointestinais Bacterianas	26
3.2.3. Infecções Gastrointestinais por Parasitas	30
3.3. Infecções da Corrente Sanguínea	34
3.3.1. Viremia	34
3.3.2. Bacteremia	40
3.3.3. Fungemia	43
3.4. Meningites e outras infecções do Sistema Nervoso Central	47
3.4.1. Meningite Bacteriana	48
3.4.2. Meningite Vírica	51
3.5. Infecções Sexualmente Transmissíveis	55
3.5.1. Infecções Sexualmente Transmissíveis Bacterianas	55
3.5.2. Infecções Sexualmente Transmissíveis causadas por parasitas	59
3.5.3. Infecções Sexualmente Transmissíveis Víricas	61
4. Extração de ácidos nucleicos	64
4.1. Lise Celular	64
4.1.1. Lise química	67
4.1.2. Lise enzimática	67
4.2. Purificação de ácidos nucleicos	68
4.2.1. Partículas magnéticas	69
4.2.2. Colunas de sílica	72
5. Amplificação enzimática de DNA	75
5.1. PCR	75

5.1.1.	Princípios e processo da técnica PCR	75
5.1.2.	Componentes PCR	76
5.1.3.	Aplicações da PCR	78
5.2.	PCR em tempo real	79
5.2.1.	Tecnologias de deteção	80
5.2.1.1.	Corantes intercalantes	81
5.2.1.2.	Sondas de hidrólise	81
5.2.1.3.	Sondas de hibridação	83
5.3.	Variações de qPCR	85
5.3.1.	RT-PCR	86
5.3.2.	<i>Nested</i> PCR	86
5.3.3.	<i>Multiplex</i> PCR	87
5.4.	Análise dos resultados	87
5.4.1.	Curvas de amplificação	87
5.4.2.	Curvas de <i>melting</i>	88
5.4.3.	Quantificação dos resultados	90
6.	Controlo de Qualidade	92
7.	Conclusão	94

Parte 2: Projeto de investigação

1.	Introdução	96
1.1.	<i>Monkeypox</i>	96
1.2.	<i>Molluscum contagiosum</i>	97
1.3.	Caso clínico	98
2.	Materiais e métodos	99
3.	Resultados e discussão	100
3.1.	Caracterização das amostras e população de MPX	100
3.2.	Caracterização das amostras e população de MCV	100
3.3.	Análise e discussão dos resultados obtidos nos ensaios de qPCR	100
	Referências bibliográficas	107

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do vírus Influenza.

Figura 2 – Estrutura do Rinovírus.

Figura 3 – Estrutura do vírus Sincicial Respiratório.

Figura 4 – Estrutura do SARS-CoV-2.

Figura 5 – Estrutura do Adenovírus.

Figura 6 – Estrutura e fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 7 – Morfologia da bactéria *Mycoplasma pneumoniae*.

Figura 8 – Interação e patogênese do *Aspergillus fumigatus* com o hospedeiro.

Figura 9 – Ciclo de infecção do *Histoplasma capsulatum*.

Figura 10 – Estrutura do Norovírus.

Figura 11 – Estrutura do Rotavírus.

Figura 12 – Colonização da bactéria *Clostridium difficile*.

Figura 13 – Vias de transmissão da bactéria *Campylobacter jejuni*.

Figura 14 – Ciclo de vida da *Entamoeba histolytica*.

Figura 15 – Ciclo de vida do parasita *Cryptosporidium spp.*

Figura 16 – Estrutura dos viriões do vírus da Hepatite E.

Figura 17 – Estrutura do Citomegalovírus.

Figura 18 – Estrutura do *Epstein-Barr* vírus.

Figura 19 – Patogênese da infecção causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*.

Figura 20 – Vias de transmissão da bactéria *Leptospira spp.*

Figura 21 – Esquema representativo dos principais fatores de patogenicidade dos fungos do gênero *Candida*.

Figura 22 – Diferentes fases da patogénese da bactéria *Neisseria meningitidis*.

Figura 23 – Infecções provocadas pela bactéria *Haemophilus influenzae*.

Figura 24 – Patogénese dos Enterovírus.

Figura 25 – Entrada e libertação do vírus Herpes simplex 2 na membrana celular.

Figura 26 – Quadro clínico de infeções causadas pela bactéria *Chlamydia trachomatis*.

Figura 27 – Fases da patogénese da bactéria *Neisseria gonorrhoeae*.

Figura 28 – Estrutura do parasita *Trichomonas vaginalis*.

Figura 29 – Patogénese das oncoproteínas E6 e E7, do Papilomavírus Humano.

Figura 30 – Procedimento da técnica de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de partículas magnéticas.

Figura 31 – Equipamento automatizado de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de partículas magnéticas, A: QIASymphony, B: EZ1 Advanced XL.

Figura 32 – Procedimento da técnica de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de colunas de sílica.

Figura 33 – Equipamento automatizado de extração de ácidos nucleicos com utilização de colunas de sílica, QIAcube Connect (Qiagen).

Figura 34 – Representação gráfica da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Figura 35 – Termociclador Rotor-Gene Q da marca QIAGEN.

Figura 36 – Estrutura e mecanismo de ação das sondas TaqMan.

Figura 37 – Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hidrólise MGB-TaqMan.

Figura 38 - Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hibridização FRET.

Figura 39 – Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hibridização *Molecular Beacons*.

Figura 40 – Gráfico da curva de amplificação de uma reação de PCR em tempo real.

Figura 41 – Representação gráfica da curva de *melting* de um ensaio de PCR em tempo real (A), gráfico da primeira derivada da curva de *melting* (B).

Figura 42 – Gráfico da curva-padrão determinada após sucessivas diluições de amostras com concentrações de DNA alvo conhecidas.

Figura 43 – Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controlo negativo (A). Curva de amplificação da amostra positiva com Ct igual a 27,37 (B). Interseção da linha vertical vermelha (Threshold) com a curva define o valor de Ct no eixo X. Cycle threshold (Ct).

Figura 44 – Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controlo negativo (A). Curva de amplificação das amostras que amplificaram (amostras positivas e amostras com amplificações inespecíficas) (B). Curva de amplificação das amostras positivas com Cts iguais a 35,23; 37,39; 38,27 e 39,11.

Figura 45 – Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controlo negativo (A). Curva de amplificação da amostra positiva com Ct igual a 21,05 (B).

Figura 46 – Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV das amostras anteriormente positivas com controlo negativo.

Lista de Acrónimos

A	Adenina
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AI	Aspergilose invasiva
C	Citosina
CAR	Recetor do vírus Coxsackie e Adenovírus
cDNA	DNA complementar
CHUSJ	Centro Hospitalar Universitário de São João
CID	Coagulação intravascular disseminada
CMV	Citomegalovírus
CoFe ₂ O ₄	Óxido de ferro de cobalto
COVID-19	Doença Coronavírus
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
dsRNA	RNA de cadeia dupla
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECMO	<i>Extracorporeal Membrane Oxygenation</i>
EDNAS	Ácido 5-(20-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAM	Fluoresceína
Fe ₃ O ₄	Óxido de ferro superparamagnético
FNT	Fator de necrose tumoral
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramma
G	Guanina
GDH	Glutamato Desidrogenase
HA	Hemaglutininas
HEX	Hexacloro-6-carboxifluoresceína
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6	Herpesvírus humano 6
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HHV-8	Herpesvírus humano 8
HPV	Papilomavírus humano
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus herpes simplex tipo 2
Ig	Imunoglobulinas

IgA1	Imunoglobulina A1
ISTs	Infeções sexualmente transmissíveis
JOE	4,5-dicloro-dimetoxi-fluoresceína
kb	Kilo bases
kpb	Kilo pares de bases
LBM	Laboratório de Biopatologia Molecular
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPS	Lipopolissacarídeos
MCV	<i>Molluscum contagiosum</i> vírus
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligramas
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Milímetro
mM	Milimolares
Mpox	Monkeypox
mRNA	RNA mensageiro
NA	Neuraminidases
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanometros
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pRb	Proteína do retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROX	5-carboxirrodamina-X
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RV	Rinovírus
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SiOH	Grupos silanol
SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Serviço de Patologia Clínica
T	Timina
TAMRA	Tetrametilrodamina

TET	Tetracloro-6-carboxifluoresceína
T _m	Tempertaura de <i>melting</i>
UV	Ultravioleta
VHE	Vírus da Hepatite E
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VSR	Vírus sincicial respiratório
VZV	Varicela-zoster
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
μM	Micromolares

Parte 1: Relatório de Estágio

1. Introdução

O presente relatório pretende descrever o estágio curricular realizado no contexto da unidade curricular “Dissertação/Estágio” do 2º ano do Mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior. O estágio em questão teve como objetivo principal a consolidação e a integração dos conhecimentos teóricos adquiridos no decorrer do percurso académico, no contexto de um laboratório clínico.

O estágio curricular foi realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC), mais especificamente no laboratório de Biopatologia Molecular do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), situado na Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto. O estágio teve a duração de nove meses, de novembro de 2022 a julho de 2023. Desde 1 de Janeiro de 2024, o CHUSJ passou a integrar o modelo Unidade Local de Saúde, passando a designar-se ULS São João. A ULS São João integra o CHUSJ (Pólo do Porto e Pólo de Valongo) e os Cuidados de Saúde Primários da Maia, Valongo e Porto Oriental.

Em termos estruturais, a dissertação está organizada em duas partes. A primeira parte é constituída por sete capítulos, onde se faz a descrição do estágio curricular e a segunda descreve um pequeno projeto de investigação que teve como objetivo realizar o diagnóstico diferencial de duas patologias com lesões macroscópicas semelhantes, mais especificamente Monkeypox e Molusco contagioso.

2. Serviço de Patologia Clínica

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) pertence ao Centro de Medicina Laboratorial do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), onde estão também integrados os Serviços de Anatomia Patológica, Medicina Nuclear, Neurorradiologia, Radiologia e Radioterapia. O SPC está organizado em várias Áreas: Conhecimento e Investigação, Apoio e Suporte, Pré-Analítica e Laboratorial. Esta última integra os Laboratórios Central e de Microbiologia e os Laboratórios Complementares, que incluem os Laboratórios de Biopatologia Molecular, Hematologia e Citologia, Imunologia, Química Clínica e Serologia. O objetivo principal do SPC consiste em realizar o diagnóstico transversal de inúmeras patologias, recorrendo a metodologias cada vez mais sensíveis e específicas.

Para garantir a qualidade dos exames laboratoriais e a segurança dos pacientes, o laboratório tem de cumprir as etapas previstas: fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Kearney, 2013). A fase pré-analítica engloba todos os procedimentos que antecedem a análise laboratorial, desde o pedido da realização de exames, recolha e transporte das amostras, até à preparação da amostra. A fase analítica é definida pelo processo de realização da análise no laboratório, de acordo com o sistema analítico utilizado. Por último, a fase pós-analítica inclui a emissão e comunicação dos resultados ao paciente ou ao médico responsável. A qualidade do laboratório está diretamente relacionada com o rigor das determinações laboratoriais (Mukherjee *et al.*, 2013).

O SPC recebe amostras biológicas dos vários hospitais do Norte de Portugal, como o Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa (Hospital Padre Américo), o Centro Hospitalar Trás-os-Montes e Alto Douro, o Centro Hospitalar de Entre Douro e Vouga, o Hospital Santa Maria Maior, ou o IPO Porto.

A equipa multidisciplinar do SPC, sob a direção e coordenação do Professor Doutor Tiago Guimarães, é formada por médicos especialistas em Patologia Clínica, médicos internos de Formação Especializada, Técnicos Superiores de Saúde, Técnico Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, Assistentes Técnicos e Assistentes Operacionais.

2.1. Biopatologia Molecular

A biopatologia molecular é um campo de pesquisa interdisciplinar que desempenha um papel crucial na compreensão da base molecular das doenças. Esta área do conhecimento realiza uma combinação dos princípios da biologia molecular com a patologia, a fim de investigar as modificações genéticas, epigenéticas e celulares, responsáveis pelo surgimento de doenças. Nas últimas décadas, houve avanços tecnológicos significativos, o que possibilitou um progresso

surpreendente na capacidade de identificar as causas moleculares de diversas doenças, do cancro até às doenças genéticas raras (Akhtar *et al.*, 2011).

A biopatologia molecular reconhece uma origem ou participação molecular subjacente a muitas doenças. Em contraste com a abordagem convencional da patologia, que se limita a descrever as características macroscópicas das doenças, a biopatologia molecular foca-se na identificação das anomalias a nível molecular responsáveis pelo surgimento, evolução e sintomas clínicos dessas doenças. Com esse propósito, são empregues diversas metodologias da biologia molecular, genética, genómica, proteómica e áreas afins, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), *multiplex* PCR, *microarrays* de DNA (ácido desoxirribonucleico), hibridação *in situ*, sequenciação de RNA (ácido ribonucleico) *in situ*, sequenciação de DNA, edição de genes e *Western Blot*.

A biopatologia molecular possibilita não somente uma compreensão da base molecular das doenças, mas também proporciona um diagnóstico mais preciso, o avanço de terapias direcionadas e o desenvolvimento de estratégias em medicina personalizada. Além disso, a biopatologia molecular possui uma função vital na área da investigação biomédica, na identificação de novas possibilidades de tratamento e na análise da eficácia das terapêuticas farmacológicas (Akhtar *et al.*, 2011).

O laboratório de Biopatologia Molecular (LBM) do CHUSJ encontra-se dividido em 3 secções sequencialmente organizadas: a receção e processamento das amostras, a extração de ácidos nucleicos e a amplificação de ácidos nucleicos.

3. Obtenção, Conservação e Processamento de Amostras Biológicas

As amostras destinadas ao SPC são rececionadas nas Secretaria do Laboratório Central (pisos 4, Ala Poente – dias úteis das 15-20h, fins de semana, feriados e período noturno entre 20-8h) e na Secretaria de Apoio (pisos 5 da Ala Poente – dias úteis das 8-15h). Estas, só são aceites perante a identificação correta e em recipiente adequado, de acordo com a requisição médica, prescrita *online* via software *Clinidata Web*, se pertencerem ao CHUSJ, ou com requisição escrita, se forem de instituições exteriores. Depois da receção das amostras, estas são separadas e dirigidas aos respetivos laboratórios para o seu processamento. Quando chegam ao LBM, as amostras são rececionadas na secção de “Receção e processamento de amostras”, onde se decide qual o processamento, dependendo da suspeita de diagnóstico, do tipo de amostra, da urgência do resultado e das condicionantes do paciente.

O tipo de amostra recebido no LBM é variado, dependendo da suspeita clínica, mas virtualmente aceita-se qualquer tipo de amostra para diagnóstico molecular. As amostras mais comuns incluem sangue, LCR, líquidos pleurais, pericárdicos, peritoneais, urina, fezes, secreções brônquicas, lavados brônquicos e brônquio-alveolares, exsudados naso e orofaríngeos, exsudados rectais, uretrais, vaginais, oculares e de lesões cutâneas, biópsias tecidulares, biópsias incluídas em blocos de parafinas, pontas de cateter, dispositivos médicos e medula óssea.

3.1. Infecções respiratórias

As infeções respiratórias são um grande desafio para a saúde pública. As doenças respiratórias podem variar em gravidade, desde a gripe comum, que é uma condição leve, até à pneumonia, que pode ser considerada uma condição mais grave. As infeções respiratórias são causadas por diferentes agentes infecciosos, sendo frequentes os vírus, as bactérias e os fungos.

É de grande importância compreender a diversidade de patógenos que estão envolvidos, assim como os sintomas clínicos e as estratégias de diagnóstico e tratamento, a fim de combater efetivamente essas doenças e reduzir o impacto que causam na sociedade. A redução da incidência de infeções respiratórias depende de medidas preventivas, como a vacinação e a adoção de boas práticas de higiene. São imprescindíveis pesquisas contínuas, com o intuito de desenvolver novas terapias e estratégias preventivas para combater este flagelo que atinge toda a população mundial.

3.1.1. Infecções respiratórias víricas

Os agentes patogênicos mais comuns envolvidos em infecções do trato respiratório superior são os vírus respiratórios. Entre os diferentes vírus que merecem destaque, podemos citar, os vírus Influenza A/B, Rinovírus, Vírus Sincicial Respiratório (VSR), o SARS-CoV-2 e o Adenovírus. Esses vírus penetram nas células das vias respiratórias provocando inflamação, que se manifesta em tosse, rinorreia, odinofagia, febre e dispneia.

Vírus Influenza

O vírus Influenza é membro da família *Orthomyxoviridae* e classifica-se em três tipos principais: A, B e C. O vírus é composto por uma camada lipídica, que contém glicoproteínas essenciais para ligação do vírus às células e possui um genoma de cadeia simples de RNA com sentido negativo, segmentado em 8 partes. As glicoproteínas presentes na superfície do vírus são hemaglutininas (HA), responsáveis pela ligação do vírus às células hospedeiras, neuraminidases (NA), que desempenham um papel importante na libertação das partículas virais recém-formadas das células hospedeiras e matriz 2 (Fig. 1) (Gaitonde *et al.*, 2019).

O vírus Influenza consegue invadir as células-alvo através da ligação da glicoproteína HA aos receptores das células hospedeiras. Os receptores-alvo da HA são geralmente os ácidos siálicos encontrados em glicoproteínas na superfície das células epiteliais das vias respiratórias, e esta ligação desencadeia a internalização do vírus na célula, por endocitose. Depois do vírus entrar na célula hospedeira, dá-se a libertação dos 8 segmentos do genoma de RNA no núcleo para iniciar a transcrição e replicação do vírus. (Luo, 2012). A replicação do vírus leva à lise das células epiteliais, o que provoca um aumento da produção de muco, causando corrimento nasal e tosse (Pleschka, 2013).

Durante o ciclo de replicação do vírus Influenza, a RNA polimerase viral comete erros frequentes na síntese de RNAs virais. Esses erros produzem grande número de variantes genéticas das glicoproteínas HA e NA, o que pode conferir algumas vantagens ao vírus, permitindo-lhe escapar da resposta imune do hospedeiro ou até adquirir resistência a medicamentos antivirais (Luo, 2012). Essa variabilidade genética é um dos principais desafios na prevenção e tratamento da infecção, pois pode levar à rápida evolução do vírus e à emergência de estirpes virais novas ou modificadas. É por este motivo que as vacinas da gripe precisam de ser atualizadas regularmente, acompanhando as mudanças da estirpe circulante do vírus e garantindo uma proteção eficaz contra as formas mais recentes e prevalentes da doença (Luo, 2012).

Entre os vírus Influenza, os do tipo A, são considerados os agentes patogênicos clinicamente mais significativos, e já causaram epidemias graves em seres humanos e animais domésticos. Existem 20 subtipos do vírus influenza A e cada um é caracterizado pela numeração das proteínas HA e NA (por exemplo, H3N2 e H1N1) (Gaitonde *et al.*, 2019).

A transmissão ocorre principalmente através da inalação de partículas respiratórias infecciosas quando uma pessoa infetada tosse ou espirra. Também há evidências de transmissão por via aérea, através de pequenas partículas transmitidas pela fala ou exalação, e por objetos contaminados (Javarian *et al.*, 2021).

O período de incubação tem um período de 18 a 72 horas, mas pode variar de pessoa para pessoa. Os indivíduos infetados podem transmitir a doença a partir de um a dois dias antes do início dos sintomas, continuando a ser contagiosos por um período de cinco a sete dias após o aparecimento dos sinais clínicos (Javarian *et al.*, 2021). A libertação do vírus pode ocorrer de forma prolongada em crianças e em pessoas com o sistema imunológico comprometido.

O vírus Influenza, mais especificamente o tipo A, causa uma infecção respiratória não complicada, a gripe. Os sintomas da gripe são variados e incluem tosse, febre, mialgias, rinorreia e arrepios ou suores e mialgias que persistem durante dois a oito dias. Atipicamente, nas crianças podem ocorrer sintomas gastrointestinais, como vômitos e diarreia (Gaitonde *et al.*, 2019).

O diagnóstico de Influenza é frequentemente efetuado com base nos sintomas da infecção, informações epidemiológicas e testes laboratoriais. A tosse e a febre são os indicadores sintomáticos mais críticos da infecção. Os métodos laboratoriais incluem testes rápidos de antígeno e RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) em tempo real (Pleschka, 2013). A cultura de vírus não é usada em contexto hospitalar. O painel respiratório onde está inserida a detecção do vírus Influenza, consegue detetar 3 subtipos do tipo A, Flu A-H1, Flu A-H1 pdm09 e Flu A-H3 (Gimferrer *et al.*, 2018).

O tratamento é sintomático e centra-se, geralmente, no uso de analgésicos e antipiréticos para alívio dos sintomas e prevenção de complicações, especialmente em casos de infecções graves ou em grupos de risco. Também podem ser prescritos antivirais, como os inibidores de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir e zanamivir) e inibidor de endonucleases (baloxavir), em casos graves ou em pacientes de alto risco. Os antivirais podem ajudar a reduzir a duração da infecção e aliviar os sintomas, mas são mais eficazes quando administrados nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas (Gaitonde *et al.*, 2019).

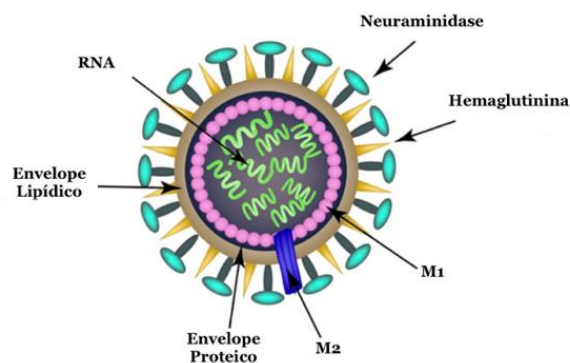


Figura 1. Estrutura do vírus Influenza (adaptado de Ibekwe *et al.*, 2021).

Rinovírus

Os rinovírus (RV) são outro tipo de vírus relatados como uma das principais causas virais de infecções respiratórias graves. Os RV pertencem à família *Picornaviridae* e ao gênero *Enterovirus* e dividem-se em três espécies, RV-A, RV-B e RV-C, as quais são subdivididas em 169 serotipos (Jackson *et al.*, 2022). A sua estrutura é esférica, com cápside icosaédrica e contém um genoma de cadeia simples de RNA com sentido positivo e com um tamanho de cerca de 7 200 nucleótidos (Fig. 2) (Vandini *et al.*, 2019).

A transmissão ocorre principalmente através do contacto físico seguido de autoinoculação, de fômites (objetos contaminados com o vírus), ou através de inalação de gotículas infetadas (Esneau *et al.*, 2022).

O tempo de incubação do RV é de aproximadamente 2 dias. É possível que uma pessoa infetada com rinovírus seja contagiosa vários dias antes de apresentar sintomas e continue a ser durante uma semana ou mais após o início da infeção (Esneau *et al.*, 2022).

O RV é o agente patogénico que mais causa a chamada constipação. Os sintomas da infeção por RV podem variar de leves a moderados, e incluem tosse, odinofagia, rinorreia, cefaleias, arrepios e mal-estar geral (Vandini *et al.*, 2019). Para além de causar sintomas de “gripe”, o RV também pode provocar otite média aguda, rinossinusite, e quadros clínicos mais graves como, doença pulmonar obstrutiva crónica e asma (To *et al.*, 2017).

No trato respiratório superior, o RV afeta, principalmente, as células epiteliais ciliadas, e em menor proporção, as células não ciliadas, podendo ser identificado na mucosa nasal e na nasofaringe posterior. Contrariamente ao vírus Influenza e ao Adenovírus, o RV não provoca citopatologia na linha de células epiteliais nasais humanas, mas, no entanto, possui a capacidade de causar alterações citopáticas nas células epiteliais brônquicas humanas. Para além disso, a infeção por RV pode comprometer a barreira epitelial, resultando em fugas vasculares, produção excessiva de muco, facilitando a ligação, a translocação e a persistência de bactérias (To *et al.*, 2017).

O RV consegue ser detetado no trato respiratório, inferior e no superior. Atualmente, a técnica de RT-PCR é o método mais utilizado para a deteção de RV a partir de amostras respiratórias, uma vez que é muito mais sensível do que a cultura viral (Hirsch *et al.*, 2012).

Até à data, ainda não existem terapias preventivas ou vacinas aprovadas para as infeções por RV. O grande número de serotipos de RV e a sua diversidade genética representam um desafio para o desenvolvimento de agentes antivirais. Os tratamentos disponíveis têm como objetivo reduzir os sintomas causados pela resposta do hospedeiro, em vez de direcionar a sua ação para limitar a replicação do vírus e a duração da infeção (To *et al.*, 2017).

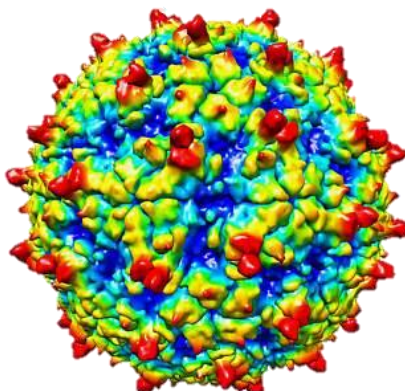


Figura 2. Estrutura do Rinovírus (adaptado de Liu *et al.*, 2016).

Vírus Sincicial Respiratório

O vírus Sincicial Respiratório (VSR) é um vírus altamente contagioso capaz de provocar infecções no trato respiratório, sendo conhecido como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em idade pediátrica, especialmente nos primeiros 6 meses de vida. Nas últimas décadas, constatou-se que a doença também afeta adultos de risco, incluindo idosos e pessoas imunocomprometidos (Nam & Ison, 2019).

O VSR é um vírus encapsulado do género *Pneumovirus* e da família *Paramyxoviridae*. É um vírus de RNA de cadeia simples e sentido negativo, com um genoma de 15,2 kb (kilo bases), codificante para 11 proteínas (Fig. 3). Este vírus tem um genoma não segmentado, pelo que, ao contrário do Influenza, não tem a capacidade de reordenar os segmentos do genoma e, assim, sofrer alterações antigénicas que podem desencadear grandes pandemias (Shang *et al.*, 2021).

De acordo com a variabilidade antigénica, o VSR é dividido em dois subgrupos diferentes, A e B, que se dividem em 13 genótipos A e 20 genótipos B. As reações de duas proteínas de superfície (F e G) aos anticorpos monoclonais foram utilizadas para definir estes dois grupos; a proteína G permite a ligação do vírus às células epiteliais ciliadas das vias respiratórias do hospedeiro, enquanto a proteína F medeia a fusão do virião com as células do hospedeiro (Fig. 3) (Nam & Ison, 2019).

A alta contagiosidade do VSR é explicada pela transmissão através de gotículas infetadas que entram em contacto direto com o nariz, boca ou olhos e também através de superfícies contaminadas, com um período de incubação de 2 a 8 dias. As pessoas infetadas são contagiosas entre 3 e 8 dias (Jha *et al.*, 2016).

O VSR infeta as células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior e inferior. No trato respiratório inferior, o vírus está concentrado nas células epiteliais ciliadas dos bronquíolos, mas também se encontra nos pneumócitos do tipo 1, interferindo na capacidade dos pulmões

realizarem eficientemente as trocas gasosas e nas células dendríticas intraepiteliais, o que influencia a resposta imunológica à infecção viral. Recentemente, foi demonstrado que o VSR tem a capacidade de afetar a morfogênese epitelial das vias aéreas infetando as células basais, células-tronco presentes no epitélio das vias respiratórias, responsáveis pela renovação e reparação do revestimento das vias respiratórias (Jha *et al.*, 2016).

A replicação viral do VSR induz uma resposta inflamatória nas vias respiratórias, o que leva à produção de muco, edema e dano tecidual, causando sintomas como febre, congestão nasal, tosse, rinorreia e dispneia, que por norma aparecem em 3 a 7 dias após o contacto (Shang *et al.*, 2021).

O diagnóstico de VSR é clínico-laboratorial, tendo por base a clínica e testes laboratoriais específicos como, testes de detecção de antígeno e RT-PCR em tempo real. A cultura viral não é utilizada em rotina. Em casos graves ou complicados, a imagiologia pode ser um meio complementar de diagnóstico importante com a realização de radiografias de tórax (Borchers *et al.*, 2013).

Atualmente, não existe tratamento específico para o VSR, mas estão disponíveis medidas e tratamentos de suporte para aliviar os sintomas e reduzir as complicações associadas, especialmente em casos extremos e em grupos de risco, como recém-nascidos prematuros, crianças e idosos. Em casos graves, pode ser necessário suporte respiratório, como oxigenoterapia ou ventilação mecânica. Também podem ser administrados medicamentos antipiréticos e analgésicos para aliviar sintomas como febre, mialgia e desconforto (Jha *et al.*, 2016).

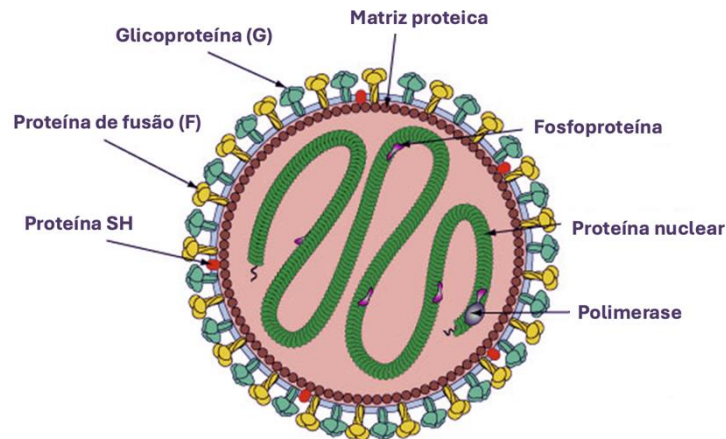


Figura 3. Estrutura do Vírus Sincicial Respiratório (adaptado de <https://www.creative-diagnostics.com/tag-respiratory-syncytial-virus-antigens-51.htm>).

SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), descoberto pela primeira vez na cidade de Wuhan, na China, no final de 2019, é o agente patogénico causador da pandemia COVID-19, uma infeção que rapidamente se espalhou pelo mundo, resultando em milhões de casos confirmados e mortes.

Este vírus, tal como os outros coronavírus, possui uma estrutura característica e um genoma específico que desempenham um papel fundamental na sua capacidade de infetar as células e replicar-se. O SARS-CoV-2 é um vírus com envelope, e de cadeia simples de RNA de sentido positivo, que pertence à família *Coronaviridae*. Este contém um genoma de 26 a 35 kb, que codifica, aproximadamente, 27 proteínas, estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais incluem a proteína do envelope (E), a proteína da nucleocápside (N), a proteína da membrana (M) e a glicoproteína *spike* (S) (Safiabadi Tali et al., 2021). As proteínas E e M estão envolvidas na montagem viral e na modulação da resposta do hospedeiro, enquanto a proteína N complexa-se com o RNA genómico viral para gerar a nucleocápside, ajudando a modular a replicação e tradução do vírus. A proteína S é a principal glicoproteína da superfície do SARS-CoV-2 e esta forma projeções na superfície do vírus, dando-lhe uma aparência de coroa, que dá a origem ao nome do vírus (corona = coroa). Esta proteína desempenha um papel importante na patogénese do vírus, ligando-se ao recetor das células hospedeiras (Fig.4) (Safiabadi Tali et al., 2021).

A patogénese do SARS-CoV-2 é dividida em quatro etapas: invasão, bloqueio primário da imunidade inata antiviral, mecanismos de proteção do vírus contra os fatores da imunidade adaptativa e complicações agudas e de longo prazo da COVID-19. A fase da invasão começa quando o vírus entra no organismo e se liga às células do trato respiratório, particularmente às células epiteliais do pulmão, através da ligação da proteína S ao recetor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) e co-recetores nas células hospedeiras. A variedade de recetores a que o SARS-CoV-2 se consegue ligar, permite que este infete vários tipos de células, mesmo as que não expressam o recetor ACE2. Uma vez dentro das células, tal como os outros vírus, o SARS-CoV-2 começa a replicar-se, utilizando a maquinaria celular do hospedeiro para produzir cópias de si mesmo. Durante a segunda fase, o vírus tem mecanismos para interferir com a primeira linha de defesa do hospedeiro, o que permite que se replique mais nas fases iniciais da invasão. Na terceira fase, o sistema imunológico adaptativo, que inclui células como linfócitos T e linfócitos B, ativa uma resposta mais específica contra o vírus. No entanto, o SARS-CoV-2 desenvolveu várias estratégias para evadir ou suprimir essa resposta imune adaptativa, incluindo mutações que afetam a capacidade do sistema imunológico de reconhecer e neutralizar o vírus. A quarta e última fase está associada à implantação de variantes do SARS-CoV-2, que têm a capacidade de induzir vias autoimunes e auto-inflamatórias da invasão dos tecidos e de desenvolver mecanismos imunossupressores e hiperérgicos da inflamação sistémica (Gusev et al., 2022).

O SARS-CoV-2 é transmitido, principalmente, de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias, mas também pode ocorrer transmissão por meio de contacto com superfícies contaminadas (Gusev *et al.*, 2022)

O período de incubação da COVID-19 varia entre 3 e 14 dias, dependendo do estado do sistema imunitário do hospedeiro. Os sintomas da COVID-19 podem variar de leves a graves e incluem febre, tosse seca, fadiga, dores musculares, odinofagia, congestão nasal, perda de paladar ou olfato e, em alguns casos, dispneia, diarreia, náuseas ou vômitos (Gusev *et al.*, 2022).

Existem vários métodos para detetar o SARS-CoV-2. O método mais comum é através do teste PCR em tempo real, que deteta o gene que codifica a proteína E, o gene N e o gene RdRP do vírus, numa amostra retirada da nasofaringe e/ou da orofaringe. O teste PCR é altamente preciso e é considerado o *goldstandard* para o diagnóstico da COVID-19 (Toretta *et al.*, 2021).

Outro tipo de teste é o teste de antígeno, que deteta proteínas específicas na superfície do vírus numa amostra colhida da nasofaringe e/ou da orofaringe. Os testes de antígeno são menos precisos do que os testes PCR, mas fornecem resultados mais rapidamente, normalmente em poucos minutos (Peeling *et al.*, 2022).

Os testes serológicos, também conhecidos como testes de anticorpos, detetam anticorpos contra o vírus, no sangue. Estes testes são úteis para determinar uma possível infeção anterior pelo vírus, mas não são úteis para diagnosticar infeções atuais (Peeling *et al.*, 2022).

O tratamento para COVID-19 pode variar dependendo da gravidade dos sintomas e do quadro clínico. Para os sintomas mais ligeiros, é aconselhado um tratamento de suporte, que envolve repouso, hidratação e alívio dos sintomas, com por exemplo, medicamentos antipiréticos. Para pacientes com dificuldade respiratória, a terapia com oxigénio pode ser necessária para garantir níveis adequados de oxigénio no sangue. Isso pode ser administrado por meio de cânulas nasais, máscaras faciais ou ventiladores mecânicos, dependendo da gravidade. Em casos graves que não respondem à terapia com oxigénio, pode ser necessária a ventilação mecânica invasiva como o ECMO (*Extracorporeal Membrane Oxygenation*) (Roda *et al.*, 2022).

Para reduzir a gravidade da doença foram desenvolvidas vacinas contra a COVID-19. Desde a pandemia, várias vacinas com formulações distintas foram desenvolvidas, testadas e autorizadas para o uso em diferentes países de todo o mundo. A vacina da Pfizer-BioNTech (Comirnaty) e a Moderna, utilizam a tecnologia de RNA mensageiro (mRNA) para instruir as células do corpo a produzir a proteína S do SARS-CoV-2, o que desencadeia uma resposta imune. A vacina da AstraZeneca-Oxford (Vaxzevria) é baseada num vetor viral não replicante, que contém a informação genética para produzir a proteína S. A vacina da Johnson & Johnson (Janssen) é uma vacina de vetor viral baseada em adenovírus humanos e a vacina Sinovac (CoronaVac) é uma vacina inativada que utiliza partículas do vírus SARS-CoV-2 que foram inativadas para desencadear uma resposta imune (Fiolet *et al.*, 2022).

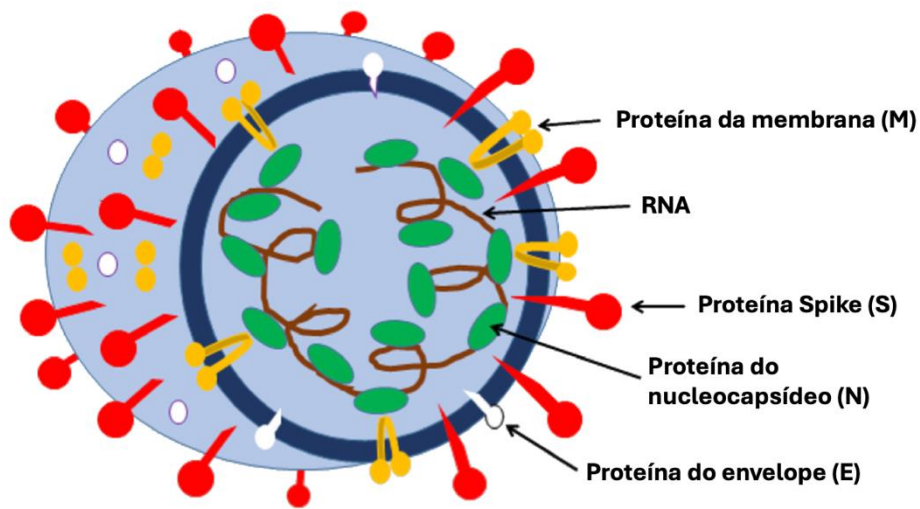


Figura 4. Estrutura do SARS-CoV-2 (adaptado de Gusev et al., 2022).

Adenovírus

Os Adenovírus são vírus de cadeia dupla de DNA, com uma estrutura icosaédrica e sem envólucro, de tamanho entre 70 e 100 nm (Shieh, 2021). Estes vírus pertencem à família *Adenoviridae*, que tem cinco gêneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Mastadenovirus*, sendo apenas os membros do gênero *Mastadenovirus* que causam infecções nos humanos (Greber & Flatt, 2019). Existem várias categorias de Adenovírus de acordo com as suas características serológicas, com mais de 100 serotipos distintos identificadas em humanos. Estes são divididos em sete espécies (de A a G), de acordo com a percentagem de guanina e citosina presente no seu DNA, com diferentes serotipos associados a diferentes tipos de infecções (Al-Heeti et al., 2022). A diversidade serológica existente representa um desafio para o desenvolvimento de uma vacina universal.

Os Adenovírus são conhecidos por causar uma variedade de infecções, incluindo infecções respiratórias, gastrointestinais e oculares. As espécies B, C e E estão associados a infecções respiratórias, as espécies C e D às infecções oculares, a espécie B às infecções urinárias e as espécies A, F e G às infecções gastrointestinais (Greber & Flatt, 2019). Os serotipos 2 e 5 da espécie C do adenovírus são os que mais estão associados às infecções respiratórias do trato superior em idade pediátrica (Watanabe et al., 2021).

A estrutura dos Adenovírus é relativamente complexa e composta por várias partes que desempenham papéis específicos na infecção viral como, a cápside viral, as fibras, as proteínas estruturais e o genoma viral (Fig. 5). A cápside viral que é responsável por proteger o seu material

genético, neste caso o DNA, é formada por 240 hexâmeros e 12 pentâmeros de proteínas estruturais organizadas de forma icosaédrica (Shieh, 2021). As fibras virais são projeções da superfície da cápside, mais especificamente dos pentâmeros das proteínas, compostas por proteínas e são cruciais para a entrada do vírus nas células, interagindo com os recetores celulares específicos como, o recetor do vírus Coxsackie e Adenovírus (CAR) que está presente em várias células humanas, incluindo as células epiteliais do trato respiratório superior e inferior, e o recetor CD46 que é uma glicoproteína envolvida na regulação do sistema imunológico (Greber & Flatt, 2019).

A transmissão geralmente ocorre através do contacto direto com secreções corporais de pessoas infetadas, o que inclui gotículas respiratórias, saliva, fezes e até mesmo superfícies contaminadas (Arnold & MacMahon, 2017).

O período de incubação depende do serotipo do vírus e do mecanismo de transmissão, e pode variar entre 2 dias e 2 semanas (Lynch & Kajon, 2016).

Os Adenovírus causam até 10% do total das febres em recém-nascidos e uma proporção significativa de infeções do trato respiratório superior (constipação comum, faringite, otite média) em crianças. Este vírus provoca sintomas como tosse, rinite, odinofagia e febre que pode durar 3 a 5 dias (Kunz & Ottolini, 2010).

O diagnóstico é geralmente baseado na clínica e testes laboratoriais. Os testes mais utilizados incluem testes de deteção de antígeno e pesquisa molecular em amostras como secreções respiratórias, lavados brônquico ou bronco alveolar e exsudados naso e orofaríngeos (Kunz & Ottolini, 2010).

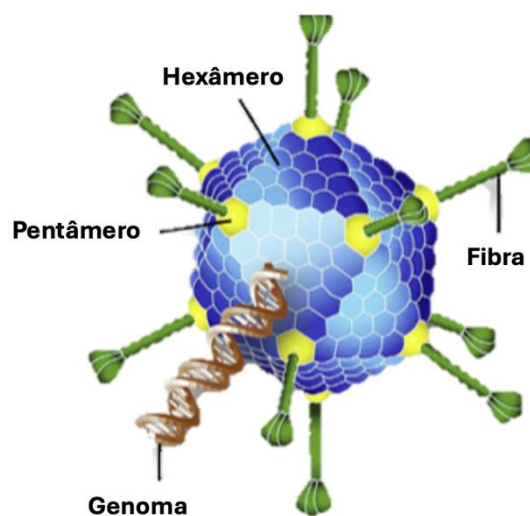


Figura 5. Estrutura do Adenovírus (adaptado de Shieh et al., 2022).

O tratamento específico é principalmente de suporte, já que não existe um fármaco antiviral específico. A maioria das infecções provocam infecções respiratórias leves e os sintomas geralmente desaparecem após alguns dias de repouso e cuidados, como descanso adequado, hidratação e fármacos como analgésicos ou antipiréticos. No entanto, em algumas situações, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, as infecções podem levar a complicações mais sérias, como pneumonia, bronquiectasias e bronquiolite obliterante (Lynch & Kajon, 2016).

3.1.2. Infecções Respiratórias Bacterianas

Dentro dos agentes patogênicos causadores de infecção respiratória, as bactérias surgem como os principais agentes etiológicos das infecções do trato respiratório inferior, sendo responsáveis por diversas complicações, desde quadros clínicos leves até graves.

As bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* encontram-se entre os principais agentes, causando quadros de pneumonia e bronquite. A resposta inflamatória exacerbada pode causar sintomas graves, tais como febre elevada e produção de muco purulento.

Streptococcus pneumoniae

As infecções respiratórias causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* constituem uma preocupação significativa em termos de saúde pública a nível mundial. *Streptococcus pneumoniae*, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva que desempenha um papel significativo em diversas infecções respiratórias, sendo uma das principais causas de pneumonia, meningite e otite média (Marquart, 2021). O pneumococo tem uma forma esférica, também conhecida como *cocci*, é um anaeróbio facultativo, não móvel e não forma esporos. Além disso, esta bactéria possui uma cápsula polissacarídea, que desempenha um papel fundamental na sua patogenicidade, evitando o sistema imunitário do hospedeiro (Mekuria *et al.*, 2023).

A patogénese envolve uma série de mecanismos complexos que permitem ao microrganismo escapar ao sistema imunitário do hospedeiro e causar infecções. Um aspeto fundamental é a capacidade da bactéria para aderir e colonizar as células epiteliais respiratórias, o que é facilitado por proteínas de superfície como as adesinas pneumocócicas. A colonização é facilitada por fatores como a pneumolisina, uma toxina que rompe as membranas celulares. Uma vez no interior do hospedeiro, a bactéria consegue escapar às defesas do sistema imunitário através de vários mecanismos, incluindo a formação de cápsula para evitar a fagocitose e a modulação das respostas inflamatórias (Fig. 6) (Dion & Ashurst, 2023).

A transmissão dá-se principalmente via gotícula estando associada ao contacto próximo entre indivíduos. O pneumococo pode colonizar o trato respiratório superior de indivíduos sem provocar sintomas, sendo esses portadores assintomáticos contribuintes para a disseminação da bactéria na comunidade (Marquart, 2021).

O período de incubação é de 1 a 3 dias. Os sintomas respiratórios variam dependendo do tipo e da gravidade da infecção. A bactéria pode afetar diferentes partes do trato respiratório, resultando numa variedade de sintomas, como tosse (seca ou produtiva), dispneia, dor torácica, congestão nasal, febre e dor de cabeça.

O diagnóstico envolve uma combinação da avaliação clínica, exames laboratoriais e, em alguns casos, da imagiologia. Inicialmente, o médico avaliará os sintomas apresentados pelo paciente, bem como o seu histórico médico e fatores de risco e deverá pedir os exames laboratoriais de acordo com a suspeita. Os exames laboratoriais incluem hemoculturas, caso haja suspeita de bacteremia e septicemia e a bactéria *S. pneumoniae* já circule na corrente sanguínea, exame cultural, pesquisa de antígenos e identificação molecular como PCR em tempo real (Sadowy & Hryniewicz, 2020).

O tratamento depende da gravidade da infecção, da idade do paciente, de alergias a medicamentos e da resistência local aos antibióticos. Os antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina e a amoxicilina, são frequentemente utilizados para tratar a infecção por *S. pneumoniae*. No entanto, a resistência a esses antibióticos pode ocorrer em algumas estirpes e, em casos de resistência, podem ser necessários outros antibióticos como macrólidos ou doxiciclina (Li *et al.*, 2022).

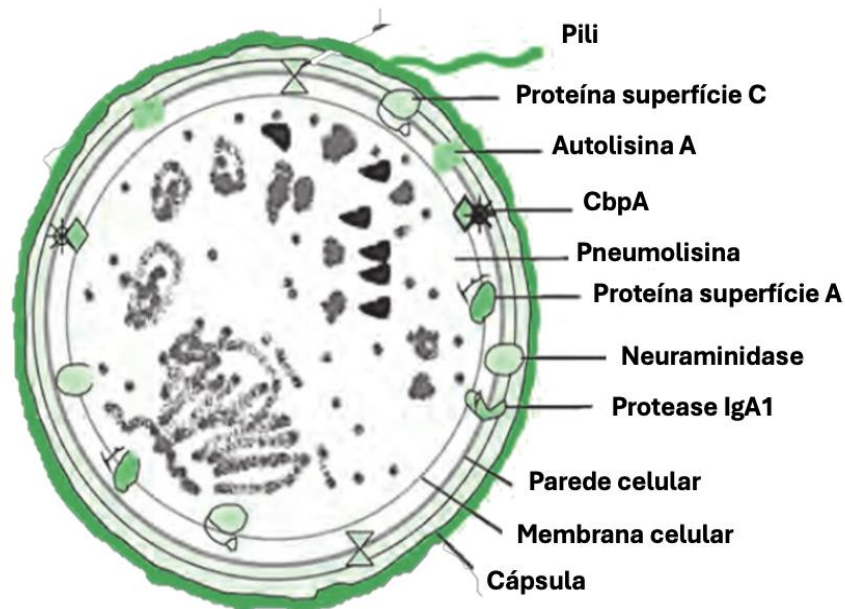


Figura 6. Estrutura e fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae* (adaptado de Negi & Das, 2017).

A prevenção é fundamental e a vacinação desempenha um papel crucial na redução da incidência de infeções. Existem dois tipos de vacinas disponíveis, as vacinas polissacarídicas, que apenas contêm polissacarídeos capsulares, e as vacinas pneumocócicas conjugadas, que para além dos polissacarídeos capsulares também têm uma proteína transportadora adjuvante. As vacinas utilizadas em Portugal são a vacina polissacarídica pneumocócica 23 valente (Pneumovax 23®) que contém 23 antígenos dos 83 subtipos mais virulentos do *S. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) e a vacina conjugada pneumocócica 13 valente (Prevenar 13®) que abrange 13 serotipos de *S. pneumoniae* mais comuns e é a mais imunogénica (Li *et al.*, 2022).

Mycoplasma pneumoniae

A infeção respiratória causada por *Mycoplasma pneumoniae* é uma condição comum, muitas vezes referida como pneumonia atípica (Tong *et al.*, 2022). Esta bactéria pertence à família *Mycoplasmataceae*, tem um tamanho de 150-200 nm e a forma de um bastonete (Fig. 7). As bactérias *Mycoplasma* diferenciam-se das restantes bactérias por não terem parede celular, logo não são classificadas em Gram-positiva ou Gram-negativa, apesar de serem mais semelhantes às bactérias Gram-positivas (Kashyap & Sarkar, 2010).

A bactéria *M. pneumoniae* classifica-se em dois grandes grupos genéticos, designados por subtipo 1 e subtipo 2, com base nas diferenças de sequências nos elementos repetitivos do gene da proteína P1 (Waites *et al.*, 2017).

O genoma da bactéria *M. pneumoniae* codifica vários fatores de virulência que contribuem para a sua capacidade em causar infeções respiratórias. Alguns desses fatores incluem adesinas, que são responsáveis pela adesão e colonização das células epiteliais do trato respiratório humano; metabolitos tóxicos (como peróxido de hidrogénio), que induzem a lise celular, inflamação e morte celular; e evasão do sistema imunológico, uma vez que tem a capacidade de modificar a sua superfície celular para evitar a deteção pelo sistema imunológico (Jiang *et al.*, 2021).

A bactéria pode ser transmitida através de gotículas libertadas no ar por tosse, espirros e contacto próximo. Em casos raros, a bactéria também pode ser transmitida de uma mãe infetada para o filho, durante o parto (Tong *et al.*, 2022).

A infeção por *M. pneumoniae* pode causar uma série de sintomas que variam em gravidade de acordo com o indivíduo e a resposta imunológica. O quadro clínico mais comum da infeção é a traqueobronquite, com tosse seca ou produtiva. Para além desses sintomas, os doentes podem apresentar os sintomas gerais de infeções respiratórias como cefaleias, odinofagia, otite e rinorreia. Em casos mais agravados, a infeção pode provocar abscessos pulmonares, pneumonia, derrame pleural e fibrose intersticial crónica. A doença propaga-se entre contactos próximos com um período de incubação de 23 dias (Waites *et al.*, 2017).

O diagnóstico da infecção por *M. pneumoniae* pode ser realizado através de técnicas de cultura viral, serologia ou por análises de PCR em tempo real em amostras respiratórias como exsudados naso e orofaríngeos, aspirados e lavados brônquicos, biópsia pulmonar, líquido pleural e secreções brônquicas (Tsai *et al.*, 2020). Na técnica de PCR em tempo real, pesquisa-se o gene da citoadesina P1 da bactéria (Li *et al.*, 2022).

Devido à ausência de parede celular, a *M. pneumoniae* é inerentemente resistente aos antibióticos β -lactâmicos. Os principais antibióticos utilizados contra a *M. pneumoniae* são agentes que atuam no ribossoma bacteriano para inibir a síntese proteica, como os macrólidos e as tetraciclina e fluoroquinolonas, que inibem a replicação do DNA. Os antibióticos mais utilizados são a azitromicina, a claritromicina do grupo dos macrólidos e a doxiciclina da classe das tetraciclina (Tsai *et al.*, 2020).

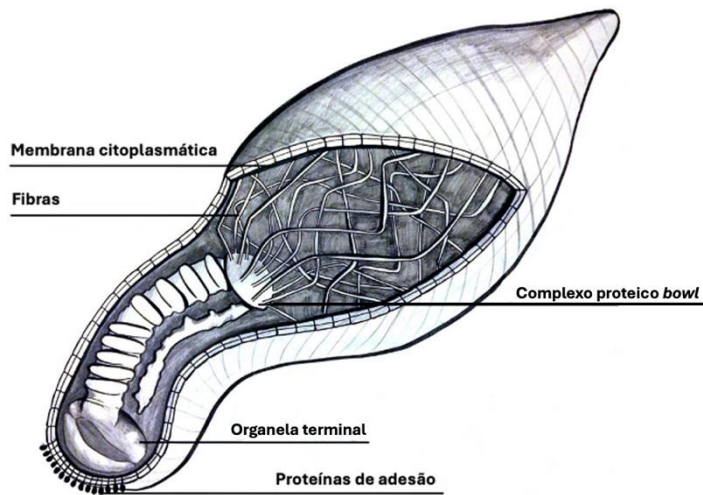


Figura 7. Morfologia da bactéria *Mycoplasma pneumoniae* (adaptado de Parrot *et al.*, 2016).

3.1.3. Infecções Respiratórias Fúngicas

Enquanto as infecções respiratórias bacterianas são mais frequentes, as infecções fúngicas respiratórias, apesar de serem menos frequentes, têm se destacado devido ao seu potencial devastador e diagnósticos desafiantes.

As infecções fúngicas respiratórias são predominantemente associadas a fungos oportunistas, que exploram a vulnerabilidade do sistema imunológico do hospedeiro. Os fungos que causam infecções mais comuns são *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulatum*. Pacientes com sistema imunológico comprometido, como os que possuem vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou foram submetidos a transplantes de órgãos, apresentam maior probabilidade de desenvolver infecções fúngicas respiratórias.

Aspergillus fumigatus

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentosos que pertence ao género *Aspergillus*. Apesar deste fungo ser o agente patogénico mais comum, sendo responsável por aproximadamente 90% das infeções fúngicas humanas, não é o único agente patogénico deste género. *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*, cuja relevância tem sido crescente, também podem causar infeções humanas (Ledoux & Herbrecht, 2023).

O *A. fumigatus*, embora seja, geralmente, inofensivo para pessoas saudáveis, pode causar várias infeções em pessoas imunocomprometidas (ex.: cancro, leucemia, transplantados de medula óssea e de órgãos, neutropenia, SIDA) ou com doenças pulmonares subjacentes. Normalmente, este fungo está associado à aspergilose invasiva (AI), uma infeção grave e potencialmente fatal (Dagenais & Keller, 2009).

A infeção dá-se por aspiração dos conídios, que devido ao seu pequeno tamanho (2-3 µm) conseguem infiltrar-se no trato respiratório, mais especificamente nos alvéolos pulmonares, onde encontram um ambiente húmido altamente irrigado que favorece a adesão celular. Nos indivíduos imunocomprometidos, há uma diminuição da capacidade funcional dos macrófagos alveolares, o que leva a uma menor taxa de morte celular dos conídios e dos tubos germinativos, levando assim a uma maior propagação. Os neutrófilos são recrutados para o local da infeção e conseguem eliminar as hifas. Este acontecimento desencadeia um ambiente inflamatório nos pulmões que conduz a danos nos tecidos pulmonares, originando a aspergilose invasiva. O *A. fumigatus* pode ainda passar as barreiras epiteliais ou endoteliais devido à sua robusta parede celular e invadir outros órgãos através dos vasos sanguíneos (Fig. 8) (McCormick, *et al.*, 2010).

Os sintomas da AI são variados e incluem febre persistente, tosse, produção de expectoração, dor no peito, dispneia e broncospasmos (Ledoux & Herbrecht, 2023).

O diagnóstico da AI é um processo desafiador e muitas vezes requer uma abordagem multifacetada, combinando informações clínicas, exames de imagem e testes laboratoriais. As imagens radiológicas, tomografia computadorizada do tórax, podem mostrar lesões características, como nódulos, cavidades ou áreas de infiltração pulmonar. Amostras de biópsias pulmonares, lavados brônquicos e lavados broncoalveolares podem ser utilizadas para cultivar e identificar a presença de *A. fumigatus*, bem como podem ser utilizadas para detetar material genético de *A. fumigatus* através da técnica PCR em tempo real (Ledoux & Herbrecht, 2023). A técnica de PCR em tempo real permite detetar *A. fumigatus*, *A. spp* e *A. terreus*, em simultâneo.

O tratamento da AI é complexo e requer uma abordagem personalizada, considerando a gravidade da infeção e a condição clínica do paciente. O primeiro antifúngico aprovado para o tratamento da AI foi a anfotericina B que, ao ligar-se à parede celular dos fungos, aumenta a sua permeabilidade causando danos significativos. O voriconazol é um antifúngico triazólico também utilizado no tratamento de AI, que inibe a enzima responsável pela síntese de ergosterol, um

componente essencial das membranas celulares fúngicas, comprometendo a sua integridade e resultando na sua morte (Ledoux & Herbrecht, 2023).

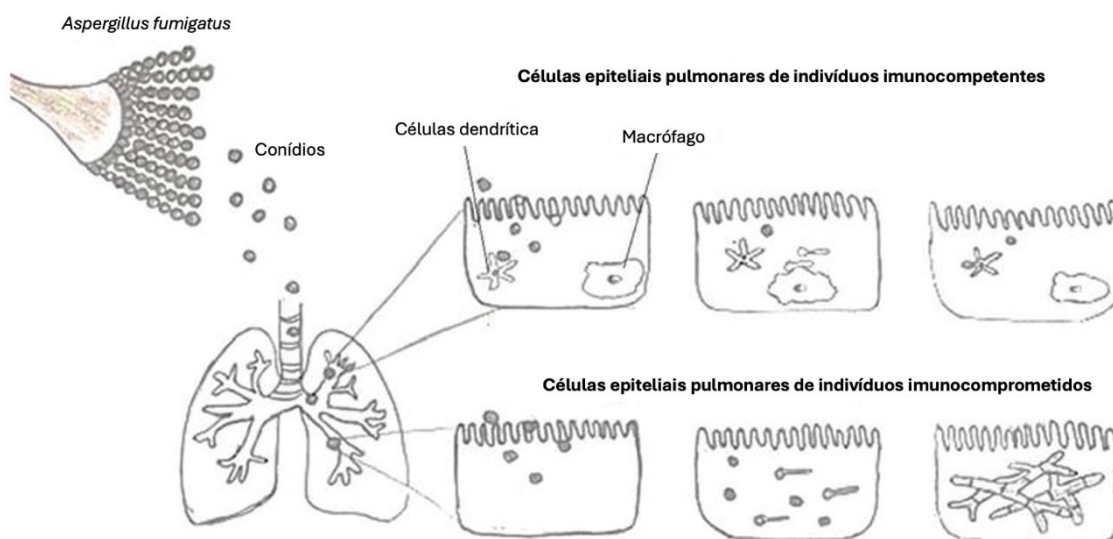


Figura 8. Interação e patogênese do *Aspergillus fumigatus* com o hospedeiro (adaptado de Guadalupe Frías-De-León et al., 2023).

Histoplasma capsulatum

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico que pode causar a histoplasmose. A histoplasmose pode-se manifestar de diferentes maneiras, dependendo da intensidade da exposição ao fungo e do estado imunológico do indivíduo. A maioria das infecções por *Histoplasma capsulatum* é assintomática ou apresenta sintomas leves, semelhantes aos da gripe. No entanto, em casos mais graves, especialmente em pessoas com sistemas imunológicos enfraquecidos, a doença pode se tornar disseminada e causar complicações sérias. A histoplasmose pode manifestar-se como infecção pulmonar aguda, com sintomas como a gripe, de febre, tosse seca ou produtiva, dor no peito, dispnéia e mialgias; ou forma disseminada, cujos sintomas principais são febre alta, hepatoesplenomegalia e, por último, a forma crônica que apresenta sintomas como a infecção pulmonar aguda, embora os sintomas persistam por um longo período (Mittal et al., 2019).

A infecção por *Histoplasma capsulatum* ocorre principalmente pela inalação dos esporos (conídios) do fungo presentes no ambiente. Após a inalação, os esporos do *Histoplasma capsulatum* entram nos pulmões, chegam aos alvéolos, onde encontram condições apropriadas, e transformam-se na forma de levedura, que é a fase patogénica do fungo. Em alguns casos, especialmente em pessoas com sistemas imunológicos enfraquecidos, a infecção pode-se disseminar para outros órgãos além dos pulmões, resultando em formas mais graves da doença (Fig. 9) (Mittal et al., 2019).

O diagnóstico da histoplasmose geralmente envolve uma combinação de abordagens clínicas, laboratoriais e, às vezes, imagiológicas. Alguns testes laboratoriais incluem, cultura de amostras clínicas, detecção de antígenos, testes serológicos e testes moleculares como PCR em tempo real (Mittal *et al.*, 2019).

O tratamento da histoplasmose depende da gravidade da infecção e do estado de saúde do paciente. Em muitos casos, especialmente em infecções leves ou assintomáticas, o tratamento pode não ser necessário, pois o sistema imunológico do paciente frequentemente resolve a infecção. No entanto, em casos mais graves ou em pessoas com sistemas imunológicos comprometidos, o tratamento antifúngico pode ser recomendado. Se a histoplasmose for considerada um caso moderado, o tratamento é feito com o uso do antifúngico itraconazol. Os pacientes em que a doença já está num estado agravado é recomendado o tratamento com anfotericina B, seguida de itraconazol (Mittal *et al.*, 2019).

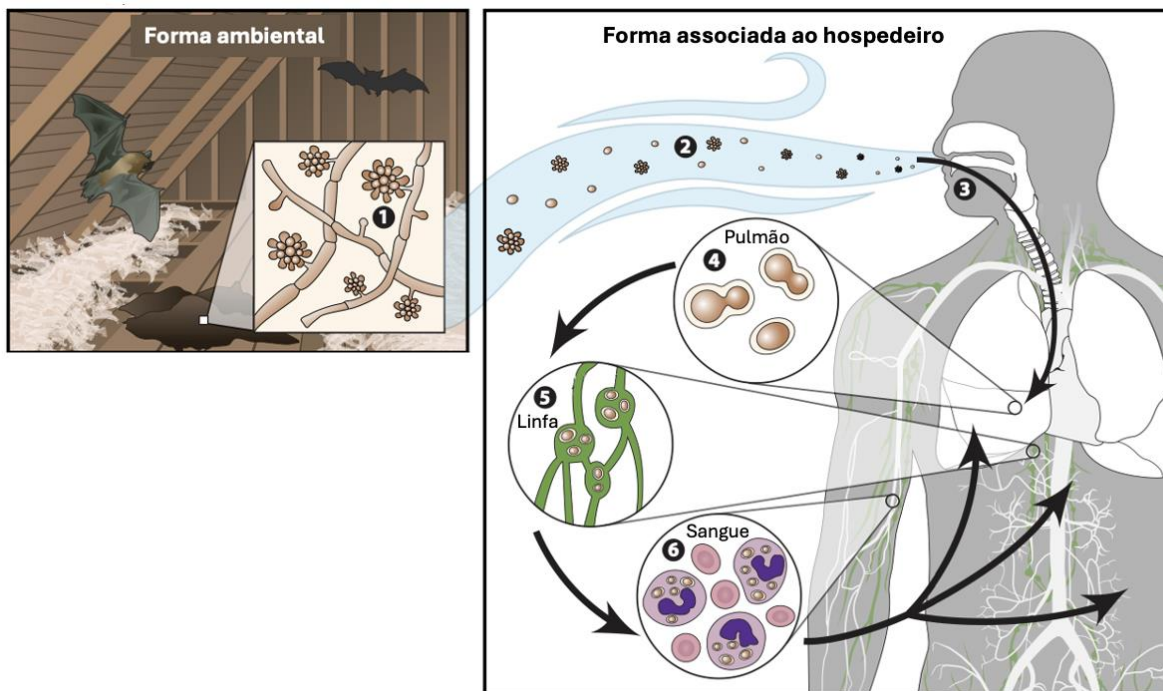


Figura 9. Ciclo de infecção do *Histoplasma capsulatum*: (1) No ambiente, o *Histoplasma capsulatum* existe na forma de um bolor com hifas aéreas; (2) Produção de conídios pelas hifas; (3) Inalação dos conídios por um hospedeiro suscetível; (4) Transformação dos conídios em leveduras ovais nos pulmões; (5) Fagocitose das leveduras por células imunitárias e transporte para os gânglios linfáticos regionais; (6) Invasão da corrente sanguínea. (adaptado de CDC, 2019).

Amostras:

As amostras para pesquisa de vírus que causam infecções respiratórias são maioritariamente exsudados naso e orofaríngeos, secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares, líquido pleural e biópsias respiratórias.

Para a pesquisa de bactérias e fungos respiratórios, as amostras aceites são quase semelhantes às referidas anteriormente, com exceção dos exsudados, pois este tipo de amostra só é utilizado para pesquisa de agentes patogénicos que causam infecções no trato respiratório superior.

Procedimento:

O processamento das amostras respiratórias depende do tipo de pesquisa do agente patogénico.

- Detecção de vírus:

Os exsudados naso e orofaríngeos utilizados tanto podem ser colhidos em zaragatoas secas ou em zaragatoa em meio de transporte de vírus. O procedimento de zaragatoa seca implica colocar a zaragatoa num tubo de 2 mL e adicionar cerca de 390 µL de tampão de lise G2 (800mM de hidrocloreto de guanidina, 30mM Tris-HCl, 30 mM EDTA, 5% Tween 20, 0.5% Triton X-100 com pH igual a 8.0) e 10 µL de proteínase K (20 mg/mL). Homogeneiza-se bem o tubo e coloca-se durante 15 minutos no banho seco a 56 °C, para ativar a proteínase K e ocorrer a lise celular. Após os 15 minutos retira-se o tubo, deixa-se arrefecer e descarta-se a zaragatoa. A solução é então utilizada para a purificação dos ácidos nucleicos. Para as zaragatoas em meio de transporte, pipetam-se apenas 400 µL do volume do meio de transporte para se proceder à purificação dos ácidos nucleicos.

Nas amostras de secreções brônquicas, lavados brônquicos e broncoalveolares e líquido pleural é muito importante a observação das suas características macroscópicas. Assim, caso não sejam viscosas/espessas, mas com um aspeto transparente e fluídas, colocam-se 2 mL da amostra num microtubo e centrifuga-se durante 15 minutos a, pelo menos, 13 200 rpm (rotações por minuto). Após a centrifugação o sobrenadante é descartado, adicionam-se 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K ao sedimento, homogeneiza-se a solução e coloca-se no banho seco a 56 °C durante pelo menos 15 minutos. Quando a solução estiver transparente, procede-se à purificação dos ácidos nucleicos. Se as amostras referidas forem viscosas/espessas, com a presença de fibrinas, é necessário adicionar uma solução de n-acetil l-cisteína a 2% (2 g para cada 100 mL de água molecular) às amostras e deixar atuar durante, pelo menos, 15 minutos. Passados os 15 minutos, centrifuga-se a solução e os restantes passos são os mesmos já referidos anteriormente.

Às biópsias respiratórias, fragmentos de tecido que são cortados com bisturi e triturados, de modo a aumentar a superfície de contacto e auxiliar no processo de lise celular, são adicionados 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K, e são colocados no banho seco a 56 °C, até não restar nenhum tecido visível.

- Detecção de bactérias:

O procedimento das amostras respiratórias para detecção de bactérias é realizado da mesma forma que o dos vírus. A única diferença é que, após a colocação dos microtubos no banho seco a 56 °C durante pelo menos 15 minutos, estes têm que ser colocados no banho seco a 95 °C, para facilitar a lise celular, uma vez que a estrutura das bactérias é mais complexa que a dos vírus.

- Detecção de fungos:

A primeira parte do procedimento de preparação das amostras respiratórias para a detecção de fungos é equivalente ao protocolo utilizado para vírus. Quando os tubos com a amostra e o tampão de lise já não aparentarem um sedimento visível, estes são então retirados do banho seco e adiciona-se igual volume de liticase. A liticase é uma enzima que degrada a parede celular dos fungos, quebrando as ligações de quitina, o que facilita a lise celular (Goldschmidt *et al.*, 2014). Os tubos são então incubados num banho seco, a 37 °C, durante 45 minutos e centrifugados a 5200 rpm, durante 10 minutos. Utiliza-se uma rotação mais baixa do que o costume para evitar a lise total da parede celular dos fungos, evitando a libertação dos ácidos nucleicos. Assim, com baixas rotações, as células sedimentam, o sobrenadante é descartado, adicionam-se 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K e incubam-se os tubos no banho seco a 56 °C durante pelo menos 15 minutos, seguindo-se a purificação dos ácidos nucleicos.

3.2. Infecções gastrointestinais

As infecções gastrointestinais são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade em todo o mundo. Estas condições afetam indivíduos de todas as faixas etárias, desde recém-nascidos até pessoas mais velhas. Nos casos mais severos, as infecções gastrointestinais podem resultar em complicações graves, tais como, desidratação, falência renal, choque e, em situações extremas, o óbito. Compreender como os diferentes agentes patogénicos (vírus, bactérias e parasitas) afetam o trato gastrointestinal é fundamental para o desenvolvimento de terapias eficazes. A resistência a antibióticos de alguns agentes patogénicos está a aumentar, o que é mais um motivo para estudar essas infecções, a fim de desenvolver estratégias de tratamento eficazes.

3.2.1. Infecções Gastrointestinais Víricas

As infecções gastrointestinais víricas são causadas por vírus que agridem o sistema digestivo. Estas infecções são comuns em todo o mundo, e podem causar uma série de sintomas, desde um ligeiro desconforto abdominal até à desidratação grave.

Os vírus mais frequentemente relacionados com as doenças gastrointestinais são o norovírus, o e o rotavírus. Estes agentes infecciosos são frequentemente transmitidos através da via fecal-oral, que envolve o consumo de alimentos ou água contaminados, o contacto direto com indivíduos infetados ou superfícies contaminadas (Rovida *et al.*, 2013).

Norovírus

Os norovírus são vírus que pertencem à família *Calciviridae* e são reconhecidos como vírus altamente contagiosos que causam uma inflamação do trato gastrointestinal, causando gastroenterite aguda. Estes vírus têm uma estrutura esférica sem envelope, de tamanho de 28-35 nm, com um genoma de linear de cadeia simples de RNA de sentido positivo, com cerca de 7.4-7.7 kb de comprimento (Randazzo *et al.*, 2018). O material genético do norovírus é envolvido por uma cápside proteica, sendo as principais proteínas a proteína VP1 e a proteína VP2, que formam a estrutura externa do vírus (Fig. 10).

Os norovírus são geneticamente diversos, estando divididos em, pelo menos, 10 genogrupos, que se subdividem em mais de 40 genótipos. Os principais genogrupos que afetam os seres humanos são os genogrupos GI, GII, GIV, GVIII e GIX. Dentro desses genogrupos, existem múltiplos genótipos, que são variantes genéticas específicas do vírus (Zhang *et al.*, 2023).

Essa diversidade genética é um dos desafios para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra o norovírus, já que o vírus possui a capacidade de se adaptar e evoluir rapidamente, tornando-se difícil para o sistema imunológico reconhecer e combater todas as variantes (Zhang *et al.*, 2023).

O norovírus é altamente contagioso e pode ser transmitido de diversas formas. As principais vias de transmissão são através de contacto direto com indivíduos infetados, ingestão de água e alimentos contaminados, contacto com superfícies contaminadas e aerossóis infetados produzidos pelo vômito (de Graaf *et al.*, 2016).

Os sintomas associados à infeção por norovírus geralmente aparecem dentro de 12 a 48 horas após a exposição ao vírus e podem persistir por 1 a 3 dias. Os principais sintomas incluem diarreia, vômitos, náuseas, cólicas estomacais, febre e cansaço (Randazzo *et al.*, 2018).

A deteção do norovírus geralmente é realizada através de métodos laboratoriais que envolvem a colheita de fezes. Os métodos comuns para detetar o norovírus incluem, ensaios imunoenzimáticos, ensaios imunocromatográficos, e o mais utilizado é o teste de diagnóstico molecular de RT-PCR em tempo real (Robilotti *et al.*, 2015).

Não existe um tratamento específico para o norovírus, e a infeção é geralmente autolimitada, o que significa que o organismo, na maioria dos casos, consegue debelar a infeção. O tratamento do norovírus é, portanto, principalmente sintomático, concentrando-se na gestão dos sintomas para prevenir a desidratação e promover a recuperação (Robilotti *et al.*, 2015).

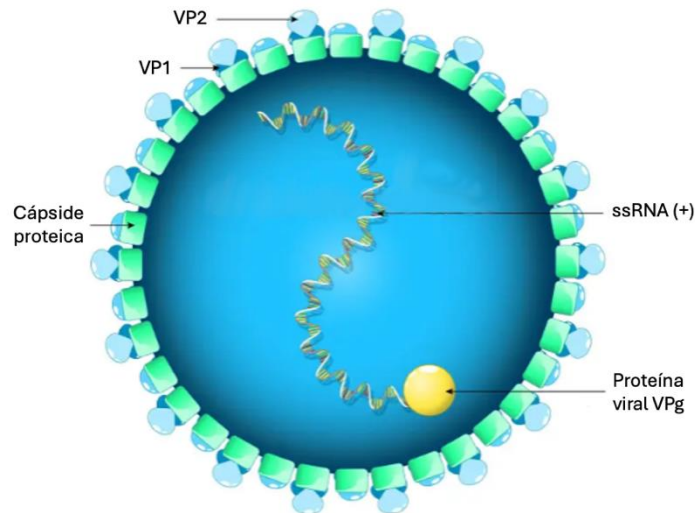


Figura 10. Estrutura do Norovírus (adaptado de <https://pt.dreamstime.com/estrutura-do-norovirus-vestimenta-da-anatomia-viriao-inseto-amplificado-virus-noranda-que-causou-gastroenterite-e-doenca-image303283866>).

Rotavírus

O rotavírus é um vírus sem envelope da família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae* e pertence ao gênero *Rotavirus*. Existem 9 espécies de rotavírus, nomeadas de A a I, sendo o rotavírus A, a espécie que infeta o homem. O genoma do rotavírus é composto por 11 segmentos de RNA de cadeia dupla (dsRNA), que codificam seis proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6), que apenas são produzidas nas células infetadas por rotavírus (Fig. 11) (Suzuki, 2019).

A partícula viral do rotavírus tem uma capsíde proteica icosaédrica com aproximadamente 100 nm de diâmetro (incluindo VP4 Spikes) e é uma partícula com três camadas proteicas concêntricas, constituído pela proteína VP2 na camada interna, a camada intermediária pela VP6 e a camada exterior é constituída pelas proteínas VP7 e VP4 (Fig. 11) (Suzuki, 2019).

O rotavírus liga-se à superfície das células do intestino, mais especificamente aos enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado, através da interação da proteína VP4 com os recetores na membrana celular, ácido siálico. Após a entrada do vírus nas células, a capsíde viral é desmontada, libertando-se o material genético viral, a cadeia dupla de RNA, no citoplasma da célula. O RNA viral serve de molde para a tradução de proteínas virais e para a replicação do genoma. As proteínas virais são transportadas para o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, onde ocorre a montagem das partículas virais. As partículas víricas maduras são libertadas da célula hospedeira por meio de um processo de lise celular (Santos-Ferreira *et al.*, 2021).

A infeção das células do intestino delgado por rotavírus resulta na perda de microvilosidades, levando a uma diminuição da capacidade de absorção de nutrientes. Para além disso, a replicação

do vírus nas células das vilosidades do intestino delgado contribui para o aparecimento dos sintomas característicos de gastroenterite (Santos-Ferreira *et al.*, 2021).

O rotavírus tem um período de incubação de 48 horas e provoca sintomas de gastroenterite como, vômitos, febre e diarreia aquosa durante 3 a 10 dias. Os sintomas podem variar em intensidade, e a infecção é particularmente conhecida por causar sintomas mais graves em crianças pequenas. Menos frequentemente, podem ocorrer convulsões, enterocolite necrosante, envolvimento do sistema nervoso e morte (Sell & Dolan, 2018)

O rotavírus é altamente contagioso sendo transmitido através do contacto direto ou por meio de contacto com objetos contaminados (fomites). A principal rota de transmissão é a fecal-oral e a ingestão de água ou alimentos contaminados também transmitem o rotavírus (Sadiq *et al.*, 2018).

Os métodos de diagnóstico de rotavírus incluem cultura, microscopia eletrónica e serologia para detetar anticorpos contra o rotavírus, RT-PCR em tempo real e imunoenaios enzimáticos, sendo os últimos os mais utilizados para esse propósito (Sell & Dolan, 2018).

O tratamento é essencialmente de apoio, centrando-se no controlo dos sintomas, na prevenção da desidratação e na promoção da recuperação. O tratamento central envolve a reidratação para compensar a perda de líquidos devido à diarreia e vômitos. Para isso, são utilizadas soluções de hidratação oral, que contêm água, eletrólitos e açúcares. Em casos de gastroenterite aguda, a hospitalização pode ser necessária para administração de fluidos intravenosos. A prevenção através da vacinação é uma estratégia chave para reduzir a incidência e a gravidade da infecção por rotavírus (Sadiq *et al.*, 2018).

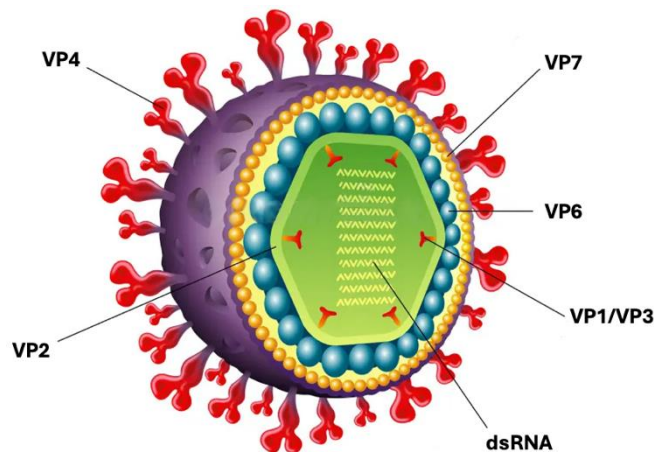


Figura 11. Estrutura do rotavírus (adaptado de <https://pt.dreamstime.com/ilustração-stock-rotavirus-image73549576>).

3.2.2. Infecções Gastrointestinais Bacterianas

As infecções gastrointestinais bacterianas são infecções causadas pela presença de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Estas infecções podem afetar qualquer parte do sistema gastrointestinal, incluindo o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso e podem ser adquiridas pela ingestão de água ou alimentos contaminados, contato direto com indivíduos infetados ou exposição a ambientes contaminados.

Os sintomas das infecções gastrointestinais bacterianas podem variar dependendo do tipo de bactéria, mas os mais comuns são diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, febre e mal-estar geral.

As bactérias que causam este tipo de infecções são diversas, como é o caso da bactéria *Clostridium difficile* e da bactéria *Campylobacter jejuni*.

Clostridium difficile

Clostridium difficile (*C. difficile*) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia obrigatória formadora de esporos conhecida por causar infecções no trato intestinal humano. Esta bactéria está associada a infecções nosocomiais e é uma das principais causas de diarreia associada a antibióticos (Crobach *et al.*, 2018).

A principal via de transmissão desta bactéria é a fecal-oral, através da ingestão de esporos. Os esporos são a forma resistente de *C. difficile*, capazes de sobreviver em ambientes externos por longos períodos. Os esporos são resistentes ao calor, ácidos, álcool e antibióticos e a transmissão ocorre geralmente em ambientes associados a cuidados de saúde, onde as condições favorecem a disseminação da bactéria. (Czepiel *et al.*, 2019).

A colonização por *C. difficile* refere-se à presença da bactéria no trato gastrointestinal de uma pessoa sem causar sintomas de infecção ativa. Embora a colonização por *C. difficile* seja comum, a bactéria pode-se tornar patogênica em certas circunstâncias, levando a infecções intestinais. A colonização divide-se em três etapas, a germinação de esporos, o crescimento vegetativo e a produção de toxinas (Fig. 12) (Lim *et al.*, 2019).

O metabolismo dos ácidos biliares desempenha um papel crucial na colonização por *C. difficile* e na patogênese das suas infecções. Os ácidos biliares são compostos orgânicos que desempenham funções essenciais na digestão de gorduras e na absorção de nutrientes. Os ácidos biliares são produzidos no fígado e são libertados e reabsorvidos no intestino delgado. Existe uma quantidade destes compostos que não é reabsorvida pelo intestino e passa para o cólon, onde estes ácidos biliares primários são metabolizados em ácidos biliares secundários. Os ácidos biliares secundários inibem o crescimento de *C. difficile*. A utilização de antibióticos também está relacionada com a colonização por *C. difficile*. O uso de antibióticos causa uma perturbação na microbiota intestinal e a depleção das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, que são

responsáveis pela metabolização dos ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários, o que leva a um aumento de ácidos biliares primários e uma diminuição de ácidos biliares secundários (Crobach *et al.*, 2018). Após essa etapa, os esporos passam a constituir células vegetativas em replicação ativa.

A *C. difficile* produz dois tipos de toxinas, enterotoxina A, citotoxina B, apesar de ambas serem enterotoxinas e citotoxinas. A libertação dessas toxinas promove necrose das células epiteliais e perda da função da barreira intestinal, o que leva a uma resposta inflamatória do hospedeiro e sintomas como diarreia, dor abdominal e, em casos mais graves, colite (Czepiel *et al.*, 2019).

O período de incubação é, geralmente, de 2 a 3 dias, mas pode ser mais, variando de pessoa para pessoa (Czepiel *et al.*, 2019). O quadro clínico da infecção por *C. difficile* é muito diversificado variando na gravidade, abrangendo sintomas leves, graves e até mesmo a morte. Nem todas as pessoas colonizadas por *C. difficile* desenvolvem sintomas, mas quando ocorrem, os sintomas geralmente estão relacionados com o trato gastrointestinal. A maioria das pessoas infetadas com infecção por *C. difficile*, apresenta diarreia ligeira durante 5-10 dias, dor abdominal, febre, náuseas, vômitos, fraqueza e perda de apetite. Em casos extremos, a infecção por *C. difficile* pode levar a complicações graves, como desidratação significativa, megacólon tóxico, perfuração intestinal, paralisia intestinal, septicemia e morte (Czepiel *et al.*, 2019).

O diagnóstico de *C. difficile* é geralmente realizado através de testes laboratoriais específicos que detetam a presença da bactéria ou as suas toxinas nas amostras de fezes dos pacientes. Os testes mais utilizados para diagnosticar a infecção por *C. difficile* envolvem a detecção de toxinas através de ensaios imunoenzimáticos para detecção de Toxinas (EIA) e o Teste Rápido de Glutamato Desidrogenase (GDH), embora este último seja menos sensível, uma vez que a enzima GDH é produzida por estirpes toxigênicas e não toxigênicas. A qPCR, que amplifica uma região conservada do gene da toxina B de *C. difficile* presente nas amostras de fezes, oferece uma abordagem mais sensível em comparação com alguns testes tradicionais de detecção de toxinas. Também podem ser realizados testes culturais, embora sejam limitados devido à demora em obter resultados. Em casos graves ou complicados, especialmente quando há suspeita de colite pseudomembranosa, uma colonoscopia pode ser realizada para visualizar diretamente as alterações na mucosa intestinal, caso os testes anteriormente referidos tenham obtido resultados negativos para a pesquisa de *C. difficile* (Czepiel *et al.*, 2019).

O tratamento da infecção por *C. difficile* envolve a interrupção do antibiótico que pode ter contribuído para o desenvolvimento da infecção e o uso de agentes antimicrobianos específicos para combater a bactéria *C. difficile*. Os antibióticos mais utilizados no tratamento incluem a vancomicina e a fidaxomicina. O metronidazol anteriormente era uma opção para o tratamento de infecções por *C. difficile*, mas a vancomicina e a fidaxomicina tornaram-se mais eficazes, sendo o metronidazol utilizado apenas em casos leves de infecção e não recorrentes. Em casos de infecção recorrente ou grave que não resulta com antibióticos já referidos, o transplante fecal é uma opção. Nesse procedimento, as fezes de um dador saudável, contendo uma microbiota normal, são

transplantados para o intestino do paciente para ajudar a restabelecer a diversidade da microbiota (Czepiel *et al.*, 2019).

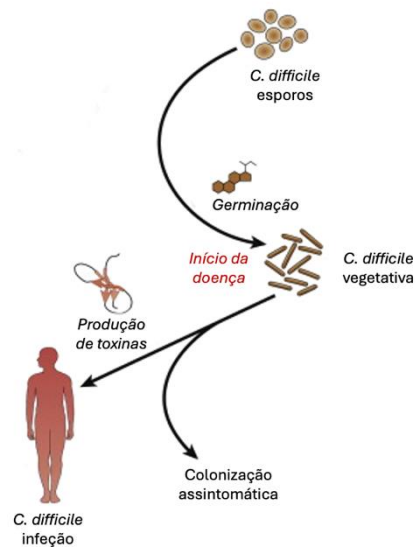


Figura 12. Colonização da bactéria *Clostridium difficile* (adaptado de Britton & Young, 2014).

Campylobacter jejuni

As bactérias *Campylobacter* estão entre as quatro principais causas de gastroenterite a nível mundial, sendo a espécie *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) a mais reportada (Costa & Iraola, 2019).

O género *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae* e compreende 41 espécies e subespécies (Kemper & Hensel, 2023). As bactérias *Campylobacter* são bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete ou em forma de S, com dimensões de 0,2 a 0,8 µm de diâmetro e 0,5 e 5 µm de comprimento. São bactérias móveis com um único flagelo polar, flagelos bipolares ou sem flagelos, dependendo da espécie, não formam esporos e são microaerofílicas, o que significa que prosperam em ambientes com baixas concentrações de oxigénio (Kreling *et al.*, 2020).

Os mecanismos de patogenicidade da *C. jejuni* envolvem uma série de estratégias, como motilidade, adesão e colonização, invasão celular e sobrevivência intracelular. A motilidade de *C. jejuni* é assegurada pela presença de flagelos e a forma espiral da mesma, conseguindo assim mover-se através do muco intestinal e aproximar-se das células hospedeiras. A bactéria *C. jejuni* expressa proteínas de adesão na superfície celular, denominadas adesinas que se ligam aos recetores das células hospedeiras. Depois da sua ligação, o *C. jejuni* secreta proteínas que são reconhecidas pelos recetores celulares e consegue invadir as células epiteliais do intestino por meio de um processo de endocitose. A invasão do *C. jejuni* nas células epiteliais provoca danos, o

que perturba o processo normal de absorção intestinal. Para além disso, o *C. jejuni* tem a capacidade de produzir citotoxinas e enterotoxinas e também é capaz de evitar a destruição pelos fagossomas celulares e pode ainda variar os seus antígenos de superfície, dificultando o reconhecimento pelo sistema imunológico e permitindo a persistência no hospedeiro (Kreling *et al.*, 2020).

A transmissão do *C. jejuni* ocorre principalmente através do consumo de alimentos contaminados, embora também possa ocorrer por contacto direto com animais infetados, água contaminada e, em casos mais raros, pelo contacto com pessoas infetadas. A ingestão de alimentos contaminados é a causa mais comum de infeção por *C. jejuni* (Fig. 13). Esta bactéria é frequentemente encontrada em aves, especialmente galinhas e também em leite não pasteurizado, carnes vermelhas, frutas e vegetais não cozinhados (Kreling *et al.*, 2020).

A infeção por *C. jejuni* geralmente causa uma doença gastrointestinal chamada campilobacteriose. O quadro clínico desta doença pode variar, mas os sintomas típicos incluem diarreia, dor abdominal, febre, náuseas e vômitos. Normalmente, os sintomas surgem 1 a 3 dias após a exposição à bactéria e podem durar até 1 semana. Na maioria dos casos a doença é autolimitada, o que significa que os sintomas se resolvem espontaneamente entre 1 e 2 semanas. Em casos raros, a infeção por *C. jejuni* pode desencadear doenças autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), a síndrome de Miller-Fischer ou a artrite reativa (Kemper & Hensel, 2023).

Atualmente, são utilizados vários métodos de diagnóstico de infeção por *C. jejuni* como o exame cultural, testes moleculares e testes imunológicos. Nos métodos de cultura, as amostras (fezes) são cultivadas em meios de cultura que contêm cinco antibióticos (cefoperazona, vancomicina, trimetoprim, polimixina B e rifampicina), aos quais o *C. jejuni* é naturalmente resistente. Outros métodos de diagnóstico clínico incluem PCR em tempo real e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Kreling *et al.*, 2020). Os ensaios ELISA detetam a presença de antígenos específicos de *C. jejuni*, já o método de PCR em tempo real deteta os genes específicos *glyA* e *hipO* respetivamente de *C. coli* e *C. jejuni* (Leblanc-Maridor *et al.*, 2011).

O tratamento da infeção por *C. jejuni* genericamente não requer o uso rotineiro de antibióticos, a menos que a infeção seja grave ou haja complicações. O tratamento concentra-se principalmente em aliviar os sintomas e garantir uma boa hidratação. Em casos mais graves ou em pessoas com condições médicas subjacentes, como imunodeficiência, o médico pode prescrever antibióticos como azitromicina ou ciprofloxacina (Kreling *et al.*, 2020).

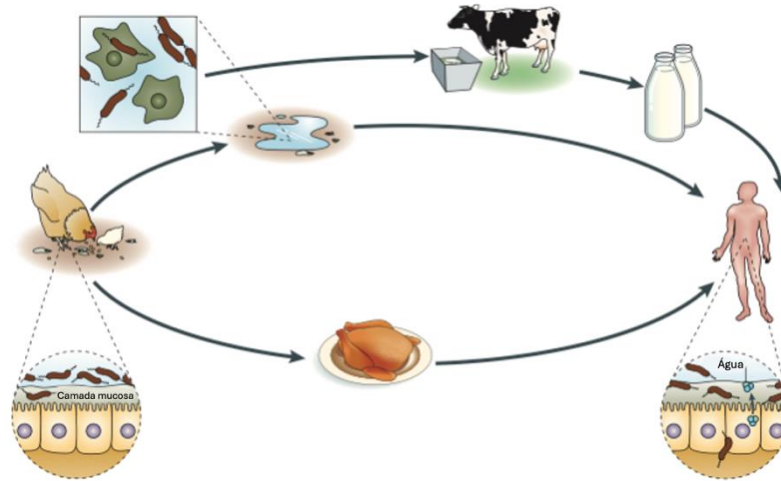


Figura 13. Vias de transmissão da bactéria *Campylobacter jejuni* (adaptado de Young et al., 2007).

3.2.3. Infecções Gastrointestinais por Parasitas

Entre as causas das infecções gastrointestinais, os parasitas gastrointestinais desempenham um papel importante, representando uma variedade de organismos que podem causar uma ampla gama de sintomas e complicações. Estes parasitas que incluem protozoários, como o caso da *Entamoeba histolytica* e do *Cryptosporidium spp*, e helmintas desencadeiam consequências desde desconforto e mal estar gastrointestinal leve até doenças graves e, em casos extremos, fatais, especialmente em populações imunocomprometidas e em crianças.

Entamoeba histolytica

A *Entamoeba histolytica* é um protozoário parasita que pode causar uma infecção gastrointestinal, conhecida como amebíase. A amebíase é uma doença que afeta principalmente o intestino grosso, mas em alguns casos pode envolver outros órgãos, como o fígado (Guillén, 2023). A *Entamoeba histolytica* afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, e todos os anos é responsável por mais de 100 000 mortes (Kantor et al., 2018).

A transmissão da *Entamoeba histolytica* ocorre principalmente a partir da ingestão de água ou de alimentos contaminados com cistos do parasita e também por transmissão direta de pessoa para pessoa, através do contacto fecal-oral, e em homens que tem sexo com homens. Os cistos são a forma de resistência do protozoário, permitindo a sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (Fig. 14) (Guillén, 2023).

Após a ingestão, os cistos libertam trofozoítos móveis no intestino delgado que migram para o intestino grosso. Os trofozoítos são a forma ativa do parasita e reproduzem-se por divisão binária. Os trofozoítos colonizam principalmente o intestino grosso onde encontram um ambiente adequado para a sua proliferação. Estes aderem à mucosa intestinal e têm a capacidade de lisar

as células epiteliais do cólon, induzindo uma superprodução de muco, matando as células hospedeiras e causando inflamação. Os trofozoítos podem ainda provocar a sua disseminação pelo organismo através da corrente sanguínea e invadir diversos órgãos como o fígado, pulmões e coração. A invasão da mucosa desencadeia uma resposta inflamatória local, onde são recrutadas células do sistema imunitário, como neutrófilos, para combater a infecção (Guillén, 2023).

Os sintomas da amebíase podem variar desde casos assintomáticos até quadros clínicos graves. Os sintomas mais comuns incluem diarreia, dor abdominal, febre, perda de peso e, em casos mais graves, pode ocorrer a disseminação da infecção e levar à formação de abscessos no fígado, pneumonia, pericardite e amebíase cerebral. Em casos crônicos, a infecção pode levar a complicações mais sérias como, colite necrosante, megacólon tóxico e fístulas perianais (Kantor *et al.*, 2018).

O diagnóstico da amebíase geralmente é feito através a análise de fezes para identificar a presença de cistos ou trofozoítos do parasita. Para isso, são utilizados diferentes tipos de testes como, microscopia, serologia, detecção de antígenos, técnicas moleculares e colonoscopia com exame histológico. Os ensaios de detecção de antígenos nas fezes podem ser o teste ELISA ou imunofluorescência (Kantor *et al.*, 2018). O diagnóstico molecular é o único que permite distinguir a *E. histolytica* da *E. dispar* (forma não patogénica) e é realizado através da pesquisa do gene que codifica a subunidade pequena do RNA ribossômico (Qvarnstrom *et al.*, 2005).

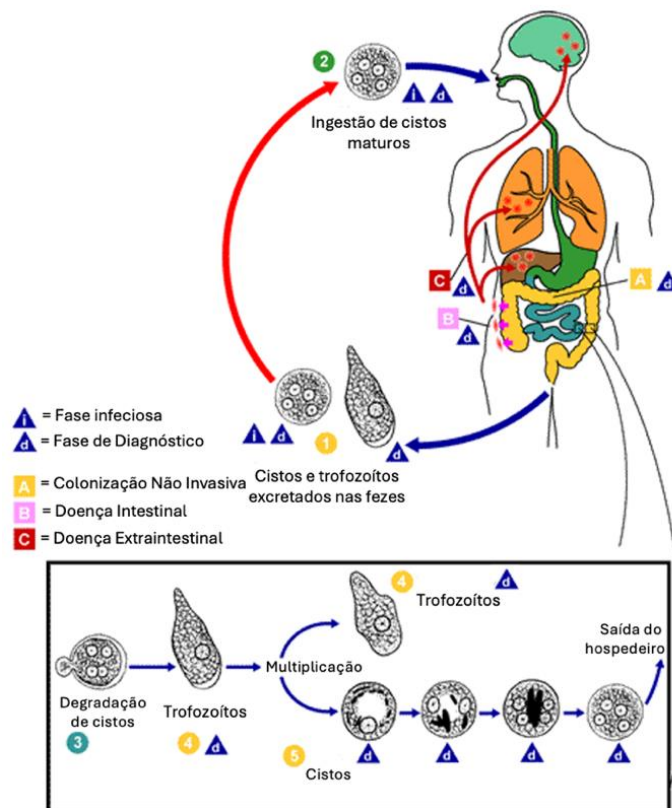


Figura 14. Ciclo de vida da *Entamoeba histolytica* (adaptado de CDC, 2019).

O tratamento da amebíase, causada pela *Entamoeba histolytica*, geralmente envolve o uso de medicamentos antiparasitários. Os nitroimidazóis, por exemplo o metronidazol, são a terapia de primeira linha, mas só são ativos contra a fase trofozoítica do parasita. Pode também ser usado o tinidazol ou o secnidazol para tratamentos com menor duração e também são mais bem tolerados do que o metronidazol (Kantor *et al.*, 2018).

Cryptosporidium spp

O *Cryptosporidium* é um parasita unicelular protozoário que pode causar infecções gastrointestinais no homem e em diversos animais. Atualmente, existem 40 espécies de *Cryptosporidium*, em que pelo menos 20 provocam infecções humanas. As espécies mais comuns que afetam os humanos são o *Cryptosporidium parvum* e o *Cryptosporidium hominis* (O'Leary *et al.*, 2021).

A infecção provocada por *Cryptosporidium* envolve seis fases distintas: os oocistos não esporulados são excretados nas fezes dos indivíduos infetados, estes não são infecciosos; após a excreção nas fezes, os oocistos não esporulados amadurecem e tornam-se oocistos esporulados (este processo normalmente ocorre fora do hospedeiro, em condições adequadas); os oocistos esporulados são ingeridos por um novo hospedeiro, através da ingestão de água ou alimentos contaminados; depois da ingestão, os oocistos esporulados libertam quatro esporozoítos infecciosos; os esporozoítos invadem as células epiteliais do intestino delgado, onde se reproduzem e multiplicam; cada esporozoíto desenvolve-se num trofozoíto esférico, que se multiplicam ativamente dentro das células hospedeiras; os trofozoítos amadurecem e transformam-se em oocistos, que são excretados nas fezes do hospedeiro infetado e são imediatamente infecciosos (Fig. 15) (Bouزيد *et al.*, 2013).

Esses parasitas são transmitidos indiretamente através da ingestão de água, alimentos ou fomites contaminados com oocistos, ou diretamente por via fecal-oral e contacto direto entre pessoas (Bouزيد *et al.*, 2013).

A infecção por *Cryptosporidium* resulta em sintomas gastrointestinais, incluindo diarreia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre. A infecção pode ser especialmente grave em pessoas com sistemas imunológicos comprometidos, como aquelas com VIH, pacientes transplantados ou pessoas submetidas a tratamentos imunossupressores (Bouزيد *et al.*, 2013).

O diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* é geralmente realizado através da análise de amostras de fezes, onde os oocistos podem ser identificados. As análises de fezes são realizadas recorrendo a testes microscópicos com coloração de Ziehl-neelsen, testes de imunofluorescência, o teste de ELISA, ensaios imunocromatográficos que detetam antígenos de oocistos e testes moleculares como PCR em tempo real que detetam o DNA de oocistos (O'Leary *et al.*, 2021). Os testes que apresentam o melhor desempenho na deteção *Cryptosporidium* são os testes de imunofluorescência e os testes moleculares (Bouزيد *et al.*, 2013).

Em pessoas saudáveis e imunocompetentes, a infecção usualmente é autolimitada, e os sintomas podem resolver-se por conta própria. No entanto, em grupos de pacientes com sistemas imunológicos comprometidos, a infecção por *Cryptosporidium* pode ser mais grave e prolongada. Nesses casos, pode ser necessário um tratamento mais específico, como a nitazoxanida, um antiparasitário (O'Leary *et al.*, 2021).

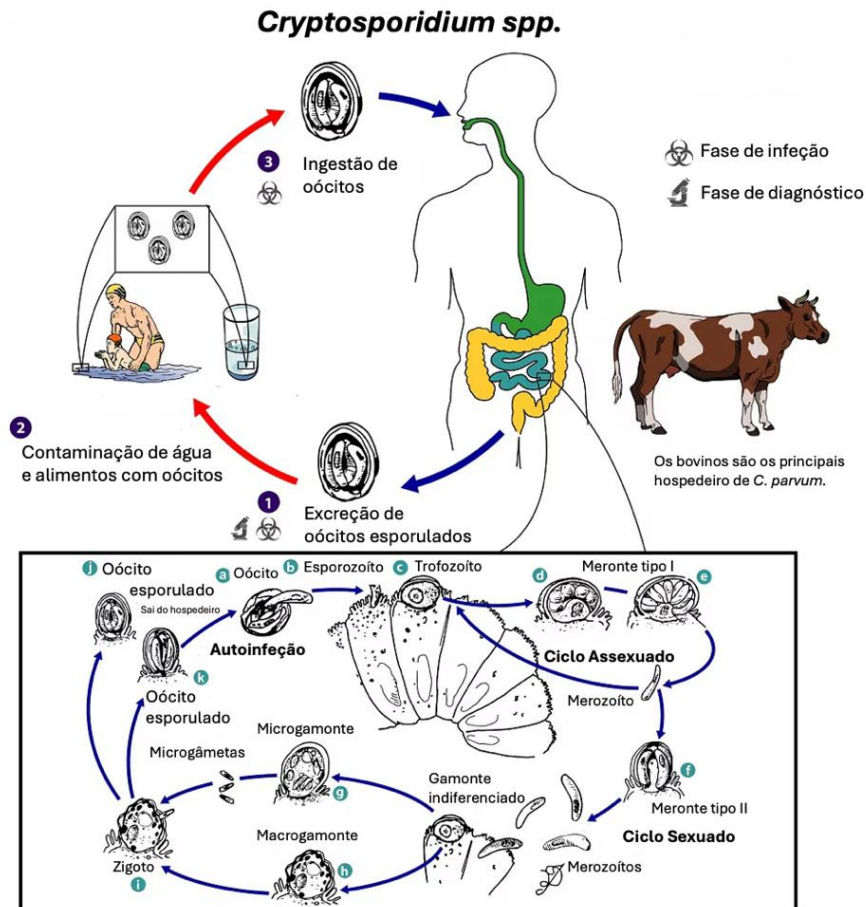


Figura 15. Ciclo de vida do parasita *Cryptosporidium* spp. (adaptado de CDC, 2019).

Amostras:

As amostras para pesquisa de agentes patogênicos que causam infecções gastrointestinais correspondem a fezes e a biópsias gástricas.

Após a colheita das fezes, estas podem ser armazenadas a 4°C durante 24h.

Procedimento:

O processamento das amostras de fezes é sempre o mesmo independente do tipo de agente patogênico a analisar.

Das amostras de fezes é retirada uma porção entre 180-220 mg que corresponde ao tamanho de uma ervilha, que é colocada num tubo *falcon* de 15 mL. Adicionam-se 2 mL de tampão InhibitEX, cuja função é remover os compostos que podem degradar os ácidos nucleicos e inibir a reação de PCR. O tubo é homogeneizado até as fezes se dissolverem no tampão, sendo depois transferidas para um microtubo de 2 mL. O tubo é colocado no banho seco a 95 °C durante 5 minutos, sucedendo depois uma centrifugação a 13200 rpm durante 5 minutos. Do sobrenadante são pipetados 400 µL para purificação de ácidos nucleicos virais e 350 µL para purificação de DNA de bactérias e parasitas.

O procedimento das biópsias gástricas é equivalente ao procedimento das biópsias respiratórias.

3.3. Infecções da corrente sanguínea

Uma das circunstâncias mais perigosas nas doenças infecciosas é a invasão da corrente sanguínea por microrganismos. Os microrganismos no sangue, quer estejam presentes constantemente, ocasionalmente ou de forma transitória, representam um perigo sistémico. O sufixo “mia” deriva da palavra grega para "sangue" e refere-se à presença de uma substância no sangue; a viremia é a presença de vírus na corrente sanguínea, a bacteremia é a presença de bactérias no sangue e a fungemia é a presença de fungos na corrente sanguínea. Por conseguinte, a sépsis ou septicemia indica a presença de organismos, que provocam uma infeção e proliferam, na corrente sanguínea. A invasão da corrente sanguínea por qualquer organismo pode ter efeitos imediatos muito graves, incluindo choque, falência multiorgânica, coagulação intravascular disseminada (CID) e até mesmo morte.

3.3.1. Viremia

A viremia é um indicador importante da disseminação viral no organismo, podendo ter consequências clínicas de extrema importância. A monitorização regular da presença do vírus na corrente sanguínea, por exemplo, é uma prática comum em pacientes com VIH ou transplantados de órgãos, com o intuito de avaliar a eficácia do tratamento antirretroviral. Adicionalmente, a viremia pode desempenhar um papel crucial na transmissão do vírus entre indivíduos, enfatizando a importância de a controlar na gestão de doenças infecciosas.

Em síntese, a viremia ocorre quando há a presença de vírus na corrente sanguínea, podendo ser desencadeada por diversos tipos de vírus e apresentando diferentes sintomas clínicos. O diagnóstico e tratamento precoces são fundamentais para o controlo eficaz da viremia e a prevenção de possíveis complicações futuras. A pesquisa contínua e o desenvolvimento de

terapias antivirais têm um papel crucial no combate a doenças virais relacionadas à presença do vírus na corrente sanguínea.

Hepatite E

O vírus da hepatite E (VHE) é a espécie do novo género *Hepevirus* da família *Hepeviridae*. Anteriormente classificado na família dos calicivírus, o VHE é um vírus pequeno (27 – 34 nm de diâmetro), não envelopado, com um genoma de RNA de cadeia simples e sentido positivo (Fig. 16). O único outro membro desta família de vírus é um VHE aviário conhecido por causar doença de aumento do fígado e do baço em galinhas (Aslan & Balaban, 2020). Desde sempre, o VHE tem sido considerado um vírus sem envelope, no entanto, isto apenas se verifica para os viriões presentes na vesícula biliar e nas fezes. Recentemente, foi reconhecido, que os viriões que circulam na corrente sanguínea existem numa forma associada à membrana, denominados “*quasi-enveloped*” (Fig. 16) (Yin & Feng, 2019).

Existem, pelo menos, 6 genótipos do VHE que causam infeções nos humanos (Yin & Feng, 2019). O homem é o reservatório principal do VHE1 e do VHE2, não tendo sido registada qualquer transmissão dos dois genótipos de animais para seres humanos. A transmissão do VHE1 e do VHE2 entre indivíduos é pouco frequente, tanto em contextos esporádicos como epidémicos, mas pode ocorrer a transmissão do vírus da mãe para o feto durante a gravidez e também existem registos de transmissões de VHE1 por transfusão de sangue. Por outro lado, as infeções por VHE3 e VHE4 são principalmente causadas por transmissão zoonótica, que ocorre através do contacto próximo com animais infetados ou do consumo de produtos alimentares contaminados (mais tipicamente carne crua ou mal cozinhada) (Aslan & Balaban, 2020).

A infeção pelo VHE começa normalmente com sintomas inespecíficos comuns a muitas doenças virais, como febre, dores de cabeça, náuseas e dores de estômago. Os primeiros sinais de uma potencial infeção por hepatite são urina escura, fezes pálidas e descoloração amarela da pele e da esclerótica (i.e., iterícia). No entanto, nem todos os doentes desenvolvem iterícia. O fígado dos indivíduos infetados está tipicamente aumentado e sensível (Aslan & Balaban, 2020).

O período de incubação da infeção pelo VHE é normalmente de 2 a 6 semanas. Na grande maioria dos casos, a infeção pelo VHE é curada pelo próprio organismo e não requer qualquer tratamento específico, apenas se tratam os sintomas. No entanto, a infeção pode progredir para hepatite grave e insuficiência hepática, particularmente em mulheres grávidas e em indivíduos com doenças hepáticas crónicas subjacentes. Nestes casos, o tratamento de infeção é feito com ribavirina (Yin & Feng, 2019).

O diagnóstico clínico da infeção pelo VHE é importante não só para o controlo de surtos, mas também para a gestão clínica da doença. O RNA do VHE pode ser detetado no sangue após 3 semanas de exposição, sendo que a eliminação do vírus nas fezes dura aproximadamente 4 a 6 semanas (Aslan & Balaban, 2020). No LBM, o diagnóstico é realizado através da pesquisa da

região ORF3 do RNA dos genótipos VHE1, VHE2 e VHE3 no plasma do paciente, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real.



Figura 16. Estrutura dos viriões do vírus da Hepatite E (adaptado de Yin & Feng, 2019).

Herpes

Os herpes vírus são uma família de vírus que produzem uma diversidade de doenças, afetando significativamente a saúde das populações. Os vírus do herpes são vírus grandes (150-200 nm) de cadeia dupla de DNA, que pertencem à família *Herpesviridae*. A principal característica desta família de vírus é o facto de resistirem à replicação nas células hospedeiras sem nunca serem completamente eliminados, causando assim infecção latente. Nesta família são conhecidos 8 tipos de herpes vírus humanos, e que se dividem em três subfamílias, α - alfa, β - beta e γ - gamma. Na subfamília α integram-se os vírus herpes simplex tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2) e varicela-zoster (VZV), na subfamília β os vírus citomegalovírus (CMV), herpesvírus 6 (HHV-6) e herpesvírus 7 (HHV-7), e por último, na subfamília γ os vírus Epstein-Barr (EBV) e herpesvírus 8 (HHV-8) (Naughton *et al.*, 2021).

Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus de DNA pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília β -*herpesvirinae*, género *Cytomegalovirus*, sendo reconhecido como a espécie herpesvirus humano 5 (HHV-5). O CMV é o maior vírus da família com um diâmetro de 200 nm e um genoma linear de cadeia dupla de DNA, com mais de 230 mil pares de bases, que codifica aproximadamente 230 proteínas. Este vírus é morfológicamente indistinguível dos outros vírus da família, com uma cápside icosaédrica que envolve o núcleo viral, onde o genoma é armazenado, um tegumento e um invólucro (Fig. 17) (Dioverti & Razonable, 2016).

A infecção por CMV pode ser dividida em dois tipos, infecção primária e secundária. A infecção primária refere-se à primeira vez que uma pessoa é exposta ao CMV e contrai a infecção, já a

infecção secundária define-se pela reativação do vírus num indivíduo já infetado (Dioverti & Razonable, 2016).

O CMV, tal como todos os herpes vírus, sofre latência e reativação nas células do hospedeiro, pelo que, uma vez infetado um indivíduo, o CMV não é eliminado do organismo, mas persiste para criar uma infecção crónica de baixo grau ou permanece em fase de latência, o que permite a transmissão do vírus a novos hospedeiros (Dioverti & Razonable, 2016).

A transmissão do CMV pode ocorrer de várias maneiras, sendo a principal por contacto direto com fluídos corporais (saliva, urina, sangue, sémen, secreções cervicais e leite materno). O CMV também pode ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez (transmissão congénita), durante o parto ou através do leite materno após o nascimento, ou através de transfusões de sangue e transplantes de órgãos (Dioverti & Razonable, 2016).

As manifestações clínicas da infecção por CMV são normalmente assintomáticas e quando provocam sintomas estes dependem da idade e do estado de saúde da pessoa. Habitualmente, a infecção congénita por CMV apresenta sintomas como surdez, microcefalia, hepatomegalia e retinite (Pesch *et al.*, 2021). Na infecção adquirida, o CMV pode provocar sintomas semelhantes aos da gripe (febre, fadiga, dores musculares e dores de garganta) ou como os sintomas da mononucleose infecciosa (febre, linfadenopatia e linfocitose) (Dioverti & Razonable, 2016).

Embora geralmente assintomática em indivíduos saudáveis, a infecção por CMV pode ter sérias consequências em imunocomprometidos, como pacientes com VIH, transplantados e recém-nascidos. Essas consequências podem ser neutropenia (baixa contagem de neutrófilos), hepatite, trombocitopenia, pneumonia, doença gastrointestinal, entre outras (Lautenschlager, 2009).

O diagnóstico de uma infecção por CMV pode ser efetuado através de testes serológicos, que detetam a presença de anticorpos IgM e IgG contra o CMV no sangue, teste de antigenias, como o teste de antigenemia e PCR em tempo real quantitativa, que quantificam uma região de 105 pb do genoma do CMV em plasma (Kotton *et al.*, 2018).

Na suspeita de infecção por CMV ou viremia, a pesquisa de DNA de CMV é realizada em amostras de sangue e urina. No entanto, as amostras de urina só são aceites se forem amostras de doentes imunodeprimidos, uma vez que a amostra de urina de doentes competentes infetados por CMV, irá sempre obter um resultado positivo, pois o CMV está constantemente a ser excretado pela urina, ou de crianças até 3 semanas de vida, para diferenciar a infecção congénita da infecção neonatal. Caso a pesquisa de DNA de CMV dê um resultado positivo nas amostras de urina das crianças, é efetuado o pedido de amostra do teste do pezinho para testar e confirmar se a infecção é congénita ou adquirida pós-parto.

Como a infecção por CMV é geralmente assintomática, não requer nenhum tratamento específico. No entanto, em situações em que a infecção é sintomática ou em pacientes com sistema

imunológico comprometido, o tratamento pode ser necessário. Os medicamentos antivirais mais comuns para o tratamento de infecção por CMV são o ganciclovir e o valganciclovir, tratando-se de inibidores da polimerase. O tratamento é recomendado até à resolução dos sintomas clínicos e até à obtenção de resultados de baixas quantidades de DNA nas amostras clínicas, sendo a duração mínima do tratamento de 2 semanas (Kotton & Kamar, 2022).

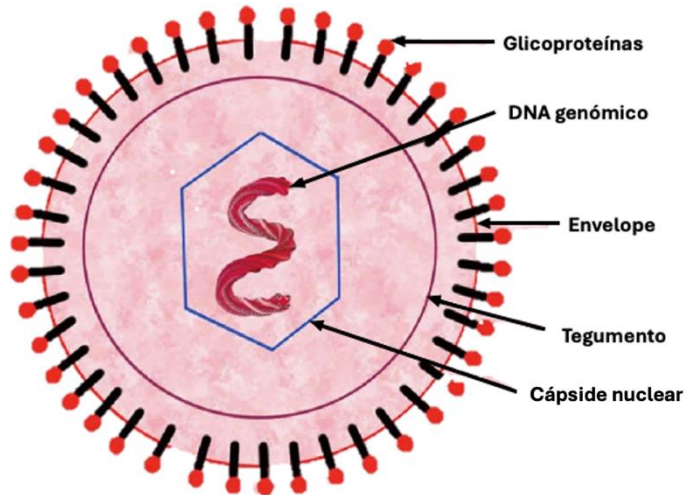


Figura 17. Estrutura do Citomegalovírus (adaptado de Makker *et al.*, 2016).

Vírus Epstein-Barr

O Epstein-Barr vírus (EBV), também conhecido como herpesvírus humano 4, é um γ vírus membro da família *Herpesviridae*. Este é um vírus com envelope, com uma cápsula icosaédrica e o seu genoma é constituído por uma cadeia dupla de DNA com aproximadamente 172 kpb (kilo pares de bases) de comprimento. O seu genoma é altamente compactado, com um tamanho de 150-170 nm e codifica cerca de 85 proteínas e 50 RNAs funcionais não-codificantes (Fig. 18) (Chakravorty *et al.*, 2022).

Originalmente, existiam duas estirpes principais de EBV, EBV tipo 1 e EBV tipo 2, divididas com base na sequência de dois genes latentes codificados pelo EBV, EBNA2 e EBNA3. Enquanto o EBV tipo 2 é exclusivo da África, o tipo 1 está amplamente distribuído por todo o mundo. Atualmente, já estão identificadas mais de 71 estirpes de EBV (Chakravorty *et al.*, 2022).

A transmissão do EBV ocorre de várias formas, desde contacto sexual, transfusão sanguínea, transplante de órgãos como através da saliva, a principal via de transmissão. Nesta via de transmissão, o EBV infeta as células epiteliais da orofaringe, onde se pode replicar e subsequentemente infetar os linfócitos B que circulam pela cavidade oral (Kerr, 2019).

Tal como acontece nos outros vírus da família *Herpesviridae*, o ciclo de replicação do EBV envolve várias etapas, começando com a ligação do vírus a recetores das células hospedeiras (células

epiteliais e linfócitos B). Após a entrada, o vírus liberta o seu DNA no núcleo das células hospedeiras, onde este pode permanecer latente por longos períodos de tempo. Durante a fase de replicação lítica, o vírus reativa e produz novas partículas virais que são libertadas para infetar outras células (Chakravorty *et al.*, 2022).

Uma característica especial do EBV é a sua capacidade de causar infeções latentes nos linfócitos B do sistema imunológico. Durante a infeção latente, o genoma viral permanece no núcleo da célula hospedeira sem produzir novas partículas virais e sem causar morte celular. Isto permite que o EBV evite a deteção pelo sistema imunológico e persista durante toda a vida do hospedeiro. Nesta fase, o vírus pode causar distúrbios na proliferação de linfócitos B, o que contribui para a patogénese de diversas doenças, tais como Mononucleose Infecciosa, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Hodgkin e Carcinoma Nasofaríngeo (Houen & Trier, 2021).

Os sintomas causados pelo EBV podem variar muito, desde manifestações ligeiras a manifestações graves. Os sintomas mais comuns incluem fadiga, febre, dores de garganta, gânglios linfáticos inchados e baço inchado. Em alguns casos, os indivíduos infetados com o EBV podem desenvolver erupções cutâneas, dores musculares e perda de apetite. Embora a maioria das pessoas recupere em poucas semanas da doença aguda, alguns indivíduos apresentam fadiga prolongada que dura meses, uma condição conhecida como síndrome da fadiga crónica. E como já referido, o EBV tem sido associado a complicações mais graves, como a mononucleose infecciosa, o linfoma de Hodgkin e o carcinoma nasofaríngeo (Heldman *et al.*, 2023).

O diagnóstico, geralmente realiza-se pela deteção de anticorpos específicos ou pela deteção de DNA do vírus, no sangue. A deteção de anticorpos contra o EBV pode ser efetuada através de testes serológicos ou ensaio ELISA, já a deteção e quantificação de DNA do vírus é realizada utilizando a técnica PCR em tempo real em amostras de sangue total que pesquisa um fragmento de 97 pb do genoma do EBV (Heldman *et al.*, 2023).

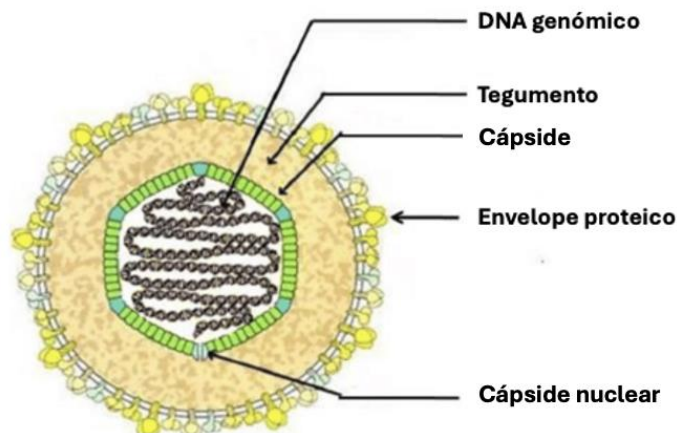


Figura 18. Estrutura do Epstein-Barr vírus (adaptado de Hadi *et al.*, 2015).

O tratamento da viremia do EBV centra-se principalmente no controlo dos sintomas, como febre, fadiga e gânglios linfáticos aumentados. Em casos graves, podem ser prescritos medicamentos antivirais para ajudar a reduzir a replicação viral e aliviar os sintomas, como o aciclovir, ganciclovir e valganciclovir (Chakravorty *et al.*, 2022).

3.3.2. Bacteremia

A bacteremia é uma condição médica caracterizada pela presença de bactérias na corrente sanguínea. Normalmente, a corrente sanguínea é estéril, mas as bactérias podem entrar em circulação através de várias formas, como infeções em outras partes do organismo, procedimentos médicos invasivos ou infeções associadas a dispositivos médicos.

Estas infeções podem ser sistémicas, tendo o potencial de atingirem vários órgãos. A gravidade da bacteriemia pode variar, desde casos ligeiros e transitórios a infeções graves e potencialmente fatais.

Existem três tipos de bacteremia, transiente, intermitente e contínua. Bacteremia transiente é um tipo de bacteremia de curta duração e muitas vezes assintomática. Pode ocorrer durante atividades diárias normais, como escovar os dentes e geralmente é eliminada pelo sistema imunológico sem causar complicações sérias. A bacteremia intermitente ocorre quando a fonte de infeção não é completamente eliminada ou se houver períodos de reativação da infeção. Por último, a bacteremia contínua está associada a infeções mais graves como a endocardite ou pelo acesso de bactérias à corrente sanguínea através de cateteres intravenosos (Pai *et al.*, 2015).

Listeria monocytogenes

A bacteremia causada por *Listeria monocytogenes* é uma infeção grave e potencialmente fatal que requer diagnóstico e tratamento imediatos. A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva que pertence à família *Listeriaceae* e cresce na presença ou ausência de oxigénio (anaeróbia facultativa). Esta bactéria tem uma morfologia bacilar (formato de bastonete) e flagelos, que lhe conferem mobilidade a temperaturas inferiores a 30 °C, mas a 37 °C em humanos, a mesma já não é móvel (Kannan *et al.*, 2020). A bactéria *L. monocytogenes* é dividida em 4 linhagens diferentes, subdivididas em 13 serótipos, em que todas as estirpes são potencialmente patogénicas (Koopmans *et al.*, 2023).

A infeção causada pela bactéria *L. monocytogenes*, também conhecida como listeriose, é principalmente de origem alimentar, contraída através do consumo de produtos alimentares infetados, tais como produtos que não são pasteurizados ou incorretamente cozinhados (Koopmans *et al.*, 2023).

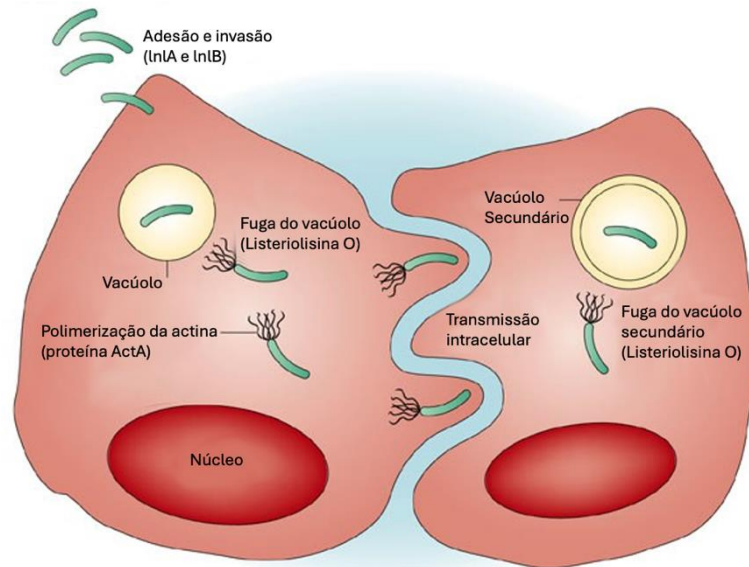


Figura 19. Patogênese da infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes* (adaptado de Pamer, 2004).

Todas as estirpes têm um conjunto de fatores de virulência, nomeadamente, invasão da célula hospedeira, fuga do vacúolo fagocítico, através da ação da toxina formadora de poros listeriolisina O, proliferação intracelular rápida, motilidade e disseminação célula a célula baseadas na actina, pela produção da proteína de superfície *Act A* (Fig. 19) (Lecuit, 2020).

A listeriose humana varia desde sintomas de gastroenterite e gripe não complicada até doença invasiva grave. Nesses casos mais graves as infecções podem ser divididas em três quadros clínicos: listeriose associada à gravidez e neonatal, bacteremia ou infecções no sistema nervoso central (SNC), e meningite ou meningoencefalite (Koopmans *et al.*, 2023).

O período de incubação é variável, desde alguns dias a várias semanas após a exposição ao agente patogénico. Durante este período, os indivíduos podem apresentar sintomas como febre, diarreia, dores musculares, fadiga, choque séptico que conduz à falência multiorgânica e à morte (Koopmans *et al.*, 2023).

Os métodos de diagnóstico apenas diferem no tipo de amostras, independentemente do tipo de infecção. Para diagnosticar as infecções no SNC o diagnóstico é realizado a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR), já para diagnosticar a bacteremia o diagnóstico é realizado em amostras de sangue. Estes diagnósticos são efetuados através de exame cultural e PCR em tempo real, que deteta o gene de virulência *hly*, codificante da proteína Listeriolisina O, responsável pela fuga dos vacúolos fagocíticos (Schlech, 2019).

O tratamento destas patologias envolve a utilização de antibióticos para erradicar a infecção. Os antibióticos β -lactâmicos como a ampicilina ou a amoxicilina são os antibióticos de eleição para o tratamento das infecções por *L. monocytogenes*, podendo ser adicionada gentamicina nos casos

graves ou nos doentes imunocomprometidos. A duração do tratamento é geralmente de 2 a 3 semanas, dependendo da gravidade da infecção e da resposta à terapêutica. Em alguns casos, pode ser necessária a hospitalização de doentes com sintomas graves ou com doenças subjacentes que possam agravar a infecção (Schlech, 2019).

Leptospira spp

A bacteremia causada por *Leptospira spp* refere-se à presença de bactérias do género *Leptospira* na corrente sanguínea. As bactérias *Leptospira spp* são espiroquetas Gram-negativas, que pertencem à família *Leptospiraceae*. Estas bactérias patogénicas são os agentes causadores da leptospirose, uma doença zoonótica que afeta tanto os seres humanos como animais (Haake & Levett, 2015).

As bactérias *Leptospira spp* têm uma forma helicoidal única com endoflagelos que lhes conferem movimento em forma de saca-rolhas, permitindo-lhes penetrar nos tecidos do hospedeiro. As bactérias podem sobreviver em várias condições ambientais, o que as torna resistentes e capazes de infetar uma vasta gama de hospedeiros. Existem cerca de 240 serovares de *Leptospira* classificados em 25 serogrupos, tendo cada serovar reservatórios específicos e causando manifestações clínicas distintas nos seres humanos.

A transmissão da *Leptospira spp*. ocorre maioritariamente através do contacto com água ou solo contaminado com a urina de animais infetados. A bactéria pode entrar no corpo humano através de cortes ou abrasões na pele, e nas membranas mucosas ou por ingestão de alimentos ou de água contaminados (Fig. 20) (VK *et al.*, 2018).

Após a transmissão, ocorre um período de incubação que varia entre 2 e 20 dias, mas geralmente os sintomas manifestam-se após 7 ou 12 dias. Inicialmente, a leptospirose apresenta sintomas clínicos como uma doença febril caracterizada por febre, mialgia e cefaleias. No entanto, a doença pode se agravar e provocar hemorragia pulmonar, sufusão conjuntival, icterícia e lesão renal aguda (Rajapakse, 2022). Como inicialmente, a doença apresenta sintomas inespecíficos podendo ser confundida com outras doenças como gripe, dengue ou malária (VK *et al.*, 2018).

A patogénese da bacteremia por *Leptospira spp* é um processo complexo que envolve várias etapas fundamentais. Depois de entrarem no hospedeiro através da pele ou das membranas mucosas, as espiroquetas disseminam-se rapidamente através da corrente sanguínea para vários órgãos e tecidos. Uma vez na corrente sanguínea, estas bactérias conseguem iludir a resposta imunitária do hospedeiro, alterando os seus antígenos de superfície e expressando determinados fatores de virulência que lhes permitem sobreviver e replicar-se. Isto conduz a bacteremia, com sintomas que vão desde doença ligeira semelhante à gripe até manifestações potencialmente fatais, como a doença de Weil ou a síndrome de hemorragia pulmonar grave (VK *et al.*, 2018).

O diagnóstico da bacteriemia por *Leptospira spp* pode ser difícil devido aos sintomas inespecíficos que se sobrepõem a outras doenças infecciosas. Deve suspeitar-se de leptospirose em qualquer doente com história de exposição de risco e qualquer uma das seguintes situações: cefaleias, mialgias, prostração, ictéria, sufusão conjuntival, características de irritação meníngea, hemorragia ou qualquer outra evidência de envolvimento ou disfunção de órgãos (Rajapakse, 2022). No entanto, o diagnóstico definitivo pode ser efetuado através de cultura de sangue, de detecção de anticorpos específicos, como o teste ELISA e o teste de microaglutinação ou por métodos moleculares como a PCR em tempo real, em que se pesquisa sequências do gene 16S do RNA ribossômico (Haake & Levett, 2015; Backstedt *et al.*, 2015).

O tratamento envolve normalmente a administração de antibióticos β -lactâmicos como a doxiciclina ou a penicilina. A detecção precoce e o tratamento imediato são cruciais para evitar a progressão da doença para formas graves, como a doença de Weil ou a síndrome de hemorragia pulmonar (Haake & Levett, 2015).

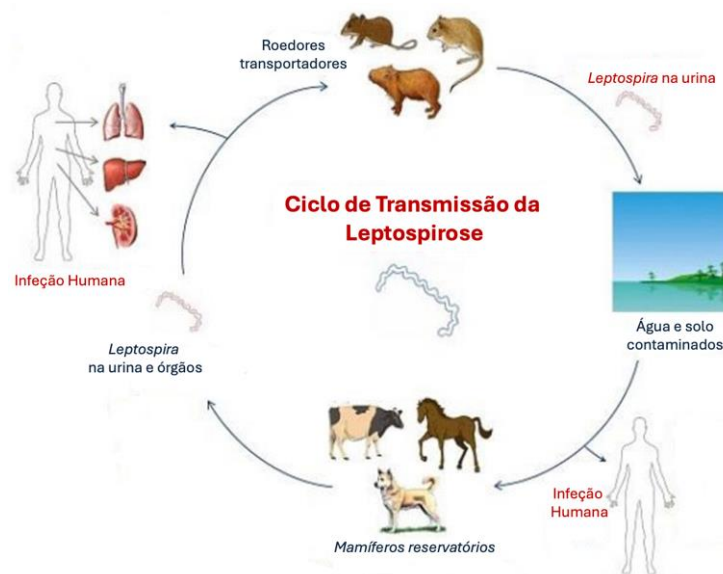


Figura 20. Vias de transmissão da bactéria *Leptospira spp.* (adaptado de Sanar, 2021).

3.3.3. Fungemia

A fungemia, que é caracterizada pela presença de fungos no sangue, geralmente é uma condição grave que ocorre em pacientes com sistema imunológico comprometido e em indivíduos com doenças graves ou terminais. Esta infecção ocorre vulgarmente quando fungos que habitam a pele, trato gastrointestinal ou mucosas invadem a corrente sanguínea. A espécie mais comumente isolada de infecções sanguíneas é a *Candida spp.*

Candida spp

A candidemia, ou fungemia causada por espécies de *Candida*, é uma infecção grave e potencialmente fatal, caracterizada pela presença de fungos do género *Candida* na corrente sanguínea. *Candida spp* é um tipo comum de fungo que normalmente é encontrado na pele e nas membranas mucosas, como a boca, o trato gastrointestinal e a vagina, em quantidades controladas pelo sistema imunológico e pela microbiota normal do organismo. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio, como uma diminuição na função imunológica ou a alteração da microbiota normal, as diferentes espécies de *Candida* podem proliferar e causar infecções. Existem pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* que causam doença em humanos, mas 95% das doenças invasivas são causadas pelos 6 agentes patogénicos mais comuns: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e, em algumas regiões, *Candida auris*. Estes agentes patogénicos causam infecções graves que são coletivamente designadas por candidíase invasiva (McCarty *et al.*, 2021).

O género *Candida* pertence à classe *Saccharomycetes* e família *Cryptococcaceae*. As espécies deste género são fungos unicelulares que podem apresentar-se sob diferentes formas morfológicas, incluindo leveduras, pseudohifas e hifas. Esta capacidade de alteração de forma é importante para a virulência e a capacidade de infetar diferentes tecidos no hospedeiro (Noble *et al.*, 2017).

A fungemia causada por espécies de *Candida* é uma infecção grave da corrente sanguínea com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A patogénese da candidemia envolve a capacidade das espécies de *Candida* de aderirem aos tecidos do hospedeiro, escaparem às respostas imunitárias e formarem biofilmes, o que as torna especialmente difíceis de tratar. A *Candida spp*. possui uma parede celular complexa e uma superfície celular que contém adesinas e glicoproteínas que desempenham um papel importante na aderência a superfícies, facilitando a colonização e a invasão dos tecidos hospedeiros. Este género de fungos também exibe variação genética e plasticidade genómica através de rearranjos cromossómicos, mutações e recombinação genética, o que contribui para a capacidade de adaptação e patogenicidade (Fig. 21) (Noble *et al.*, 2017).

As *Candida spp* são transmitidas através do contacto direto com indivíduos infetados ou superfícies contaminadas. Os métodos de transmissão mais comuns incluem o contacto direto, o contacto sexual, transmissão de mãe para filho durante o parto e a transmissão através de dispositivos médicos contaminados, como cateteres intravenosos, sondas urinárias ou respiratórias (Soliman, 2023).

Os sintomas da fungemia causada por *Candida spp* podem variar consoante o tipo específico de *Candida* em causa e a gravidade da infecção. Os sintomas mais comuns incluem febre, arrepios, hipotensão e alterações da saúde mental. Os indivíduos infetados podem também apresentar sintomas como taquicardia, leucocitose ou leucopenia e sintomas de infeções localizadas, como

lesões cutâneas ou dor abdominal. Os doentes com candidemia grave ou doentes imunocomprometidos também podem ter choque séptico, coagulação intravascular disseminada ou falência multiorgânica (Antinori *et al.*, 2016). O reconhecimento e o tratamento imediatos destes sintomas são essenciais para evitar a progressão da infecção para uma situação potencialmente fatal.

O método de diagnóstico padrão para a detecção de candidemia é a hemocultura, no entanto, também são utilizados outros tipos de diagnóstico como os testes de detecção de antígenos e técnicas moleculares para identificar as espécies específicas de *Candida* (McCarty *et al.*, 2021).

Para reduzir a mortalidade associada à candidemia, é essencial iniciar rapidamente uma terapêutica antifúngica adequada. O tratamento da candidemia envolve a utilização de agentes antifúngicos como o fluconazol, as equinocandinas ou a anfotericina b, dependendo da espécie e dos padrões de resistência. As equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) são preferidas ao fluconazol devido à sua atividade fungicida demonstrada, boa penetração no biofilme, boa tolerabilidade e ausência geral de interações com outros medicamentos. No entanto, as equinocandinas não atingem concentrações terapêuticas no olho, na urina ou no SNC, pelo que são consideradas inapropriadas para o tratamento de infecções que envolvam esses locais. O tratamento da candidemia deve ser continuado durante 14 dias após a primeira hemocultura negativa (Antinori *et al.*, 2016).

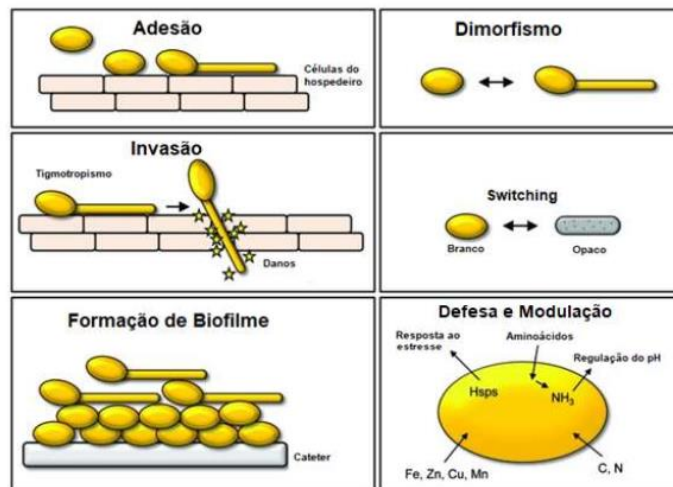


Figura 21. Esquema representativo dos principais fatores de patogenicidade dos fungos do género *Candida* (Rocha *et al.*, 2021).

Amostras:

As amostras para pesquisa de agentes patogênicos que provocam infecções na corrente sanguínea são amostras de sangue.

Procedimento:

Tal como nas infeções respiratórias, o processamento das amostras sanguíneas depende do tipo de pesquisa do agente patogénico.

- VHE e CMV:

Tanto a pesquisa do RNA viral do VHE como a do DNA viral do CMV são realizadas no plasma. Para isso, centrifuga-se o tubo de sangue durante 20 minutos a 2000 rpm para separar as células do sangue por densidade e obter o plasma na camada superior. Para proceder à extração de ácidos nucleicos na pesquisa de VHE são necessários 400 µL de plasma e para pesquisa de CMV é necessário 200 µL.

- EBV:

A pesquisa do DNA viral do EBV é realizada no sangue total, em que se homogeneiza o tubo de sangue com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e pipetam-se 200 µL de sangue para se proceder à purificação de ácidos nucleicos.

- *Listeria monocytogenes*:

A *L. monocytogenes* é uma bactéria que após a infeção e passagem para a corrente sanguínea é fagocitada por glóbulos brancos, o que faz com que a deteção desta bactéria seja realizada no *buffy* do sangue. Para além disso, a *L. monocytogenes* produz uma toxina, a listeriolisina O, que permite à bactéria escapar ao fagossoma dos glóbulos brancos e circular na corrente sanguínea, pelo que também é necessário realizar a pesquisa de DNA bacteriano em amostras de sangue total (Tille, 2017).

O *buffy* é obtido através da centrifugação do sangue. É uma camada fina e esbranquiçada, formada entre as células vermelhas e o plasma, que contém a maioria dos glóbulos brancos e as plaquetas. Retira-se essa camada e coloca-se num microtubo e lava-se com um tampão TE, constituído pela mistura de 100 mL de solução de Tris-HCl (1M, pH: 8) / 20 mL de EDTA (0,5 M, pH: 8), uma vez que a hemoglobina é inibidora da PCR. Após as lavagens, quando obtivermos um *buffy* esbranquiçado, sem nenhuma cor vermelha, descarta-se o sobrenadante, adiciona-se 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K ao *buffy* e coloca-se o microtubo no banho seco a 56 °C durante pelo menos 15 minutos ou até ao *buffy* estar digerido e posteriormente a 95 °C durante 10 minutos, dado que a *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva e é composta por uma parede celular robusta, logo mais difícil de romper para libertar os ácidos nucleicos. Por último procede-se à purificação dos ácidos nucleicos.

- *Leptospira spp*:

A identificação de *Leptospira* em amostras de sangue é feita através da centrifugação do sangue a baixas rotações (1500 rpm) durante 5 minutos, para remover as células sanguíneas. Após a centrifugação, distribui-se o sobrenadante por tubos de 2mL e volta-se a centrifugar desta vez a altas rotações (13200 rpm) durante 15 minutos para concentrar as bactérias no sedimento. Juntam-se os sedimentos dos diferentes tubos num só tubo e incuba-se adicionando 190 µL tampão G2 e 10 µL proteínase K no banho seco a 56°C, seguindo-se a extração dos ácidos nucleicos.

- *Candida spp*:

A identificação de *Candida spp* no sangue é realizada no *buffy* do sangue. O procedimento da obtenção do *buffy* já foi descrito anteriormente. Após a digestão do *buffy* com 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K, é adicionado ao microtubo cerca de 200 µL de liticase e é colocado no banho seco a 37 °C durante 45 minutos. Depois dos 45 minutos, o tubo é centrifugado a 5200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é descartado, são adicionados 190 µL de tampão de lise G2 e 10 µL de proteínase K e o tubo é incubado no banho seco a 56 °C durante pelo menos 15 minutos, seguindo-se a purificação dos ácidos nucleicos.

3.4. Meningite e Infeções do Sistema Nervoso Central

A meningite e a encefalite/meningoencefalites são as doenças mais prevalentes do SNC. A meningite é uma doença neurológica grave caracterizada pela inflamação das membranas protetoras do SNC (que protegem o encéfalo e a medula espinal), denominadas meninges. Esta pode ser causada por bactérias, vírus, e, raramente, por parasitas. A encefalite é uma inflamação do parênquima cerebral que, quando combinada com a meningite é conhecida como meningoencefalite.

Tanto a meningite como a encefalite estão associadas a elevadas taxas de mortalidade e morbidade (meningite bacteriana) e um diagnóstico e tratamento rápidos são cruciais para obter resultados favoráveis.

A meningite pode ser classificada em aguda (infecção dura menos de 5 dias), subaguda (dura mais de 5 dias) ou crónica (dura mais de 4 semanas) (Gundamraj & Hasbun, 2023).

Os agentes etiológicos de meningite mais frequentes são os seguintes:

- Meningite bacteriana: *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Haemophilus influenzae*
- Meningite vírica: *Enterovírus* e HSV-2

3.4.1. Meningite Bacteriana

Neisseria meningitidis

A meningite bacteriana causada pela *Neisseria meningitidis* é uma infecção grave e potencialmente fatal que afeta as meninges.

A *N. meningitidis* é um diplococo gram-negativo que possui um genoma complexo constituído por um único cromossoma circular. Este genoma codifica vários fatores de virulência, tais como a cápsula polissacárida, adesinas e endotoxinas, que permitem à bactéria colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro. Além disso, o genoma da *N. meningitidis* também contém genes responsáveis pela resistência aos antibióticos, o que complica ainda mais as estratégias de tratamento das infeções causadas por este agente patogénico (Hollingshead & Tang, 2019).

A *N. meningitidis* pode ser encapsulada ou não encapsulada. No entanto, quase todos os organismos invasivos de *N. meningitidis* são encapsulados, ou rodeados por uma cápsula de polissacárida. O polissacárido capsular é utilizado para classificar a *N. meningitidis* em treze serogrupos, sendo seis deles (serogrupos A, B, C, W, X e Y) os responsáveis pelas maiorias de casos de doenças a nível mundial (Hollingshead & Tang, 2019).

A *N. meningitidis* é uma bactéria que pode ser transmitida através do contacto próximo com um indivíduo infetado, normalmente através de inalação de secreções respiratórias e de saliva (Caugant & Brynildsrud, 2019).

A patogénese *N. meningitidis* envolve várias etapas fundamentais. Em primeiro lugar, as bactérias colonizam a nasofaringe de um indivíduo hospedeiro através da ligação das pili às células epiteliais da mucosa (Pizza & Rappuoli, 2015). Uma vez estabelecidas, as bactérias formam microcolónias e podem romper a barreira mucosa e invadir a corrente sanguínea, conduzindo a um estado bacterémico. Isto pode resultar na disseminação de bactérias para vários órgãos, incluindo as meninges, onde podem causar inflamação e danos nos tecidos característicos da meningite. A capacidade da *N. meningitidis* de escapar à resposta imunitária do hospedeiro deve-se em parte à sua cápsula polissacárida, que a ajuda a escapar à fagocitose pelas células imunitárias do hospedeiro (Tzeng *et al.*, 2016). Além disso, as bactérias podem produzir endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), que consegue ligar-se a uma série de recetores das células monocíticas e dendríticas do hospedeiro. Este facto desencadeia a secreção de várias citocinas que, em níveis elevados, podem resultar em danos endoteliais e fuga capilar. A endotoxina LPS também induz a libertação de quimiocinas, como as espécies reativas de oxigénio e óxido nítrico (Fig. 22) (Rouphael & Stephens, 2012). A compreensão destes mecanismos de patogénese é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento da meningite bacteriana causada por *N. meningitidis*.

A doença invasiva ocorre geralmente entre 1 e 14 dias após o contacto com a bactéria *N. meningitidis* (Rouphael & Stephens, 2012). Os sintomas mais frequentes da meningite são dores

de cabeça, rigidez do pescoço, febre alta súbita, alteração do estado mental, fotofobia e fonofobia (Khazal *et al.*, 2023).

O tratamento e o diagnóstico da meningite causada por *N. meningitidis* envolvem normalmente uma combinação de antibióticos e cuidados de apoio. O diagnóstico imediato é essencial para o início precoce da terapêutica antibiótica adequada, a fim de evitar consequências graves, como sépsis e choque meningocócico. O método de diagnóstico de *N. meningitidis* é a cultura de LCR obtido por punção lombar. Para além dos testes de cultura, também são utilizados testes de antigénio, testes de imunocromatografia e testes moleculares de PCR em tempo real, sendo este último o que apresenta maior sensibilidade, rendimento e rapidez (Khazal *et al.*, 2023). No teste de deteção de PCR em tempo real, os *primers* utilizados na reação têm como alvo o gene *ctrA*, que codifica uma proteína da membrana externa que regula o transporte da cápsula. Este gene é o mais utilizado para deteção de *N. meningitidis*, uma vez que é exclusivo da bactéria e partes do gene são altamente conservadas em todos os serogrupos (Cavrini *et al.*, 2010).

A terapêutica antibiótica consiste normalmente em antibióticos de largo espectro, como as cefalosporinas de segunda ou terceira geração, cefuroxima, ou a penicilina G. Os cuidados de apoio, incluindo fluidos intravenosos, suporte respiratório e monitorização de complicações, são cruciais no tratamento da meningite causada por *N. meningitidis* (Khazal *et al.*, 2023). Além disso, a vacinação contra a *N. meningitidis* está incluída no Programa Nacional de Vacinação.

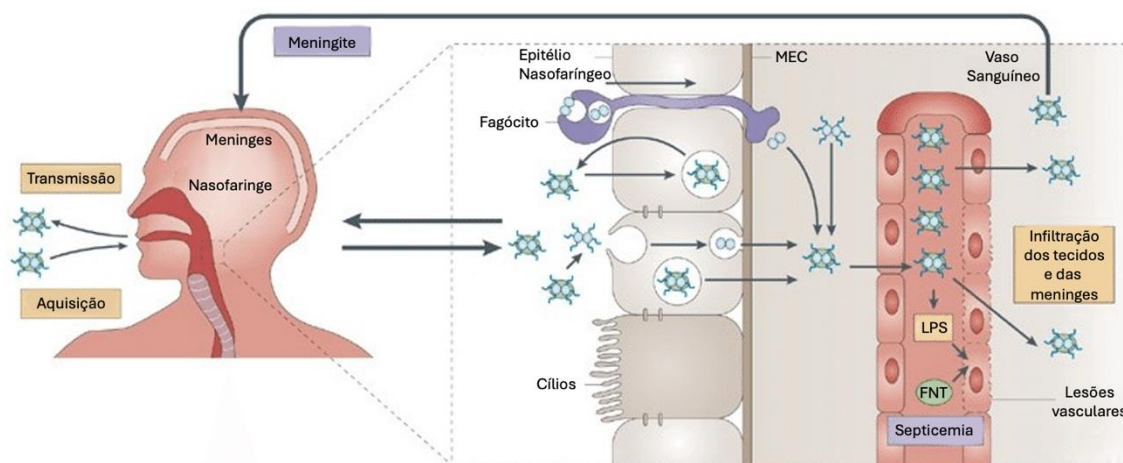


Figura 22. Diferentes fases da patogênese da bactéria *Neisseria meningitidis* (Hayat, 2012).
LPS – lipopolissacarídeo; FNT – fator de necrose tumoral; MEC – Matriz extracelular.

Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*) é uma bactéria Gram-negativa que pode causar diversas infecções, desde respiratórias a meningites, especialmente em crianças. Esta é uma bactéria não móvel, pleomórfica, anaeróbia facultativa da família *Pasteurellaceae* e está normalmente presente no trato respiratório superior e inferior (Duell *et al.*, 2016).

H. influenzae pode ser dividido em dois tipos, os encapsulados (*typable*) e os não encapsulados (*nontypeable*), baseados na presença ou ausência de cápsula. Existem seis serotipos encapsulados, nomeados de a-f e estirpes não encapsuladas e não tipáveis de *H. influenzae* (Duell *et al.*, 2016). Antes de existir uma vacina de prevenção para *H. influenzae*, o serotipo b era o agente mais causador de pneumonia e meningite de *H. influenzae*, nas crianças.

H. influenzae possui diversos fatores de virulência envolvidos no seu processo patológico da infecção. Estes fatores são características específicas que permitem que a bactéria evite as defesas do hospedeiro e cause doenças. Alguns dos principais fatores de virulência incluem a cápsula polissacárida, os *pili* ou fímbrias e as adesinas, as proteases da imunoglobulina A1 (IgA1) e o fator de sobrevivência de macrófagos. A cápsula polissacárida protege a *H. influenzae* de ser atacada por leucócitos. Os *pili* ou fímbrias e as adesinas são responsáveis na adesão de *H. influenzae* às células do hospedeiro, permitindo que a bactéria se fixe e invada os tecidos. *H. influenzae* produz uma enzima denominada protease IgA1, que inativa a IgA1, uma classe importante de anticorpos encontrada nas mucosas. Isso ajuda a bactéria a evitar o sistema imunológico e a colonizar as superfícies das mucosas. O fator de sobrevivência protege o *H. influenzae* de ser fagocitado e morto pelos macrófagos (Wen *et al.*, 2020).

A presença desses fatores de virulência permite que a *H. influenzae* cause uma variedade de infecções, incluindo otite média, sinusite, pneumonia, bronquite, epiglotite e se a bactéria conseguir invadir a corrente sanguínea e atingir o SNC pode causar meningite (Fig. 23) (Wen *et al.*, 2020).

Os sintomas da meningite causada por *H. influenzae* podem variar em gravidade e rapidez de aparecimento, mas geralmente incluem febre alta, dor de cabeça, rigidez do pescoço, fotofobia, vômitos e confusão mental (Khazal *et al.*, 2023).

A transmissão de *H. influenzae* dá-se através do contacto direto com secreções respiratórias de uma pessoa infetada, ou através de inalação de gotículas respiratórias contaminadas ou, em casos mais raros, pode ocorrer a transmissão vertical de mãe para filho durante o parto (Butler & Myers, 2017).

O diagnóstico da infecção provocada por *H. influenzae* pode ser obtido através de culturas bacterianas de amostras clínicas como, LCR e sangue. Ensaio imunoenzimáticos, imunoelectroforese e sorotipagem por aglutinação auxiliam o diagnóstico através da detecção de antígenos capsulares (Butler & Myers, 2017). A técnica de PCR em tempo real detecta o gene *bexA* que codifica a proteína BexA associada à cápsula presente em todos os serotipos encapsulados de *H. influenzae* (Zhou *et al.*, 2007).

As infecções causadas por *H. influenzae* são geralmente tratadas com antibióticos β -lactâmicos, como a ampicilina e/ou amoxicilina. A resistência a antibióticos β -lactâmicos tem vindo a aumentar, por isso é recomendado tratar as infecções por *H. influenzae* com cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona ou a cefotaxima. Além do uso de antibióticos, o tratamento

de suporte pode ser necessário para aliviar os sintomas (Zainel *et al.*, 2021). É importante ressaltar que a vacinação não protege contra todos os tipos de *H. influenzae*, pois existem estirpes não encapsuladas (*nontypeable*) que podem causar infecções, como otite média e sinusite. No entanto, a vacinação contra *H. influenzae* do tipo b tem sido eficaz na prevenção de infecções graves associadas a esse tipo específico (Wen *et al.*, 2020).

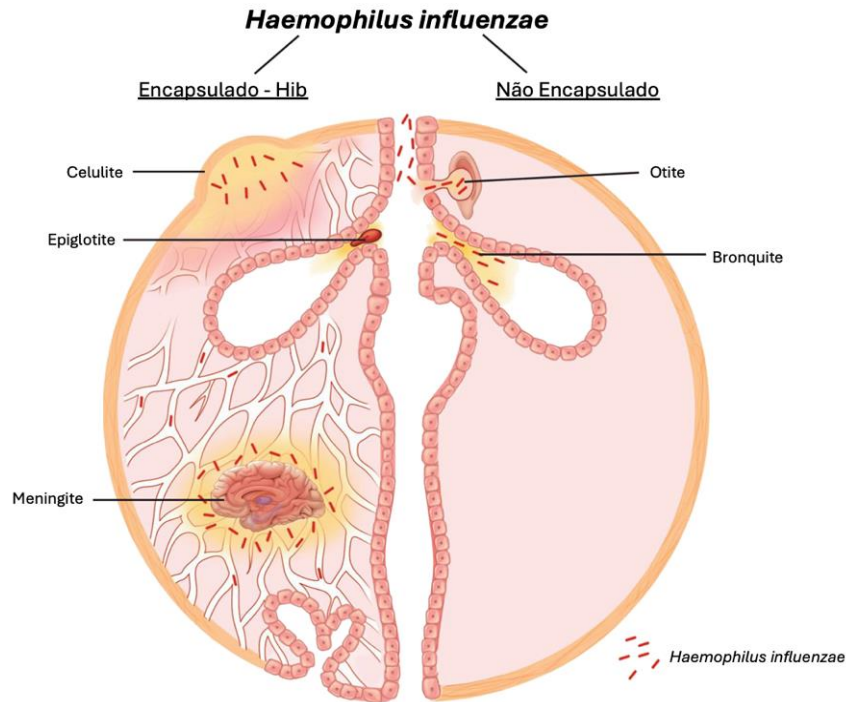


Figura 23. Infecções provocadas pela bactéria *Haemophilus influenzae* (adaptado de Themes, 2017).

3.4.2. Meningite Vírica

Também conhecida como meningite asséptica, é um tipo de meningite causada por uma infecção viral. Os vírus são a causa mais comum de meningite asséptica, sendo os mais detetados os Enterovírus e o HSV-2.

Enterovírus

Os Enterovírus são vírus de RNA de cadeia simples com sentido positivo, não envelopados que pertencem à família *Picornaviridae*. Até ao momento foram identificados mais de 110 Enterovírus, classificados taxonomicamente em quatro espécies, de A a D. Estes vírus têm um genoma de 7400 nucleótidos que codifica quatro proteínas estruturais (VP1-4) e sete proteínas não estruturais (2A-C e 3A-D) (Wright *et al.*, 2019).

Os Enterovírus são transmitidos principalmente através do contacto fecal-oral ou através de secreções respiratórias infetadas. Este tipo de vírus também pode ser transmitido verticalmente de uma mãe infetada para o seu bebé, através da placenta ou da amamentação (Kohil *et al.*, 2021).

A patogénese do Enterovírus inicia-se com a replicação viral no trato respiratório superior e no intestino delgado. A replicação viral pode levar à disseminação do vírus para outros órgãos, como o fígado, o baço e até o SNC, através da corrente sanguínea ou do sistema linfático e estabelecer aí infeção. Os Enterovírus têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e infetar as células do cérebro e as meninges, desencadeando uma resposta inflamatória, a meningite (Fig. 24) (Chen *et al.*, 2020).

Os sintomas da meningite asséptica por Enterovírus são semelhantes aos de outros tipos de meningite e incluem febre, dor de cabeça, rigidez do pescoço, fotofobia, náuseas e vômitos. Em casos mais graves, podem ocorrer convulsões e alterações no estado mental (Kohil *et al.*, 2021).

O vírus infecioso é detetável no tecido linfático 1 a 3 dias após a ingestão do vírus, e é detetado nas fezes durante 6 ou mais semanas (Noor & Krilov, 2016). O método de diagnóstico mais utilizado para detetar meningite asséptica é a técnica de PCR em tempo real que, deteta e quantifica a região 5'NTR do genoma do Enterovírus (Kohil *et al.*, 2021). No entanto, também podem ser utilizadas técnicas de cultura e serologia (Noor & Krilov, 2016).

Não existe um tratamento específico para infeções por Enterovírus, uma vez que essas infeções geralmente são leves e autolimitadas. O tratamento é de suporte, aliviando os sintomas com antipiréticos e analgésicos, quer a infeção seja uma constipação leve ou uma viremia potencialmente fatal (Noor & Krilov, 2016).

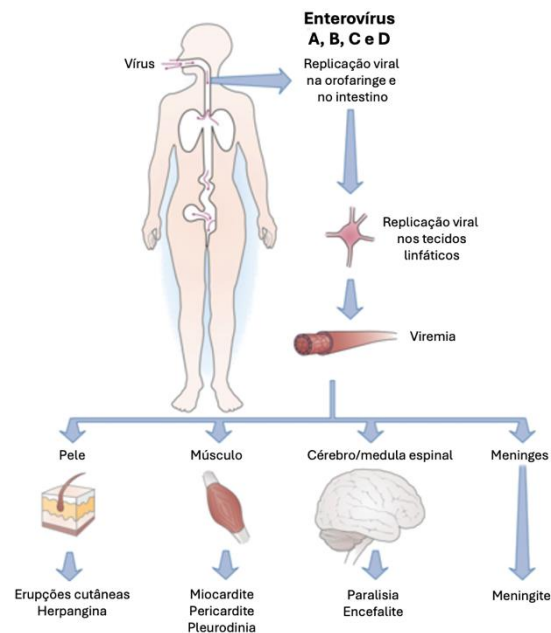


Figura 24. Patogénese dos Enterovírus (adaptado de Clark, 2019).

HSV-2

Embora existam vários tipos de meningite, uma forma menos comum, mas particularmente grave, é a meningite viral causada pelo herpes simplex 2 (HSV-2). Esta forma de meningite viral é normalmente causada pela reativação do vírus HSV-2, que está mais frequentemente associado a infecções genitais. No entanto, quando o vírus evade o sistema nervoso central, pode resultar no desenvolvimento de meningite viral.

O HSV-2 é um vírus pertencente à família *Herpesviridae* que, como já referido, compreende uma ampla gama de vírus. O HSV-2 é um vírus de cadeia dupla de DNA, que contém aproximadamente 154 kpb de tamanho. Este vírus é formado por um envelope derivado da membrana celular do hospedeiro, uma cápside viral que protege o material genético do vírus e glicoproteínas de superfície, gB, gD, gH e gL, que são essenciais para a adesão e fusão do vírus na célula hospedeira (Fig. 25) (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

O HSV-2 infeta as células epiteliais nas superfícies da pele e das mucosas durante a infecção primária, disseminando-se depois por transporte retrógrado ao longo dos axónios nervosos até aos gânglios da raiz dorsal, onde se estabelece a latência. As células neuronais constituem um reservatório para o vírus latente, enquanto as células epiteliais são destruídas durante a replicação lítica do HSV-2. Caso haja uma reativação do vírus, este viaja de volta para a pele e provoca a deteção do vírus nas superfícies epiteliais (conhecida como excreção viral). Esta reativação pode provocar variados quadros clínicos, que variam desde assintomáticos, leves ou potencialmente fatais. Na maioria dos casos, em indivíduos imunocompetentes, o HSV-2 causa infecções leves e autolimitadas. No entanto, a infecção por HSV-2 também está associada a uma elevada morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O HSV-2 pode causar infecções como herpes, herpes genital, eczema herpético, meningite e encefalite (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

A transmissão do HSV-2 ocorre principalmente através do contacto direto com uma pessoa infetada, sendo as principais vias de transmissão o contacto sexual, contacto com lesões e transmissão vertical da mãe para o filho durante o parto (Johnston *et al.*, 2011).

O quadro clínico de meningite por HSV-2 apresenta sintomas como cefaleia, rigidez do pescoço, náusea, vômitos e fotofobia (Gundamraj & Hasbun, 2023).

Nenhum dos sintomas clínicos apresentados são específicos da meningite, pelo que é necessário um diagnóstico rápido, eficiente e exato. Para excluir o diagnóstico de meningite bacteriana, é realizada uma contagem de leucócitos e de neutrófilos no LCR, em que quantidades superiores ou iguais a 500 células/ μ L são indicação de meningite bacteriana. Além disso, na meningite bacteriana, a concentração de glicose no LCR normalmente não excede 300 mg/dL. Após a exclusão de meningite bacteriana, procede-se à deteção de DNA viral por PCR em tempo real, que deteta uma região do genoma do HSV-2 de 215 pb, ou testes serológicos (Kohil *et al.*, 2021).

O tratamento da meningite causada pelo HSV-2, para além do tratamento de suporte, é obtido através de medicamentos antivirais como o aciclovir e o valaciclovir, que suprimem a replicação viral. Estes medicamentos são administrados por via intravenosa para garantir uma rápida absorção e distribuição no corpo, atingindo concentrações terapêuticas eficazes no SNC (Rosenberg & Galen, 2017).

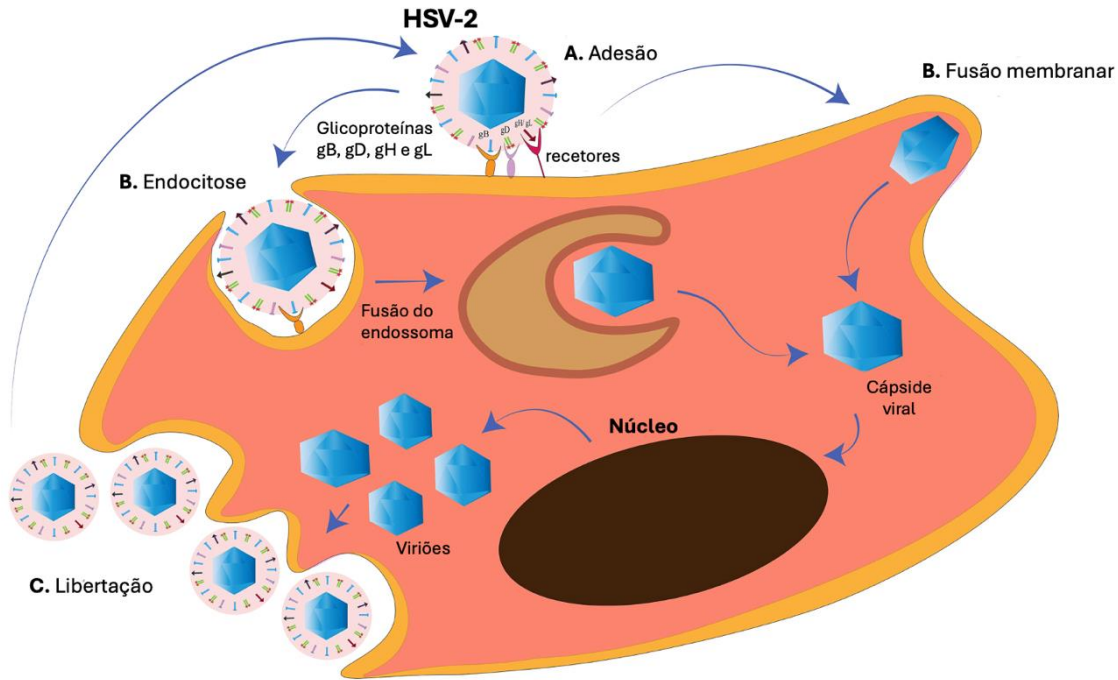


Figura 25. Entrada e liberação do vírus Herpes simplex 2 na membrana celular (adaptado de Banerjee et al., 2020).

Amostras:

A punção lombar é um dos primeiros passos no diagnóstico de um doente com suspeita de infecção do SNC, particularmente meningite. O LCR é colhido assepticamente através da colocação de uma agulha no espaço subaracnoide (punção lombar) entre L3, L4 ou L5 (Kohil et al., 2021). O volume de LCR que pode ser recolhido é determinado pela idade do doente (adulto versus recém-nascido) e pela pressão de abertura do LCR quando a agulha perfura inicialmente o espaço subaracnoide. Devido ao aumento da pressão, o líquido do LCR tem de ser removido mais lentamente, o que pode impedir a colheita de um volume maior. O volume do LCR é crucial para a deteção de microrganismos como bactérias, vírus e fungos. Para a pesquisa de bactérias e fungos são necessários 500 μ L de LCR e para vírus o volume recomendado é de 400 μ L.

Quando o laboratório obtém um volume de LCR insuficiente, o médico é consultado sobre a sequência prioritária de testes laboratoriais. O processamento de amostras demasiado pequenas reduz a sensibilidade dos testes laboratoriais, o que pode resultar em falsos negativos, o que ainda

se torna mais prejudicial para os cuidados do doente do que fazer uma segunda punção lombar para recolher maior quantidade de amostra.

Procedimento:

O processamento inicial do LCR para estudos bacterianos inclui a centrifugação de todas as amostras com um volume superior a 500 µL durante pelo menos 15 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante é descartado, deixando o sedimento e pelo menos 100 µL do líquido. Após a remoção do sobrenadante são adicionados às amostras 190 µL de tampão de lise G2 (800mM de hidrocloreto de guanidina, 30mM Tris-HCl, 30 mM EDTA, 5% Tween 20, 0.5% Triton X-100 com pH igual a 8.0) e 10 µL de proteínase K (20 mg/mL), e incubadas em banho seco, a 56 °C, durante, pelo menos, 15 minutos e incubados 10 minutos são colocadas a 95 °C. Segue-se então a extração de ácidos nucleicos ou podem armazenar-se os eluídos a -20 °C durante, no máximo, 24 horas.

Para a identificação de vírus, são necessários 400 µL do LCR, ou 200 µL, no caso de não haver volume suficiente, para se proceder à amplificação dos ácidos nucleicos.

3.5. Infecções sexualmente transmissíveis

As infeções sexualmente transmissíveis (ISTs), anteriormente conhecidas como Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs), são um grupo de infeções causadas por bactérias, vírus e parasitas que se transmitem através do contacto sexual. O grupo de microrganismos responsável pelas ISTs é heterógeneo, incluindo a *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, herpes genital, papilomavírus humano (HPV), entre outros. As ISTs podem afetar ambos os sexos e podem variar em termos de sintomas, gravidade e consequências para a saúde a longo prazo.

As ISTs têm representado uma grande preocupação para a saúde pública devido à sua disseminação generalizada, impacto na saúde reprodutiva e potenciais complicações crónicas. A variedade de sintomas e a crescente resistência aos antibióticos, em certas infeções, tornam o quadro clínico mais desafiador, dificultando o diagnóstico, o tratamento e a prevenção.

Chlamydia trachomatis

A clamídia é uma das ISTs mais comuns em todo o mundo, é causada pela bactéria *Chlamydia trachomatis*, transmite-se predominantemente através do sexo vaginal, anal e oral e pode causar uretrite e epididimite nos homens (Philips, 2019).

C. trachomatis é uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória, que só pode proliferar no interior de células infetadas, preferencialmente as dos epitélios das mucosas, uma vez que o seu metabolismo depende das células hospedeiras (Witkin *et al.*, 2017).

A *C. trachomatis* pode ser dividida em três tipos biológicos ou biovares, com base nas implicações clínicas e na patogênese, os que se restringem às células epiteliais do olho (biovar do tracoma), do trato genital (biovar genital) e as estirpes mais invasivas que causam o linfogranuloma venéreo (biovar LGV), que é normalmente observado como uma IST, embora a infecção se propague sistemicamente (Janssen *et al.*, 2018). As estirpes podem ainda ser subtipadas em variantes serológicas (serovares). Dentro do biovar do tracoma e do biovar genital, existem cerca de 15 serovares oculares e do trato genital aos quais é atribuída uma designação de serovar, A a C para as estirpes oculares e D a K para os isolados do trato genital. Os isolados mais comuns do trato genital pertencem aos serovares D, E e F. Existem três serovares principais do LGV, L1, L2 e L3, embora uma variante do L2 denominada L2b tenha sido descrita nos últimos anos na Europa e na América do Norte; o L2b espalhou-se rapidamente através da população de "homens que praticam sexo com homens" (Fig. 26) (Thomson & Clarke, 2010).

O quadro clínico é altamente variável desde assintomático até com sintomas de uretrite, hemorragia fora do ciclo menstrual, corrimento vaginal ou uretral e vaginite nas mulheres, disúria, prostatite e epididimite nos homens. Se a infecção não for tratada, esta pode provocar diferentes complicações, principalmente nas mulheres, como a doença inflamatória pélvica (inflamação dos órgãos reprodutores femininos), que por sua vez pode levar a dor abdominal crônica, gravidez ectópica e infertilidade (Fig. 26) (Janssen *et al.*, 2018; SNS24, s.d.). O período de incubação, desde a infecção pela bactéria até ao aparecimento de sintomas, pode variar entre 5 e 21 dias (SNS24, s.d.).

A infecção por *C. trachomatis* é diagnosticada por PCR em tempo real através de zaragatoas secas de exsudados vaginais ou cervicais, exsudados retais e exsudados nasofaríngeos e também através da urina (1^a micção), no caso das mulheres. Nos homens, a infecção por *C. trachomatis* é diagnosticada através da análise da urina (1^a micção) e zaragatoas secas de exsudados uretrais, exsudados retais e exsudados nasofaríngeos.

A técnica de PCR em tempo real utilizada no LBM do CHUSJ consegue detetar *C. trachomatis* e/ou *Neisseria gonorrhoeae*. O protocolo estabelecido amplifica uma região específica de 86 pb do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*, uma região de 66 pb do genoma de *C. trachomatis* e uma região específica de 74 pb do genoma de *Neisseria gonorrhoeae*. Para além da deteção da *C. trachomatis* e da *Neisseria gonorrhoeae*, também se realiza a pesquisa do gene polimórfico da proteína H da membrana *C. trachomatis*, para deteção de LGV.

O tratamento para a *C. trachomatis* é feito com recurso a antimicrobianos como tetraciclina (doxiciclina) e macrólidos (azitromicina), que inibem a síntese proteica e com fluoroquinolonas (ofloxacina) e rifampicina, que inibem a síntese de ácidos nucleicos (Mestrovic & Ljubin-Sternak, 2018). A dose recomendada de tratamento de doxiciclina é de 100 mg, por via oral, 2 vezes ao dia durante 7 dias ou uma dose única de 1g de azitromicina por via oral (CDC, 2021).

O tratamento para LGV é semelhante ao tratamento para a *C. trachomatis* só difere na duração. Para tratar LGV a dose recomendada é 100 mg de doxiciclina, por via oral, 2 vezes ao dia durante 21 dias ou 1g de azitromicina por via oral, uma vez por semana durante 3 semanas (Fuchs & Brockmeyer, 2014).

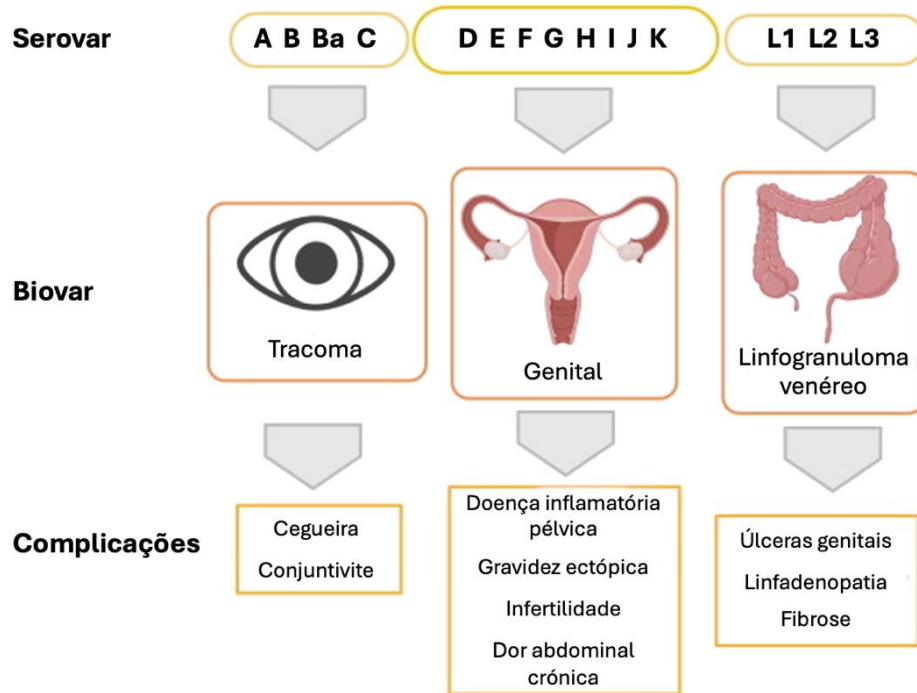


Figura 26. Quadro clínico de infecções causadas pela bactéria *Chlamydia trachomatis* (adaptado de Murray & McKay, 2021).

Neisseria gonorrhoeae

A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria que causa a IST conhecida como gonorreia. É uma bactéria Gram-negativa, diplococo (tende a agrupar-se em pares) e não móvel que pode afetar várias partes do organismo, principalmente as superfícies mucosas dos órgãos genitais, do reto e da faringe (Lin *et al.*, 2021).

A patogénese da *N. gonorrhoeae* inicia-se com a fixação às células hospedeiras, pelos pili que facilitam especificamente a ancoragem às células epiteliais colunares do trato urogenital. Esta ligação inicial é crucial para a colonização e subsequente invasão das células epiteliais pela bactéria. Uma vez dentro das células hospedeiras, a *N. gonorrhoeae* evita a resposta imunitária do hospedeiro modulando as suas proteínas de superfície, formando uma camada protetora que a ajuda a evitar a deteção e destruição pelo sistema imunitário. Além disso, a bactéria secreta toxinas, como os lipopolissacarídeo (LPS), que podem induzir uma resposta inflamatória no hospedeiro, levando ao recrutamento de células imunitárias, como os neutrófilos, para o local da

infecção, o que contribui para os sintomas da gonorreia, como a dor, tumefação e corrimento (Fig. 27) (Unemo *et al.*, 2019).

A transmissão dá-se principalmente através do contacto sexual desprotegido, incluindo sexo vaginal, anal ou oral, com um indivíduo infetado. É mais provável a transmissão de um indivíduo do sexo masculino para o sexo feminino, através das ejaculações, do que ao contrário. A transmissão da infecção também pode ocorrer durante o parto da mãe para o filho (Unemo *et al.*, 2019).

O período de incubação para a infecção urogenital por *N. gonorrhoeae* varia entre 2 e 8 dias. A gonorreia apresenta uma variedade de sintomas em homens e mulheres, sendo a infecção normalmente assintomática nas mulheres e sintomática nos homens. Nos homens infetados, a gonorreia provoca sintomas como secreção uretral, dor ou disúria e dor testicular. Já nas mulheres, a infecção causa sintomas de secreção vaginal anormal, dor ou disúria, hemorragia vaginal entre os períodos menstruais e dor abdominal ou dor durante as relações sexuais (Quillin & Seifert, 2018). Se as infeções não forem detetadas ou adequadamente tratadas, principalmente nas mulheres, podem evoluir para doença inflamatória pélvica, dor pélvica crónica, infertilidade e aumento da probabilidade de gravidez ectópica (Unemo *et al.*, 2019).

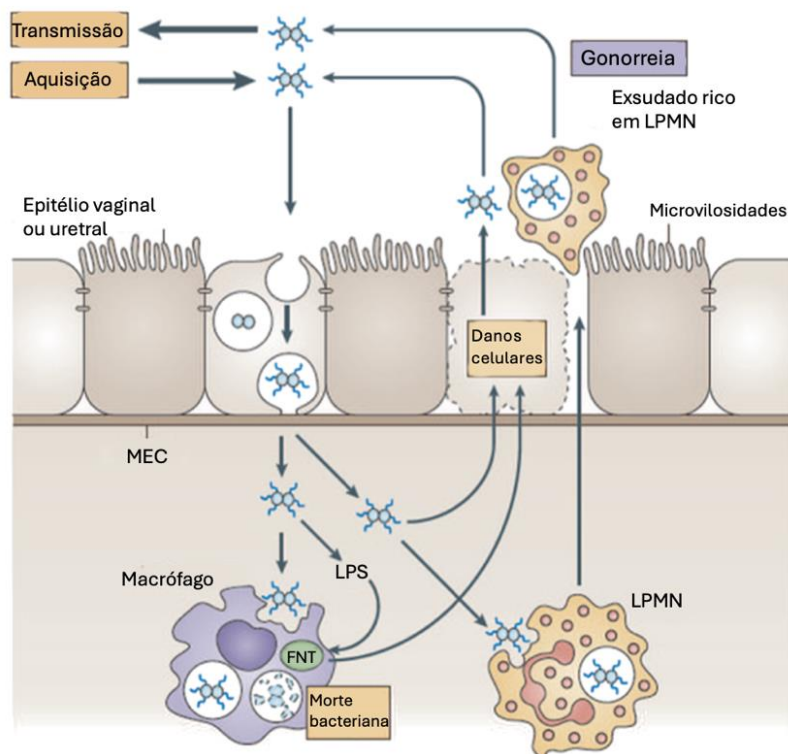


Figura 27. Fases da patogénese da bactéria *Neisseria gonorrhoeae* (adaptado de Smith *et al.*, 2013).

MEC – matriz extracelular; FNT – fator de necrose tumoral; LPS – lipopolissacarídeo; LPMN – leucócitos polimorfonucleares.

O diagnóstico pode ser confirmado através de vários métodos, incluindo PCR em tempo real, culturas bacterianas e microscopia de coloração de Gram. Os testes de PCR em tempo real são testes altamente sensíveis e específicos detectando o material genético da bactéria em amostras de urina e exsudados genitais e nasofaríngeos. As culturas também podem ser efetuadas para isolar e identificar as bactérias, embora possam demorar mais tempo a dar resultados. Além disso, pode ser utilizada a microscopia de coloração de Gram para visualizar os diplococos gram-negativos intracelulares característicos da gonorreia (Unemo *et al.*, 2019).

O tratamento da gonorreia recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) envolve uma combinação de antimicrobianos, como a ceftriaxona, administrado por injeção e a azitromicina, administrado oralmente, para eliminar eficazmente a infecção e evitar complicações. No entanto, devido ao aumento da resistência aos antibióticos, os regimes de tratamento podem variar e devem ser adaptados de acordo com as orientações médicas e a resistência local aos antibióticos (Lin *et al.*, 2021).

Trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis é um parasita unicelular, que pertence ao grupo dos protozoários, e causa uma IST conhecida como tricomoníase. Esta IST é uma das mais frequentemente transmitidas em todo o mundo e afeta tanto homens como mulheres (Stevens *et al.*, 2021).

Ao contrário de muitos parasitas, o *T. vaginalis* não tem uma fase cística no seu ciclo de vida, existindo apenas como um trofozoíto em forma de gota, com um comprimento e largura médios de 10 e 7 µm, respetivamente. Este parasita contém cinco flagelos, quatro anteriores e um posterior, que conferem ao parasita a sua motilidade característica de contração. A célula também possui um axóstilo que desempenha funções na fixação celular e na mitose, um único núcleo definido e vários hidrogenossomas, que estão envolvidos na produção de energia anaeróbica e na fermentação (Fig. 28) (Edwards *et al.*, 2016).

A patogénese do *T. vaginalis* envolve múltiplos fatores que contribuem para a formação e progressão da infeção. O parasita adere às células epiteliais vaginais através de proteínas de superfície, tais como adesinas e lipofosfoglicanos, permitindo a colonização e a evasão da resposta imunitária do hospedeiro. O *T. vaginalis* pode induzir danos nas células do hospedeiro através da libertação de fatores citotóxicos, incluindo proteases de cisteína e peróxido de hidrogénio, levando à inflamação e à destruição dos tecidos. O parasita também pode modular as respostas imunitárias inatas e adaptativas do hospedeiro, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e prejudicando o recrutamento de células imunitárias para o local da infeção. Estes efeitos imunomoduladores contribuem para a cronicidade da infeção e facilitam a persistência do *T. vaginalis* no trato genital do hospedeiro, levando, em última análise, à transmissão do parasita a novos hospedeiros (Edwards *et al.*, 2016).

A transmissão ocorre quase exclusivamente através do contacto sexual, embora a transmissão através de fomites tenha sido documentada, demonstrando que o parasita pode ser transmitido através da partilha de objetos contaminados, como toalhas ou roupas íntimas, que estiveram em contato com os genitais de uma pessoa infetada (Edwards *et al.*, 2016).

A tricomoníase pode provocar uma série de sintomas nas mulheres, em que os mais comuns são prurido e dispareunia, corrimento e vaginite, que pode variar de ligeira a grave. Esta infeção também provoca cervicite, uretrite e complicações mais sérias como a doença inflamatória pélvica. A tricomoníase não tratada ou persistente nas mulheres tem sido associada à infertilidade e a problemas durante o parto (Van Gerwen & Muzny, 2019). Nos homens, a infeção geralmente é assintomática, no entanto pode provocar uretrite e epididimite (Edwards *et al.*, 2016).

O diagnóstico da tricomoníase envolve frequentemente testes laboratoriais como o exame microscópico das secreções vaginais, cultura e, mais recentemente, a técnica de PCR em tempo real. Estes testes são realizados em amostras de urina e exsudados genitais. O diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais para prevenir e reduzir o risco de complicações (Van Gerwen & Muzny, 2019).

O tratamento envolve, normalmente, a utilização de antimicrobianos, como o metronidazol ou o tinidazol, que combatem eficazmente o parasita e aliviam os sintomas. Para além do tratamento, também é importante educar os doentes sobre práticas sexuais seguras para prevenir infeções e evitar a transmissão da doença a outros parceiros sexuais (Van Gerwen & Muzny, 2019).

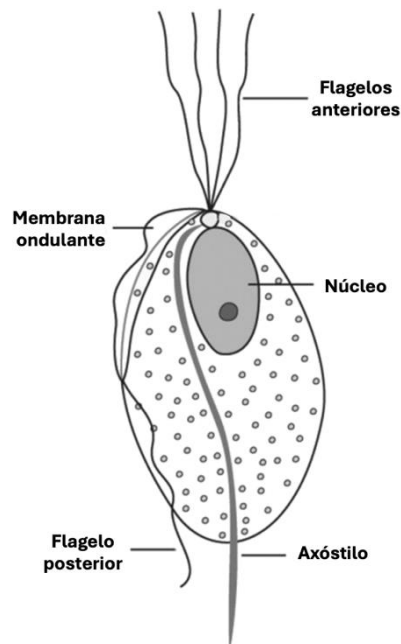


Figura 28. Estrutura do parasita *Trichomonas vaginalis* (Harp & Chowdhury, 2011).

Papilomavírus humano

Uma das ISTs mais comuns é causada pelo papilomavírus humano (HPV), podendo levar a complicações como verrugas genitais e lesões potencialmente cancerosas.

O HPV é um vírus de DNA de cadeia dupla, sem envelope, com um genoma de cerca 8 000 pares de bases, que pertencem à família *Papillomaviridae*. Até à data, foram classificados mais de 400 tipos de HPV e estão continuamente a ser identificados novos tipos de HPV. Estes, podem ser divididos de acordo com o seu potencial para induzir a transformação celular em alto, intermédio ou baixo risco, e também podem ser classificados filogeneticamente (alfa, beta, gama, um e nu), sendo o mais conhecido o género alfa, que inclui tipos de alto risco associados ao cancro do colo do útero (Moody, 2022).

A patogénese do HPV envolve várias etapas fundamentais. Em primeiro lugar, o HPV infeta as células basais do epitélio estratificado através de microlesões na pele ou nas membranas mucosas (Moody, 2022). O vírus entra então na célula hospedeira e exprime os oncogenes virais, E6 e E7, que perturbam os mecanismos de controlo do ciclo celular e promovem a proliferação celular. O E6 tem como alvo o gene supressor tumoral p53, levando à sua degradação e à subsequente evasão da apoptose induzida por danos no DNA. Por outro lado, a E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pRb), favorecendo a sua degradação e permitindo que a célula progrida no ciclo celular sem controlo. Estas oncoproteínas virais acabam por conduzir ao desenvolvimento de cancros associados ao HPV (Fig. 29) (Hewavisenti *et al.*, 2023).

A via de transmissão do HPV é principalmente através do contacto pele com pele ou pele e mucosa. A transmissão por contacto sexual é a mais documentada, mas existem outras vias não sexuais. Essas vias são por transmissão horizontal que inclui fomites, contacto com a pele não sexual, auto-inoculação e transmissão vertical de mãe para filho (Petca *et al.*, 2020).

Nem todas as infeções por HPV apresentam sintomas visíveis, no entanto, quando os sintomas se manifestam, estes dependem do tipo de infeção e das áreas afetadas. As verrugas genitais são as manifestações mais comuns do HPV, seguido de lesões anais e cervicais (Ntanasis-Stathopoulos *et al.*, 2020). Em casos mais graves e persistentes, certos tipos de HPV podem provocar cancro, incluindo cancro do colo do útero, cancro do esófago, cancro da cabeça e pescoço, tumor cerebral, cancro dos pulmões e carcinoma cutâneo (Oyouni, 2023).

O diagnóstico pode ser feito através de exame Papanicolau e biópsias de tecidos de lesões, com testes de PCR em tempo real, para deteção de DNA dos tipos HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82 e HPV de baixo risco 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 e 70 (Ntanasis-Stathopoulos *et al.*, 2020).

O tratamento depende, em grande medida, do tipo de infeção, dos sintomas apresentados e do estado de saúde do indivíduo. Em muitos casos, o sistema imunitário pode eliminar o vírus por si só, sem intervenção médica. No entanto, nos casos em que a infeção persiste ou conduz a

complicações como verrugas genitais ou anomalias cervicais, as opções de tratamento podem incluir medicamentos tópicos, intervenções cirúrgicas ou medicamentos antivirais. Nos casos em que o HPV provoca carcinomas invasivos, estes devem ser tratados de acordo com a melhor terapia oncológica, que pode incluir cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapias direcionadas (Hewavisenti *et al.*, 2023). A prevenção do HPV é possível através da vacinação. Existem duas vacinas atualmente disponíveis em Portugal, a vacina bivalente, que cobre apenas os tipos de HPV 16 e 18, e a vacina nonavalente que protege contra os tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (Oyouni, 2023).

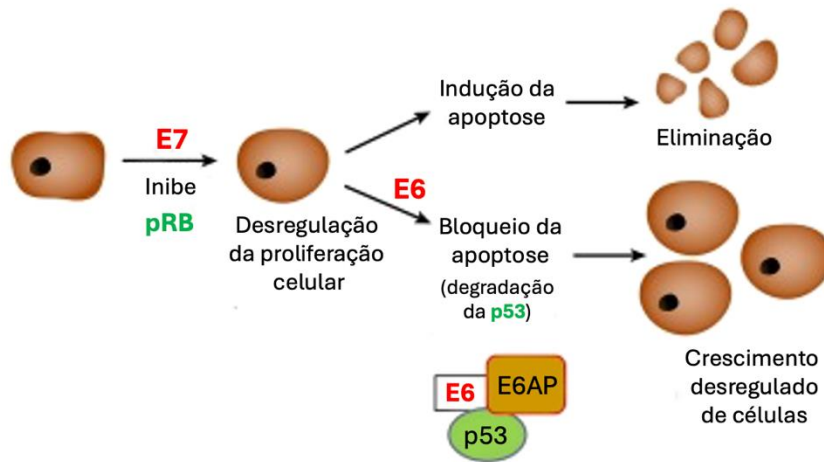


Figura 29. Patogénese das oncoproteínas E6 e E7, do Papilomavírus Humano (adaptado de Hoppe-Seyler *et al.*, 2017).
pRB – proteína do retinoblastoma.

Amostras:

A deteção das ISTs pode realizar-se por pesquisa de DNA do agente patogénico em amostras de urina, exsudado naso ou orofaríngeo, exsudado endocervical, exsudado uretral, exsudado retal e exsudado vaginal.

- Urina:

As amostras de urina podem ser colhidas por profissionais de saúde ou pelo próprio doente, mediante instruções fornecidas pelos profissionais de saúde. Preferencialmente, as amostras de urina devem ser colhidas, em tubos esterilizados, logo pela manhã, no primeiro jato, uma vez que é a urina mais concentrada.

A pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, na urina, são realizadas no equipamento automatizado de extração e amplificação de ácidos nucleicos, o Cobas 6800 (Roche). Para esta pesquisa, transfere-se a urina homogeneizada do tubo de colheita para os tubos de Meio cobas PCR, até que o nível do fluido fique entre as linhas pretas da etiqueta do tubo. Homogeneiza-se o tubo, invertendo 5 vezes, e armazenam-se as amostras entre 2°C e 8°C, até à

realização dos testes. O meio cobas PCR é composto por hidrocloreto de guanidina e tampão Tris-HCL, que estabiliza os ácidos nucleicos e funciona como meio de transporte e de conservação de amostras de urina. Se as amostras de urina não tiverem volume suficiente para as exigências do Cobas 6800, estas serão centrifugadas durante 15 minutos a 13 200 rpm e o sedimento será tratado com 190 µL tampão G2 e 10 µL proteínase k, e incubado no banho seco a 56°C, para ativação da proteínase k, durante pelo menos 15 minutos, ao que seguem 10 minutos a 95 °C.

Para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, a urina é dividida em vários microtubos de 2 mL (pelo menos 8 tubos), e centrifugada durante 15 minutos a 13 200 rpm. Os sedimentos dos diversos tubos são transferidos para um só tubo e o sobrenadante descartado. Adicionam-se 190 µL tampão G2 e 10 µL proteínase k, incuba-se a 56 °C durante, pelo menos, 15 minutos e prossegue-se com a purificação dos ácidos nucleicos.

- Exsudados:

Tal como na urina, os exsudados para a pesquisa de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* podem ser realizadas no equipamento automatizado Cobas 6800. Para isso, inserem-se as zaragatoas secas no tubo de meio fornecido pela Roche, que comercializa o teste, homogeneíza-se o tubo e incubase, pelo menos, 15 minutos antes de retirar a zaragatoa.

O procedimento para deteção de HPV e *T. vaginalis* é idêntico ao procedimento de deteção de vírus respiratórios em zaragatoas secas.

4. Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos antecede qualquer diagnóstico molecular. Esse procedimento permite isolar o DNA e/ou o RNA a partir de amostras biológicas, possibilitando o diagnóstico de doenças genéticas ou infecciosas. A capacidade de extrair ácidos nucleicos puros e íntegros é essencial para garantir resultados precisos e confiáveis, numa variedade de estudos e aplicações.

Durante a extração, várias etapas são realizadas, incluindo a lise celular para libertar os ácidos nucleicos, a remoção de proteínas, lipídios e outros contaminantes, seguidas da purificação e quantificação do DNA ou RNA (Mullegama *et al.*, 2019). A escolha do método de extração de ácidos nucleicos depende da natureza da amostra, do tipo de ácido nucleico desejado e também do tipo de teste pretendido, uma vez que este pode ser sensível a inibidores, como é o caso da técnica de PCR. Os possíveis inibidores incluem solventes orgânicos, sais residuais, EDTA, iões metálicos, detergentes iônicos, hemoglobina ou heparina em amostras de sangue, que podem existir como contaminantes dos ácidos nucleicos. No caso da PCR, estes podem inibir a atividade da DNA polimerase (Koshy *et al.*, 2016).

Os avanços na tecnologia de extração de ácidos nucleicos têm permitido o desenvolvimento de métodos mais eficientes, rápidos e específicos, capazes de lidar com uma ampla gama de amostras, desde sangue e tecidos biológicos até amostras ambientais e clínicas.

4.1. Lise celular

A lise celular é um processo que envolve a ruptura ou destruição da membrana plasmática de uma célula, resultando na libertação do seu conteúdo intracelular, nomeadamente os ácidos nucleicos. Os métodos de lise variam de acordo com a estrutura dos microrganismos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) ou das células.

Vírus:

Os vírus não possuem uma membrana celular como as células dos organismos. Em vez disso, possuem uma cápside proteica, que envolve o material genético do vírus (DNA ou RNA). Além disso, em muitos casos, os vírus também têm uma camada lipídica, conhecida como envelope viral, que circunda a cápside (Lynch *et al.*, 2023).

A lise de vírus refere-se à ruptura da cápside para libertar o material genético viral contido no interior (RNA ou DNA). Alguns métodos comuns de lise viral incluem a utilização de detergentes para romper a cápside lipídica viral, seguida de tratamento enzimático para degradar as proteínas virais. Em muitos casos, são empregues agentes físicos, químicos ou enzimáticos, com o objetivo de desestabilizar a estrutura da partícula viral e assim libertar o material genético.

Bactérias:

A estrutura das bactérias é composta por vários componentes essenciais que desempenham papéis fundamentais na fisiologia e na sua sobrevivência, nomeadamente a parede e a membrana celulares.

A parede celular das bactérias é uma estrutura rígida que envolve a membrana plasmática, conferindo forma e proteção. A composição da parede celular varia entre os diferentes grupos de bactérias, e essa diferença é um dos critérios utilizados para classificar as bactérias em dois grupos principais: Gram-positiva e Gram-negativa (Radkov *et al.*, 2018).

Nas bactérias Gram-positiva, a parede celular é caracterizada por uma camada espessa de peptidoglicano (30 – 100 nm). Essa camada é envolvida por lipoteicóicos e ácido teicóico, contribuindo para a estabilidade e proteção da célula (Rohde, 2019).

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é composta por uma camada mais fina de peptidoglicano (aproximadamente 5 nm), envolvida por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolípidos que desempenham um papel crítico na interação com o meio ambiente e na patogenicidade (Radkov *et al.*, 2018).

Para além da parede celular, as bactérias também apresentam uma estrutura essencial que delimita a célula internamente, denominada por membrana citoplasmática. A composição da membrana celular bacteriana incluiu uma bicamada fosfolipídica que fornece uma barreira seletivamente permeável, proteínas intrínsecas e periféricas importantes no transporte de moléculas, comunicação celular e respostas a estímulos ambientais e também proteínas transportadoras que permitem a passagem seletiva de iões e moléculas através da membrana, ajudando a regular o equilíbrio osmótico e a captação de nutrientes (Radkov *et al.*, 2018).

A lise celular das bactérias é realizada através do uso de agentes como enzimas líticas (lisozima ou proteínase K) ou agentes químicos podem ser usados para enfraquecer ou quebrar a parede celular, levando à rutura da célula. A membrana plasmática é afetada pela ação dos detergentes que atuam nos fosfolípidos e a proteínase K que digere as proteínas.

Fungos:

Os fungos têm uma parede celular rígida e complexa que desempenha um papel crucial na manutenção da forma, integridade e proteção das células fúngicas. Esta parede celular é composta principalmente por quitina, glucanos e proteínas. A quitina é um polímero de N-acetilglicosamina que confere rigidez e resistência à estrutura celular dos fungos (Roncero & Vázquez de Aldana, 2020).

A parede celular dos fungos é diferente da das bactérias, logo o processo de lise é diferente. A lise celular de fungos é alcançada pelo rompimento da parede celular, com uma enzima que quebras as ligações de quitina, a liticase (Goldschmidt *et al.*, 2014). Dentro da parede celular, os fungos

também têm uma membrana celular composta por uma bicamada fosfolipídica. Após o enfraquecimento da parede celular, é necessário solubilizar a membrana para se conseguir obter os ácidos nucleicos, através do uso de agentes químicos e enzimáticos como os detergentes e a proteínase K.

Parasitas:

Os parasitas são seres vivos que vivem em associação com outros organismos, os hospedeiros, com o objetivo de obter nutrientes e abrigo. As suas estruturas celulares variam de acordo com o tipo de parasita, sendo geralmente classificados em dois grupos principais: os protozoários e os helmintas (vermes). Os protozoários são organismos unicelulares. Por outro lado, os helmintas são organismos multicelulares, e as suas estruturas celulares são compostas por diversas células organizadas em tecidos e órgãos (Lynne, 2007).

Os protozoários, por serem unicelulares, têm estruturas celulares mais simples. As suas células possuem as estruturas comuns às células eucarióticas, como membrana plasmática, citoplasma, núcleo, lisossomas, complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, e podem ter estruturas especializadas como os cílios, flagelos e vacúolos contráteis. Para além dos organelas já referidos, os protozoários podem apresentar um endoesqueleto ou um exoesqueleto (Lynne, 2007).

As estruturas celulares dos helmintas são mais complexas devido à sua natureza multicelular. Estes têm vários tipos de células que formam tecidos especializados e órgãos. Estas células podem incluir células musculares, células nervosas, células reprodutivas e várias outras, dependendo do tipo de helminta (Lynne, 2007).

O processo de lise celular dos parasitas é semelhante à lise celular das bactérias, em que são utilizados detergentes para solubilizar a membrana plasmática, atuando nos fosfolípidos e a proteínase K para degradar as proteínas.

Como referido anteriormente, os ácidos nucleicos podem ser extraídos de diversas amostras biológicas e de diferentes microrganismos e, como tal, diferentes metodologias são utilizadas. Dependendo da desintegração celular ou do processo de lise, os métodos de extração de ácidos nucleicos podem ser divididos em métodos mecânicos e não mecânicos, ou um conjunto dos dois (Ali *et al.*, 2017).

Nos métodos de lise mecânica, a tensão de cisalhamento é utilizada para deformar e romper as células. A tensão de cisalhamento pode ser gerada através dos seguintes processos que são os mais utilizados: moinho de bolas, homogeneizadores, prensa de pressão elevada e ultrassons (Chen *et al.*, 2023).

A extração de lise não mecânica, recorre a agentes químicos ou enzimáticos para realizar a lise celular e a libertação de ácidos nucleicos. Os métodos de lise não mecânica incluem lise química, lise enzimática e choque osmótico (Chen *et al.*, 2023).

No LBM do CHUSJ, para realizar a extração de ácidos nucleicos, são utilizados métodos de lise não mecânica, nomeadamente lise química e lise enzimática.

4.1.1. Lise química

A lise química utilizada na extração de ácidos nucleicos, envolvendo a adição de agentes líticos que desintegram as membranas celulares. Detergentes e tampões de lise são comumente utilizados como agentes líticos, promovendo a quebra das barreiras celulares.

Existem diferentes tipos de lise química que podem ser escolhidos dependendo da aplicação específica e do tipo de amostra, nomeadamente a lise alcalina e lise com detergentes.

A lise alcalina envolve o uso de uma solução alcalina, geralmente uma solução de hidróxido de sódio (NaOH). O íon OH⁻ reage com a membrana celular e quebra as ligações éster de ácido gordo-glicerol, tornando subsequentemente a membrana celular permeável, o que promove a libertação do conteúdo intracelular (Alexander, 2016).

A lise química utiliza detergentes para solubilizar lípidos e proteínas da membrana celular, criando poros e, eventualmente, lise completa. Os detergentes conseguem lisar as células devido à sua capacidade de perturbar as interações hidrofóbicas-hidrofílicas, interações lípido-lípido, lípido-proteína e proteína-proteína. Estes podem ser divididos em três categorias com base na sua capacidade de transporte de carga, catiónicos, aniónicos e os não iónicos. Para realizar a lise celular podem ser utilizados detergentes iónicos fortes como o SDS (dodecil sulfato de sódio), que desnatura proteínas na ordem dos segundos ou detergentes não iónicos mais suaves, como o Triton X-100, que provocam uma lise mais lenta e não desnaturam as proteínas (Shehadul Islam *et al.*, 2017).

4.1.2. Lise enzimática

Na lise enzimática, diferentes enzimas são utilizadas para degradar os componentes específicos da parede celular ou da membrana celular, dependendo do tipo de organismo alvo. Na lise de bactérias, utiliza-se frequentemente a lisozima e a proteínase K que atuam hidrolisando as ligações peptidoglicanas na parede celular bacteriana, enfraquecendo-a e levando à lise celular. Para a lise de fungos, utiliza-se a enzima lítase, que hidrolisa as ligações de quitina presente na parede celular dos fungos (Goldschmidt *et al.*, 2014).

Para realizar a extração de DNA são adicionadas RNAses ao tampão de lise, pois assim o RNA é degradado e o DNA é isolado. Alternativamente, podem ser adicionadas DNAses que promovem a degradação do DNA e o RNA é isolado.

No LBM, para o processo de lise celular, utilizam-se componentes de lise enzimática e lise química, como a enzima proteínase K em conjunto com o tampão de lise G2, que é constituído

por 800mM de hidrocloreto de guanidina, 30mM Tris-HCl, 30 mM EDTA, 5% Tween 20, 0.5% Triton X-100 com pH igual a 8.

4.2. Purificação de ácidos nucleicos

A purificação de ácidos nucleicos refere-se à obtenção de DNA e/ou RNA na sua forma pura e livre de contaminantes. Após a lise celular, obtêm-se proteínas, restos celulares, e ácidos nucleicos. Estes últimos são então purificados de forma a ficarem aptos para análises moleculares como *Northen blotting*, PCR, entre outros (Dairawan & Shetty, 2020).

Existem diversas técnicas utilizadas para purificação de ácidos nucleicos, como extração com fenol/clorofórmio, cromatografia em coluna, extração com sais, extração em fase sólida e cromatografia de afinidade (Dairawan & Shetty, 2020).

Os kits comerciais disponíveis para a extração de DNA e RNA oferecem conveniência, eficiência e reprodutibilidade nos procedimentos. As principais vantagens destes kits incluem protocolos simplificados, tempo de preparação reduzido, reagentes pré-preparados, economia de espaço e recursos, automação, eficiência e rendimento elevados e minimização de contaminação cruzada (Li *et al.*, 2021).

Os kits de extração em fase sólida disponíveis no mercado, baseiam-se maioritariamente na ligação dos ácidos nucleicos a um suporte sólido de sílica na presença de um sal caotrópico, como é o caso das partículas magnéticas revestidas com sílica e das colunas cromatográficas com matriz de sílica (Zou *et al.*, 2017).

Os ácidos nucleicos, ligam-se à sílica devido a forças eletrostáticas, forças hidrofóbicas e pontes de hidrogénio. A sílica é carregada positivamente enquanto os ácidos nucleicos têm carga negativa conferida pelos iões fosfato, o que leva à sua interação electrostática promovendo a adsorção dos ácidos nucleicos à sílica (Schmitz *et al.*, 2020). O DNA é uma molécula hidrofílica, pois possui grupos fosfato e grupos hidroxilo ao longo da sua estrutura. No entanto, há regiões na molécula, como as bases nitrogenadas, que têm propriedades hidrofóbicas. Para realizar a extração de ácidos nucleicos é, frequentemente, utilizado um tampão caotrópico, como o tiocinato de guanidina, que promove simultaneamente a desnaturação de proteínas e a adsorção dos ácidos nucleicos. Os agentes caotrópicos têm a capacidade de destabilizar a estrutura do DNA, aumentando a exposição de regiões hidrofóbicas, o que favorece a interação com grupos hidrofóbicos presentes na sílica. Estes agentes também aumentam a afinidade ácidos nucleicos-sílica através da desidratação da superfície o que promove pontes de hidrogénio entre os ácidos nucleicos e a superfície da sílica, que contém grupos silanol (-SiOH) (Katevatis *et al.*, 2017).

4.2.1. Partículas magnéticas

A extração com partículas magnéticas é uma técnica utilizada para isolar e purificar componentes específicos de uma amostra, como ácidos nucleicos, proteínas ou outras biomoléculas (Katevatis *et al.*, 2017).

As partículas magnéticas consistem num núcleo de material magnético, geralmente óxidos de ferro, como óxido de ferro superparamagnético (Fe_3O_4) ou óxido de ferro de cobalto (CoFe_2O_4), revestidas por uma camada de material que pode ser funcionalizada para diversas aplicações. O revestimento das partículas magnéticas para além de promover a funcionalização da superfície, também tem como objetivo fornecer estabilidade coloidal, impedir a agregação das partículas e conferir seletividade na captura dos ácidos nucleicos (Li *et al.*, 2021).

Neste método de extração, as partículas magnéticas são funcionalizadas com grupos que interagem seletivamente com o alvo desejado na amostra, como por exemplo o uso de sílica para extrair ácidos nucleicos. A sílica é o revestimento mais utilizado para extrair ácidos nucleicos devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade, área superficial elevada, baixo preço e facilidade de modificação da superfície (Li *et al.*, 2021).

Após a adsorção da molécula alvo às partículas magnéticas, nas condições iónicas e de pH indicadas, é aplicado um campo magnético para atrair as mesmas, permitindo a captura eficiente da molécula alvo. Após a captura, o sistema é lavado para remover impurezas e componentes que não ligaram às partículas, utilizando tampões de lavagem e por fim etanol. Por último, as moléculas alvo são eluídas em tampão de eluição devido a baixas concentrações salinas e podem ser utilizadas na técnica molecular apropriada (Fig. 30) (Li *et al.*, 2021).

No LBM são utilizados dois equipamentos de extração de ácidos nucleicos que utilizam partículas magnéticas, o equipamento EZ1 Advanced e o QIASymphony SP.

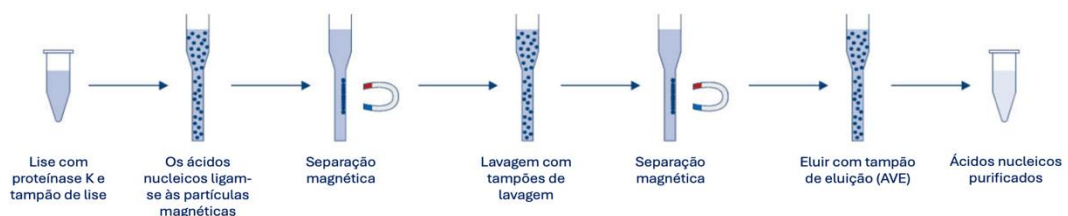


Figura 30. Procedimento da técnica de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de partículas magnéticas (adaptado de Qiagen, 2021).

- **Equipamento EZ1 Advanced e QIASymphony SP**

A extração de ácidos nucleicos com partículas magnéticas é uma abordagem eficiente e automatizável, frequentemente usada no diagnóstico molecular. Como referido anteriormente, é uma técnica que utiliza esferas magnéticas funcionalizadas, capazes de se ligar seletivamente a ácidos nucleicos, permitindo a sua isolamento e posterior purificação.

Existem diversos métodos e equipamentos para realizar esse processo de forma automatizada, incluindo o equipamento EZ1 Advanced e o QIASymphony SP da empresa Qiagen® (Fig. 31).

Estes equipamentos efetuam a extração e purificação de ácidos nucleicos de uma vasta gama de amostras, incluindo sangue, plasma e outros líquidos biológicos, fezes, exsudados, LCR, tecidos biológicos, urina, amostras respiratórias e medula óssea (Uwiringiyeyezu *et al.*, 2022).

Tanto o EZ1 Advanced como o QIASymphony SP utilizam a tecnologia de partículas magnéticas para extrair DNA e RNA, no entanto o EZ1 advanced tem a capacidade de processar 6 amostras em simultâneo num máximo de 43 minutos e o QIASymphony pode processar no máximo 96 amostras em lotes de 24 (Phan *et al.*, 2022).

O equipamento EZ1 Advanced é compatível com uma variedade de kits comerciais com protocolos otimizados e reagentes específicos para garantir a extração eficiente de DNA e RNA (Phan *et al.*, 2022). Alguns desses kits são EZ1 DSP Virus Kit, EZ1 DNA Tissue Kit e EZ1 DNA Blood Kit da marca Qiagen®.

Os kits referidos anteriormente são constituídos por cartuchos com os tampões necessários para cada passo da extração de ácidos nucleicos, lise, ligação às partículas magnéticas, lavagem dos ácidos nucleicos ligados e eluição dos ácidos nucleicos puros.

- EZ1 DSP Virus Kit:

O EZ1 DSP Virus Kit é um kit comercial da marca comercial QIAGEN, para a extração automatizada de ácidos nucleicos de vírus em amostras como, plasma, urina, amostras respiratórias, exsudados, fezes, LCR e tecidos biológicos (Phan *et al.*, 2022).

Para extração de DNA e RNA de vírus são utilizados diversos tampões, incluindo o tampão de lise, a proteínase k, que é responsável pela degradação das proteínas presentes na amostra, ajudando também na libertação dos ácidos nucleicos virais; o tampão de ligação, que fornece todas as condições iónicas e pH para os ácidos nucleicos se ligarem às partículas magnéticas; dois tampões de lavagem para lavar os ácidos nucleicos aderidos às partículas magnéticas e por fim o tampão de eluição, utilizado para remover os ácidos nucleicos das partículas magnéticas.

Para além destes tampões, também é usado o RNA *carrier*. Este último, tem como função promover a ligação dos ácidos nucleicos à superfície das partículas magnéticas e reduzir a

degradação de RNA viral no caso das RNases estarem presentes como contaminantes (Phan *et al.*, 2022).

Os protocolos programados para este tipo de kit permitem a extração de DNA e RNA de amostras com volumes de 100, 200 e 400 μL e eluição em 60, 90, 120 ou 150 μL .

A preferência é sempre utilizar o maior volume de amostra e utilizar o menor volume de eluição (por exemplo 400/60 μL), para obter uma maior concentração possível.

- EZ1 DNA Blood kit:

Este kit utilização na extração automática de DNA, de diferentes agentes patogênicos, em amostras como sangue total e medula óssea.

Tal como no EZ1 DSP Virus Kit, são necessários tampões para realizar a extração e purificação de DNA. Para isso são utilizados o tampão de lise; o tampão de ligação, que proporciona as condições ideais para a ligação seletiva do DNA às partículas magnéticas; os tampões de lavagem, para remover contaminantes e, por último, o tampão de eluição, que liberta o DNA das partículas magnéticas.

O EZ1 DNA Blood kit também inclui protocolos otimizados para a extração de DNA de amostras com 200 e 350 μL de volume e podem ser eluídas em 50, 100 ou 200 μL .

Este kit é utilizado para extrair DNA de amostras de sangue para pesquisa de DNA de diferentes agentes patogênicos como EBV, Adenovirus, HHV-8, BKV, *Plasmodium spp*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

- EZ1 DNA Tissue Kit:

O EZ1 DNA Tissue Kit é um kit de extração para purificar DNA de uma variedade de amostras de tecido. Tal como os outros kits já referidos, este também utiliza a tecnologia das partículas magnéticas para o processo de purificação de ácidos nucleicos, o que permite a remoção eficiente de contaminantes e impurezas, resultando em DNA de alta qualidade.

O procedimento de purificação de ácidos nucleicos utilizando o EZ1 DNA Tissue Kit é semelhante ao procedimento do EZ1 DNA Blood kit e EZ1 DSP Virus Kit.

Após a extração dos ácidos nucleicos, os eluídos podem ser armazenados a 2-8°C durante 24h ou então armazenados entre -80°C e -20°C por longos períodos.

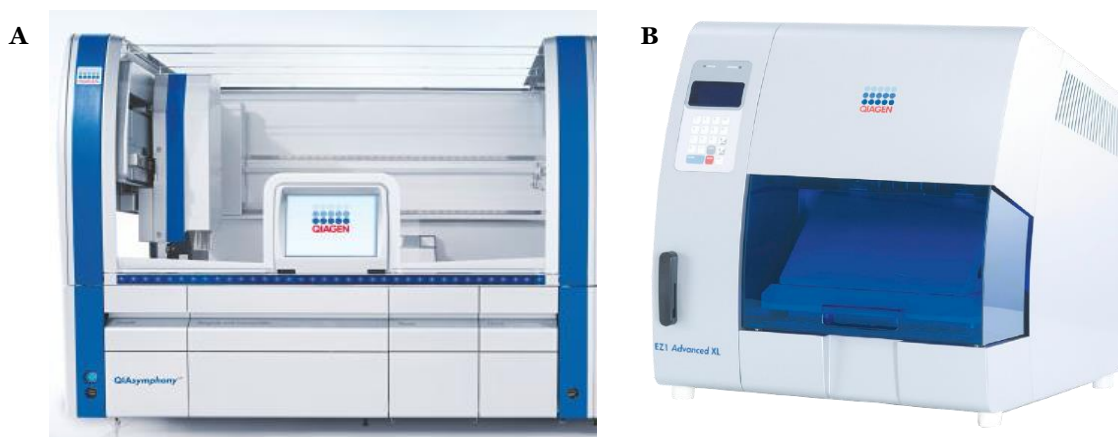


Figura 31. Equipamento automatizado de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de partículas magnéticas, A: QIASymphony, B: EZ1 Advanced XL.

4.2.2. Colunas de sílica

Tal como a técnica de purificação com esferas magnéticas, as colunas de sílica baseiam-se na capacidade da sílica adsorver seletivamente os ácidos nucleicos em condições específicas, proporcionando uma purificação de alta qualidade.

As colunas utilizadas são geralmente compostas por uma membrana de partículas de sílica altamente porosas contidas numa coluna de plástico. O processo de purificação utilizando colunas é semelhante ao processo de purificação com partículas magnéticas (Fig. 32). A amostra já tratada com tampões e enzimas de lise celular é aplicada à coluna de membrana de sílica. São adicionados os tampões de ligação, o que faz com que os ácidos nucleicos presentes na amostra adsorvam à sílica na membrana devido a interações hidrofóbicas, electrostáticas e pontes de hidrogénio. Após a ligação dos ácidos nucleicos à sílica, a coluna é lavada para remover os contaminantes como, proteínas, lípidos e organelas celulares. Os ácidos nucleicos isolados são então eluídos da coluna, através da utilização de um tampão com baixa concentração salina, que faz com que os ácidos nucleicos se desliguem da sílica (Li *et al.*, 2021).

Existem várias formas e protocolos para a purificação de ácidos nucleicos com colunas de sílica, tanto manuais como automatizados. Os procedimentos manuais requerem mais tempo, por outro lado, os sistemas automatizados, permitem um maior rendimento e reprodutibilidade, poupando tempo e esforço. Estes sistemas são normalmente utilizados em laboratórios de elevada procura, tais como instalações de sequenciação de DNA e laboratórios de diagnóstico clínico. No LBM, para realizar o processo de purificação de DNA, é utilizado o equipamento QIAcube Connect (QIAGEN).

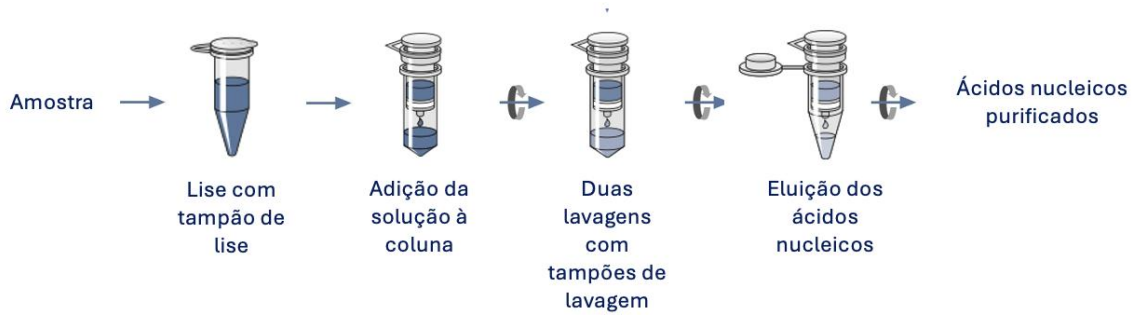


Figura 32. Procedimento da técnica de extração e purificação de ácidos nucleicos com utilização de colunas de sílica (adaptado de Qiagen, 2014).

- **QIAcube Connect**

O QIAcube Connect, da marca comercial QIAGEN, é um avançado sistema de automação projetado para simplificar e otimizar o processo de purificação de ácidos nucleicos em laboratórios de investigação e de diagnóstico (Fig. 33). Este equipamento realiza a técnica de purificação de ácidos nucleicos com a utilização de colunas constituídas por uma membrana de sílica. O QIAcube Connect possui uma centrífuga, um agitador aquecido, suporte para reagentes e um braço robótico com uma pinça robótica, um sistema de pipetagem, um sensor ótico, um sensor ultrassônico e uma luz ultravioleta (UV).

Tanto a centrífuga como o agitador aquecido têm a capacidade de 12 amostras. O suporte para 6 reagentes, usados no processo de extração, inclui o tampão AL, o tampão AE, o tampão ATL, os tampões de lavagem AW1 e AW2 e Etanol 100%. O braço robótico realiza o procedimento de purificação, identificando as amostras, os reagentes, as pontas de pipetas, os rotores e as colunas através do sensor ótico. Com o sensor ultrassônico, consegue detetar se os reagentes e as amostras contêm os volumes necessários para o procedimento. Após cada procedimento, a luz UV é acionada para descontaminar o espaço de trabalho.

No LBM, o equipamento QIAcube Connect é utilizado para a purificação de DNA de bactérias, de parasitas e fungos, a partir de amostras como fezes, *buffy* do sangue, amostras respiratórias e LCR.



Figura 33. Equipamento automatizado de extração de ácidos nucleicos com utilização de colunas de sílica, QIAcube Connect (Qiagen)

5. Amplificação de DNA

5.1. PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase, mais conhecida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é uma técnica da biologia molecular que revolucionou a forma como se estudam os ácidos nucleicos. Desenvolvida na década de 1980 pelo químico americano Kary Mullis, a PCR tornou possível a rápida amplificação de fragmentos específicos de DNA, mesmo partindo de quantidades iniciais diminutas. A PCR desempenhou um papel crucial em inúmeras aplicações, desde a investigação básica até a medicina forense, a genética e a biotecnologia (Ali *et al.*, 2018).

A PCR é uma reação enzimática que amplifica o DNA, *in vitro*, usando um DNA "template" como molde, e duas pequenas sequências de DNA em cadeia simples, os *primers*, complementares às sequências que flanqueiam o fragmento a amplificar. A amplificação é catalisada pela enzima Taq polimerase, em presença do tampão de reação, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e, como cofator, o íon Magnésio (Ali *et al.*, 2018).

5.1.1. Princípios e processo da técnica PCR

A reação de PCR, normalmente, está dividida em três fases: a desnaturação, a *hibridação* dos *primers* (*annealing*) e a extensão, embora seja comum, em ensaios de diagnóstico, o ciclo de duas fases, uma de desnaturação e uma combinação entre a fase de *annealing* e a fase de extensão (Fig. 34). Quando a temperatura de *annealing* é suficientemente próxima da temperatura da fase de extensão, estas podem ser combinadas numa única fase (Hawkins & Guest, 2017).

Na primeira fase devido a temperaturas elevadas (94°C – 96°C), o DNA desnatura-se em duas cadeias simples, através da quebra de ligações de hidrogénio entre as bases azotadas. Na fase de *annealing*, a temperatura é reduzida para 50°C – 65°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência dos *primers* utilizados, permitindo a hibridação de cada *primer* com a sequência complementar, no DNA alvo. A temperatura de *melting* dos *primers* pode ser calculada utilizando a equação de Wallace:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C),$$

onde (A + T) e (G + C) é respetivamente o número de adeninas e timinas e o número de guaninas e citosinas presentes no *primer*. A temperatura de *melting* (T_m) é definida como “a temperatura em que metade das sequências alvo hibridizaram com os *primers* complementares”. A temperatura de *annealing* é próxima da temperatura de *melting*, podendo diferir desta em 2 a 4°C (Green & Sambrook, 2018).

A especificidade dos produtos de PCR é determinada pela temperatura de *annealing*. Durante esta fase, a temperatura da reação deve permitir que os *primers* se liguem apenas às regiões de complementaridade total no DNA alvo (Wada *et al.*, 2023).

Na fase de extensão da PCR, a enzima DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) polimeriza uma nova cadeia de DNA, complementar ao molde do DNA original, numa temperatura de aproximadamente 72°C. A DNA polimerase copia a cadeia molde a partir dos *primers* que hibridaram previamente com o DNA alvo, incorporando dNTPs (Green & Sambrook, 2018).

No final de cada ciclo, o número de moléculas teoricamente duplica. Portanto, após n ciclos de PCR, a sequência alvo será amplificada 2^n vezes (Fig. 34). Todas as etapas são executadas num termociclador, programável, que controla com precisão a temperatura de cada etapa, o tempo de reação a cada temperatura e o número de repetições (ciclos). De maneira ideal, após 20 ciclos de PCR, a amplificação é de um milhão de vezes e, após 30 ciclos, é de um bilhão de vezes. Na realidade, a amplificação pode não ser 100% eficiente, devido à limitação por um dos reagentes ou à presença de inibidores da DNA polimerase. Nestas situações, a amplificação total é representada pela expressão $(1 + e)^n$, onde e representa a eficiência da reação de amplificação ($0 < e < 1$) e n , o número total de ciclos (McPherson & Pincus, 2022).

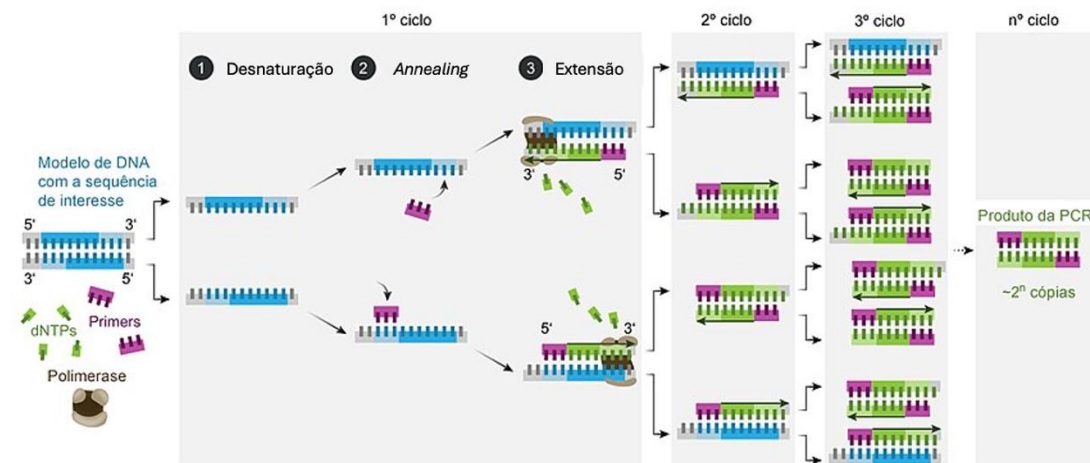


Figura 34. Representação gráfica da reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) (adaptado de https://pt.wikipedia.org/wiki/Reação_em_cadeia_da_polimerase)

5.1.2. Componentes PCR

Para realizar a reação de PCR, é necessário o DNA molde e uma mistura de reagentes denominada de *Master Mix* que contem: desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 *primers*, a DNA polimerase termorresistente (Taq polimerase), o cofator Magnésio, e o tampão de reação (Ali *et al.*, 2018).

- **dNTPs**

Os desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) são os substratos utilizados pela DNA polimerase para sintetizar a cadeia de DNA durante a replicação do mesmo. Os dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) são nucleótidos do DNA formados por uma base azotada (adenina - A, timina - T, citosina - C e guanina - G) ligada a um açúcar desoxirribose e três grupos fosfato (Wada *et al.*, 2023). Durante a síntese, a DNA polimerase catalisa a adição de dNTPs complementares à cadeia molde de DNA estabelecendo pontes de hidrogénio, seguindo as regras de emparelhamento (A com T e C com G) (Wada *et al.*, 2023).

Nas reações de PCR, as concentrações de cada dNTP devem ser iguais para garantir que haja quantidades equimolares de cada nucleótido disponíveis para a síntese de DNA e para manter a eficiência e a precisão da reação de amplificação do DNA.

- **Primers**

Os *primers* são oligonucleótidos curtos de DNA, de 15 a 30 nucleótidos, sintetizados em laboratório, desenhados para se ligarem especificamente às extremidades da sequência a amplificar (Rodríguez *et al.* 2015). É necessário um par de *primers*, constituído por um *primer forward* (oligonucleótido direto) e um *primer reverse* (oligonucleótido reverso). Cada um dos *primers* é complementar às extremidades 3' de cada uma das cadeias, a *sense* e a *antisense* (Wada *et al.*, 2023).

Durante a PCR, depois da desnaturação do DNA, a temperatura é reduzida na fase de *annealing*, permitindo que os *primers* se liguem especificamente às sequências complementares do DNA alvo, iniciando-se então a síntese de DNA. Os dois *primers* devem ter temperaturas de fusão (T_m) semelhantes, para garantir a eficiência da amplificação (Wada *et al.*, 2023).

O desenho dos *primers* requer uma análise criteriosa, com *softwares* apropriados, levando em conta o tamanho do fragmento pretendido, o conteúdo de GC que deve ser entre 30-80 %, a prevenção da formação de dímeros e a garantia de especificidade para o alvo pretendido. Adicionalmente, é crucial realizar a verificação de potenciais interações secundárias e excluir amplificações inespecíficas para garantir o sucesso da amplificação (Rodríguez *et al.* 2015).

- **DNA Polimerase**

A DNA polimerase é uma que catalisa a adição de dNTPs à extremidade 3' de uma cadeia de DNA, utilizando a outra cadeia de DNA como molde (Oscorbin & Filipenko, 2023).

A DNA polimerase utilizada na técnica de PCR é a Taq polimerase, uma enzima isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. A bactéria *Thermus aquaticus* é encontrada em ambientes extremos de temperatura, como fontes termais e, devido a esse motivo, a Taq polimerase apresenta termoestabilidade. Sendo resistente ao calor, permanece estável em temperaturas

elevadas, o que permite que a desnaturação das cadeias de DNA ocorram a 95°C sem inativar a enzima, sendo a sua máxima atividade a temperaturas acima de 70°C (Wada *et al.*, 2023).

- **Tampão**

O tampão utilizado na técnica de PCR é uma solução que fornece as condições ideais para a atividade da Taq DNA polimerase: a manutenção do pH, estabilidade da DNA polimerase, melhoramento da especificidade da amplificação e da desnaturação do DNA (Gadkar & Fillion, 2014).

- **Cloreto de magnésio (MgCl₂)**

A presença o ião Mg²⁺ é necessária para o ótimo funcionamento da Taq polimerase, uma vez que atua como cofator, facilitando a ligação do complexo *primer*-DNA alvo e dos dNTPs necessários para a síntese de DNA. Durante a reação, os iões de magnésio ligam-se ao local ativo da enzima e aumentam a sua capacidade de realizar a reação. Como resultado, a capacidade da Taq DNA polimerase para adicionar dNTPs às cadeias de DNA em crescimento é melhorada. Além disso, os iões Mg²⁺ também se ligam ao grupo fosfato PO₃⁻ e reduzem a barreira eletrostática entre as cadeias de DNA, permitindo a polimerização dos dNTPs e a ligação dos *primers* à cadeia alvo do DNA.

A concentração ideal de MgCl₂ varia, dependendo da Taq polimerase utilizada, bem como das condições específicas da reação, como a temperatura e a composição do tampão de reação. A falta ou excesso de MgCl₂ tem um impacto significativo na eficiência e na especificidade da técnica PCR. Muita concentração de Mg²⁺ facilita a formação de dímeros de *primers* ou uma amplificação inespecífica do DNA. Por outro lado, a baixa concentração de Mg²⁺ dificulta a atividade da DNA polimerase (Wada *et al.*, 2023).

5.1.3. Aplicações da PCR

A técnica PCR revolucionou os campos da investigação e da medicina ao permitir a amplificação de sequências de DNA específicas, mesmo a partir de quantidades mínimas de DNA. Na investigação, a PCR é amplamente utilizada para estudar a expressão genética, a variação genética e o diagnóstico de doenças infecciosas. Por exemplo, a PCR é o primeiro passo de um estudo de mutações em células cancerígenas ou identificação de marcadores genéticos associados a determinadas características ou doenças. A PCR desempenha um papel crucial no diagnóstico de doenças infecciosas como a COVID-19, o VIH e a hepatite, detetando a presença de DNA viral ou bacteriano em amostras de doentes. Além disso, a PCR é utilizada em medicina forense para analisar provas de DNA em investigações criminais e também testes de parentesco. A versatilidade e a sensibilidade da PCR tornam-na uma ferramenta indispensável em várias aplicações nas comunidades científica e médica (Laurén *et al.*, 2021).

5.2. PCR em tempo real

A PCR Quantitativa, também conhecida como PCR em Tempo Real ou qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), é uma variante da técnica de PCR que permite não apenas amplificar, mas também quantificar o DNA ou cDNA (DNA complementar). Esta técnica é uma ferramenta poderosa para a determinação precisa do número de cópias de uma sequência de DNA específica, com tempo de resposta rápido e elevada especificidade, o que a torna uma ferramenta essencial numa vasta gama de aplicações como a investigação, o diagnóstico, o controlo de qualidade e em muitas outras aplicações biológicas e clínicas (Yao *et al.*, 2022).

A PCR quantitativa baseia-se no mesmo princípio da técnica PCR convencional, envolvendo a amplificação de uma sequência de DNA específica. A diferença fundamental é que a qPCR emite um sinal de fluorescência em cada ciclo, em tempo real, que permite medir a quantidade de DNA (ou cDNA) amplificado a cada ciclo. Isso é conseguido pelo uso de sondas de fluorescência ou corantes fluorescentes que se ligam especificamente ao DNA em síntese, à medida que a reação de PCR progride (Konovalova *et al.*, 2022)

Uma das principais vantagens da qPCR é a capacidade de monitorizar a amplificação do DNA em tempo real, permitindo a análise quantitativa do DNA alvo a partir de uma fonte de DNA. Esta monitorização em tempo real elimina a necessidade de processamento pós-PCR, como a eletroforese em gel, reduzindo o tempo e o risco de contaminação. A qPCR é mais precisa e também mais sensível e pode detetar níveis baixos do DNA alvo, em comparação com a PCR convencional. A sua maior sensibilidade torna-a particularmente útil na deteção de doenças infecciosas ou na monitorização dos níveis de expressão génica.

- **PCR “touchdown”**

A PCR touchdown é uma estratégia utilizada para melhorar a especificidade e a eficiência da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nesta técnica, a temperatura de *annealing* é reduzida gradualmente em cada ciclo, começando a uma temperatura superior, 5 – 10 °C, à temperatura de fusão dos *primers* e diminuindo até atingir a temperatura de fusão ideal para os *primers* específicos (Korbie & Mattick, 2008).

A principal vantagem da PCR touchdown é a redução da formação de produtos inespecíficos. Ao iniciar a PCR com uma temperatura de *annealing* mais alta, apenas *primers* com especificidade total conseguem ligar-se ao DNA alvo. Conforme a temperatura de *annealing* é reduzida em cada ciclo subsequente, *primers* menos específicos podem se ligar, permitindo a amplificação de sequências mais divergentes, mas apenas após a amplificação das sequências mais específicas (Korbie & Mattick, 2008).

Essa abordagem progressiva promove a amplificação seletiva de regiões específicas, reduzindo a formação de produtos inespecíficos e melhorando a eficiência global da PCR. A estratégia de PCR touchdown é amplamente utilizada em estudos nos quais a especificidade da amplificação é

crucial, como em testes de diagnóstico e na análise de amostras complexas (Green & Sambrook 2018).

Este tipo de técnica é utilizado no LBM para detetar alguns microorganismos como as bactérias *Clostridium difficile*, *Leptospira spp*, *Kingella kingae* e *Actinomyces spp*, os fungos *Candida albicans* e *Sporothrix schenckii* e o vírus HHV8.

5.2.1. Tecnologias de deteção

Para detetar o produto da reação de PCR em tempo real são utilizados dois tipos de sistemas: não específicos e específicos. Os não específicos utilizam um corante fluorescente que se intercala nas moléculas de DNA de cadeia dupla e emite uma fluorescência quando excitado. Este sistema é relativamente barato e versátil, no entanto não é tão específico sendo suscetível a falsos positivos. Os sistemas de deteção específicos baseiam-se em sondas de transferência de energia por ressonância fluorescente que reconhecem especificamente a sequência alvo, o que os torna os sistemas de eleição para os ensaios de deteção molecular aqui descritos. Estes sistemas específicos são mais dispendiosos do que os não específicos e exigem utilização de sondas sofisticadas. Atualmente, são utilizados dois tipos de sondas, incluindo: hidrólise e hibridização (Castillo *et al.*, 2011).

A emissão da fluorescência pela ligação das sondas ou dos corantes ao DNA é detetada pelo termociclador (Fig. 35). O termociclador é um equipamento constituído por um bloco de aquecimento e arrefecimento, sendo este módulo responsável pelo controlo preciso da temperatura durante cada passo da qPCR (desnaturação, *annealing* e extensão); LEDs de excitação para os diferentes canais e sensores óticos, que emitem luz no comprimento de onda certo para excitar a sonda fluorescente ou o SYBR Green, e detetar a sua fluorescência em tempo real e, por último, o software de programação que controla os parâmetros do ciclo térmico, a recolha de dados e a respetiva análise (Navarro *et al.*, 2015).



Figura 35. Termociclador Rotor-Gene Q da marca QIAGEN

5.2.1.1. Corante intercalante

Os corantes intercalantes intercalam-se entre as bases azotas do DNA de cadeia dupla e emitem fluorescência quando excitados no comprimento de luz adequado. Existem diversos tipos de corantes intercalantes, como o EvaGreen, o SYTO, o BEBO, o BOXTO e o SYBR Green, sendo este último o mais utilizado (Navarro *et al.*, 2015).

- **SYBR Green**

O SYBR Green é um dos corantes intercalantes mais utilizados na PCR em tempo real, principalmente devido à sua relação custo-benefício e versatilidade.

O SYBR Green possui duas cargas positivas em condições normais de reação de PCR, o que contribui para a sua elevada afinidade de ligação à cadeia dupla de DNA, uma vez que têm cargas opostas. Este corante liga-se ao sulco menor da cadeia dupla de DNA e emite fluorescência quando ligado, o que permite a monitorização em tempo real das reações de amplificação. Se, durante a reação de PCR se formarem produtos inespecíficos e dímeros de *primers* o SYBR Green irá ligar-se também a esses produtos e emitir fluorescência. Para evitar erros de quantificação na qPCR, é necessário verificar a possível existência desses produtos inespecíficos, procedendo-se à análise da curva da T_m (Navarro *et al.*, 2015).

O SYBR Green é utilizado principalmente na deteção de agentes patogénicos, expressão génica, deteção de mutações e deteção de organismos geneticamente modificados. No entanto, este apresenta algumas limitações como instabilidade limitada, reduzida especificidade e inibição da reação PCR (Navarro *et al.*, 2015).

5.2.1.2. Sondas de hidrólise

As sondas de hidrólise e de hibridização, utilizadas no qPCR, diferem nos mecanismos base e métodos de deteção. As sondas de hidrólise, desenhadas para cada sequência em análise, só hibridizam se encontrarem a sequência específica em estudo e, o seu funcionamento tem como base a atividade exonucleásica da Taq DNA polimerase. Durante a amplificação, a Taq polimerase cliva a sonda, hibridada no momento do *annealing*, emitindo fluorescência resultante da degradação da mesma.

- **Sondas TaqMan**

As sondas de hidrólise TaqMan são oligonucleótidos em cadeia simples com tamanho de 17 a 35 nucleótidos, projetados para se ligarem especificamente ao DNA alvo, em análise, durante a reação de PCR em tempo real. Estas são marcadas com um fluoróforo repórter na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3', que devem estar separados por 7 a 15 nucleótidos. Quando a sonda está intacta e é excitada por uma fonte de luz, o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo repórter devido à sua proximidade física. Este processo é conhecido como

transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). Durante a fase de *annealing* da reação de PCR em tempo real, a sonda liga-se à sequência alvo, se esta estiver presente, entre o *primer forward* e o *primer reverse*, pelo princípio da complementaridade. Posteriormente, na fase de extensão, a sonda será clivada pela atividade exonucleolítica da DNA polimerase. Este processo leva à separação do fluoróforo repórter do *quencher* permitindo a emissão de fluorescência (Fig. 36). O sinal de fluorescência emitido é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra, o que permite uma quantificação precisa do DNA alvo (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016).

As sondas TaqMan são altamente específicas, proporcionam uma detecção com elevada sensibilidade, permitem a quantificação absoluta da quantidade de DNA alvo presente na amostra e reduzem os resultados falsos positivos.



Figura 36. Estrutura e mecanismo de ação das sondas TaqMan (adaptado de Navarro *et al.*, 2015).

- **Sondas MGB**

Tal como as sondas TaqMan, as sondas MGB (*Minor Groove Binder*) são um tipo especializado de sondas de hidrólise utilizadas em técnicas como PCR em tempo real, para a detecção e quantificação de sequências específicas de DNA (Navarro *et al.*, 2015).

As sondas MGB têm uma estrutura e atividade muito semelhante às sondas TaqMan. Assim como as sondas de hidrólise, as sondas MGB são marcadas por um *quencher* na extremidade 3' e um fluoróforo repórter na extremidade 5' (Fig. 37). A única diferença das sondas de hidrólise mencionadas é a utilização de um ligando MGB (Navarro *et al.*, 2015).

Os ligandos MGB são tripeptídeos que formam uma ligação não covalente com o sulco menor da cadeia dupla de DNA. Estes ligam-se seletivamente a sequências ricas em AT, favorecendo a inclusão de anéis aromáticos por interações de Van der Waals e electrostáticas. Esta interação produz uma distorção mínima na “espinha dorsal” das ligações fosfodiéster, mas estabiliza ainda mais a estrutura do DNA (Navarro *et al.*, 2015).

A interação entre a sonda MGB e o DNA alvo aumenta a estabilidade do complexo sonda-DNA, o que resulta numa maior especificidade e sensibilidade na detecção do DNA alvo de interesse e aumenta também a T_m da sonda, o que permite o uso de sondas mais curtas (Navarro *et al.*, 2015).

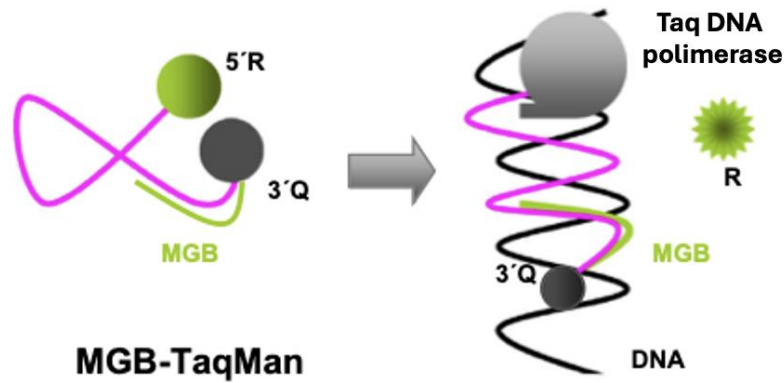


Figura 37. Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hidrólise MGB-TaqMan (adaptado de Navarro et al., 2015).

5.2.1.3. Sondas de hibridação

As sondas de hibridização e de hidrólise são diferentes nos mecanismos de detecção e de utilização, sendo a principal diferença o facto de as sondas de hibridação não serem degradadas durante a reação de amplificação.

- **Sondas FRET**

As sondas FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) correspondem a um par de oligonucleótidos que detetam o DNA alvo através da medição da transferência de energia entre um par de fluoróforos (Navarro et al., 2015).

A primeira sonda FRET é constituída por um fluoróforo dador na extremidade 3' e a segunda sonda possui um fluoróforo aceitador na extremidade 5' e um grupo fosfato na extremidade 3'. As sequências das duas sondas é desenhada de forma que estas hibridem em locais adjacentes no DNA alvo aquando do *annealing*. Na fase de *annealing*, as sondas hibridam com o DNA alvo e o fluoróforo dador da primeira sonda, que tem o comprimento de onda de excitação mais curto, é excitado. Após excitação, o fluoróforo dador transfere toda a sua energia de emissão para o aceitador que, por sua vez, é excitado e emite fluorescência, num comprimento de onda superior ao do repórter. Essa transferência da energia entre os fluoróforos depende fortemente da distância e do alinhamento entre eles (Fig. 38) (Mohamed et al., 2018).

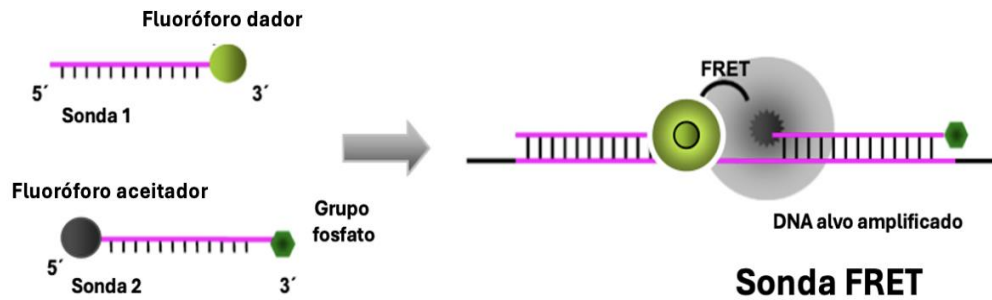


Figura 38. Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hibridização FRET (adaptado de Navarro et al., 2015).

- **Sondas Molecular Beacons**

As sondas *Molecular Beacons* são um tipo de oligonucleótidos de cadeia simples no formato de um gancho de cabelo, duplamente marcadas com um grupo repórter fluorescente na extremidade 5' e um grupo supressor de fluorescência (*quencher*) na extremidade 3'.

As sondas *Molecular Beacons* são constituídas por uma sequência *loop*, uma sequência complementar entre si e as moléculas sinalizadoras (repórter e *quencher*) (Fig. 39). A sequência *loop* da sonda contém a sequência complementar do DNA alvo, que deve conter entre 15 e 30 nucleótidos não complementares entre si. O aumento do tamanho da sequência *loop* leva a uma maior afinidade, mas também resulta numa menor especificidade. Depois de selecionar a sequência específica da sonda, são adicionadas duas sequências complementares a cada lado da sequência da sonda para servir de sequência de haste que liga a sequência *loop* às moléculas sinalizadoras. A sequência de haste contém entre 5 e 7 pb e deve ter uma T_m superior entre 7 e 10°C à temperatura de detecção (Zheng et al., 2015). As moléculas sinalizadoras são constituídas por dois elementos: um fluoróforo repórter e um supressor *quencher*. Os fluoróforos mais utilizados são o ácido 5-(20-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfônico (EDNAS), a fluoresceína (FAM), a tetracloro-6-carboxifluoresceína (TET), a hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX), a tetrametilrodamina (TAMRA), 4,5-dicloro-dimetoxi-fluoresceína (JOE) e a 5-carboxirrodamina-X (ROX) (Han et al., 2013). É fundamental selecionar adequadamente um *quencher* para capturar a fluorescência do repórter enquanto a sonda não hibridiza, para não gerar sinal de fundo (ruído). Existem diferentes tipos de supressores como as nanopartículas de ouro, os nanotubos de carbono, o óxido de grafeno e o Dabcyl (ácido 4-(40-dimetilaminofenilazo) benzoico), sendo este último o mais utilizado (Zheng et al., 2015).

Durante a fase de *annealing*, a sonda altera a sua conformação de gancho de cabelo para uma conformação linear para conseguir hibridar com o DNA alvo. Quando a hibridação acontece, o repórter e o *quencher* são separados, o que gera um sinal fluorescente pelo fluoróforo repórter que pode ser medido quantitativamente pelos termocicladores de qPCR (Zheng et al., 2015).

Como já referido, este tipo de sondas não são degradadas durante a reação de qPCR, pelo que podem ser utilizadas mais do que uma vez na reação de PCR e também se pode acompanhar as T_m da reação.

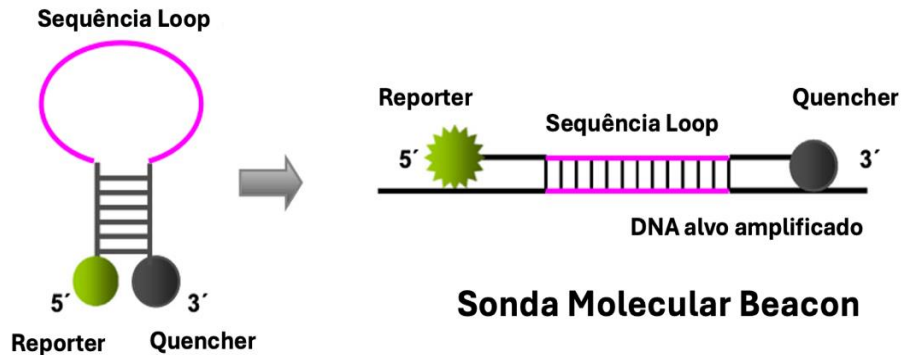


Figura 39. Estrutura e mecanismo de ação das sondas de hibridização Molecular Beacons (adaptado de Navarro et al., 2015).

Ao escolher entre sondas e corantes para PCR em tempo real, é importante avaliar vários fatores. As sondas são altamente específicas, detetando apenas sequências-alvo e oferecem maior sensibilidade do que os corantes intercalantes, graças à detecção por interação fluoróforo-*quencher*. Por outro lado, os corantes intercalantes, como o SYBR Green, são fáceis de usar e mais versáteis, enquanto cada sonda só pode ser utilizada para uma sequência específica. O SYBRGreen é económico e ideal para quantificar produtos de PCR, no entanto, apresenta ainda uma grande desvantagem, como as ligações não específicas e os dímeros de *primers*, tornando-se obrigatório traçar uma curva de *melting* no final de cada reação qPCR.

Na PCR em tempo real, o uso de sondas e corantes apresentam desvantagens. Uma delas é o risco de ligações não específicas ou sinais de fundo, que podem levar a falsos positivos. Isso é especialmente problemático ao detetar alvos com baixa concentração ou ao trabalhar com amostras complexas com várias sequências de ácidos nucleicos. Além disso, algumas sondas e corantes podem ter especificidade e sensibilidade limitadas, sendo necessário otimizar as condições da reação para minimizar esses problemas. Apesar dos desafios já referidos, os esforços de pesquisa estão focados na criação de sondas e novos corantes melhorados.

5.3. Variações da qPCR

A técnica de PCR pode ter diferentes objetivos com as devidas adaptações, como a PCR do produto da Transcrição Reversa (RT-PCR), *Nested* PCR ou PCR múltiplo (Multiplex PCR).

5.3.1. RT-PCR

RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) permite a amplificação de um cDNA (DNA complementar), resultante da transcrição reversa numa sequência de RNA (Green & Sambrook, 2018).

As polimerases utilizadas nas reações de PCR requerem DNA como substrato, sendo necessário passar o RNA para DNA. Este processo começa com a transcrição reversa do RNA, utilizando a transcriptase reversa, para cDNA. A transcriptase reversa necessita de um *primer* complementar ao RNA para iniciar a síntese do cDNA. Esse *primer* pode ser oligo-dT, que se liga à região de poliadenilação do mRNA (RNA mensageiro eucariótico), ou um *primer* específico da sequência alvo. O cDNA resultante é então utilizado como molde para a amplificação por PCR, tornando possível o estudo dos níveis de expressão génica e a deteção de vírus de RNA (Green & Sambrook, 2018).

A RT-PCR tem sido amplamente utilizada em vários domínios, incluindo o diagnóstico médico, a ciência forense e outros. A RT-PCR é uma ferramenta poderosa para a análise de amostras de RNA com elevada sensibilidade e especificidade, combinando a transcrição reversa e a PCR numa única reação (Green & Sambrook, 2018).

5.3.2. Nested PCR

A técnica *Nested PCR*, tal como o nome indica, é uma variação da PCR convencional que oferece maior sensibilidade e especificidade (Nazir *et al.*, 2019).

Esta envolve duas etapas de amplificação de DNA: na primeira, são utilizados *primers* externos para amplificar a região de interesse. Depois, acontece uma segunda amplificação, na qual é usado um segundo conjunto de *primers* internos que se ligam aos produtos amplificados da primeira reação (Green & Sambrook, 2019).

Como são efetuadas duas amplificações repetidas, esta técnica permite obter uma maior sensibilidade, redução de amplificação de produtos não específicos e minimização da contaminação cruzada (Green & Sambrook, 2019).

Esta variante é especialmente útil quando se trabalha com amostras que contêm baixas concentrações do DNA alvo ou quando se lida com sequências estreitamente relacionadas que podem levar a uma amplificação não específica.

5.3.3. Multiplex PCR

A PCR *Multiplex* representa uma ferramenta poderosa na biologia molecular, permitindo a amplificação simultânea de múltiplos alvos genéticos, numa única reação. Para obter a detecção de múltiplos alvos, esta técnica utiliza diferentes pares de *primers*, um par para cada alvo de DNA. Para além do uso de diferentes pares de *primers*, esta técnica, requer o uso de sondas marcadas com diferentes corantes fluorescentes, para se conseguir diferenciar o resultado de cada alvo. Ao permitir a amplificação de vários alvos numa única reação, a PCR *Multiplex* economiza tempo e reagentes em comparação com a realização de várias reações de PCR separadas (Hawkins & Guest, 2017).

No entanto, esta técnica ainda possui alguns desafios que necessitam ser ultrapassados. Como se pretende amplificar dois ou mais alvos na mesma reação, estes competem pelos mesmos reagentes da reação e com isso podem conseguir inibir-se uns aos outros. O facto de ter mais do que um par de *primers* na reação aumenta o risco de obtenção de produtos inespecíficos devido à formação de dímeros de *primers* (Hawkins & Guest, 2017).

O objetivo da PCR *Multiplex* é detetar com precisão cada alvo pretendido, sem interferências como competição ou inibição entre os diferentes alvos. Para otimizar a reação PCR *Multiplex* deve-se ter em consideração diversos fatores: os diferentes *primers* utilizados na reação não devem conter complementaridade a outros *primers* presentes na reação, para evitar a formação de dímeros de *primers* e a T_m deve ser aproximadamente a mesma para todos os *primers* da reação, para obter a mesma eficiência em cada amplificação (Hawkins & Guest, 2017).

5.4. Análise dos resultados

A análise rigorosa dos resultados de PCR em tempo real é fundamental para interpretar corretamente os dados e extrair informações relevantes sobre a quantidade e presença dos alvos de interesse na amostra. Esta análise pode ser obtida através das curvas de amplificação, das curvas de *melting* e das curvas padrão.

5.4.1. Curvas de amplificação

Os softwares de análise de dados de PCR em tempo real recolhem, os aumentos de fluorescência ao longo dos ciclos, resultando na curva de amplificação típica, representada na Fig. 40. As curvas de amplificação podem ser divididas em duas fases, nomeadamente a fase exponencial e a fase de *plateau* ou estacionária.

A fase do crescimento exponencial é caracterizada por uma duplicação da quantidade do DNA alvo em cada ciclo de reação de qPCR, em que o sinal de fluorescência aumenta proporcionalmente à quantidade de DNA amplificado. O sinal de fluorescência gerado durante esta fase pode ser determinado através da análise do valor do limiar do ciclo (*Ct*, *Cycle threshold*), que corresponde ao ponto em que o DNA alvo atinge um nível detectável, acima do ruído de fundo. Esta informação é essencial para quantificar a quantidade de DNA alvo presente na amostra e pode ser utilizada para calcular o número inicial de cópias do modelo de DNA. Quanto menor for o valor de *Ct* maior será a quantidade inicial de DNA alvo (Smith & Osborn, 2009).

A fase estacionária, por outro lado, ocorre quando a reação atinge um patamar e o sinal de fluorescência não aumenta linearmente com cada ciclo, por limitação de um dos componentes da reação. Esta fase indica que a reação de PCR está a aproximar-se da saturação e a amplificação adicional pode não refletir com precisão a concentração inicial do modelo. A compreensão destas duas fases é necessária para interpretar os dados de qPCR e garantir a validade dos resultados obtidos.

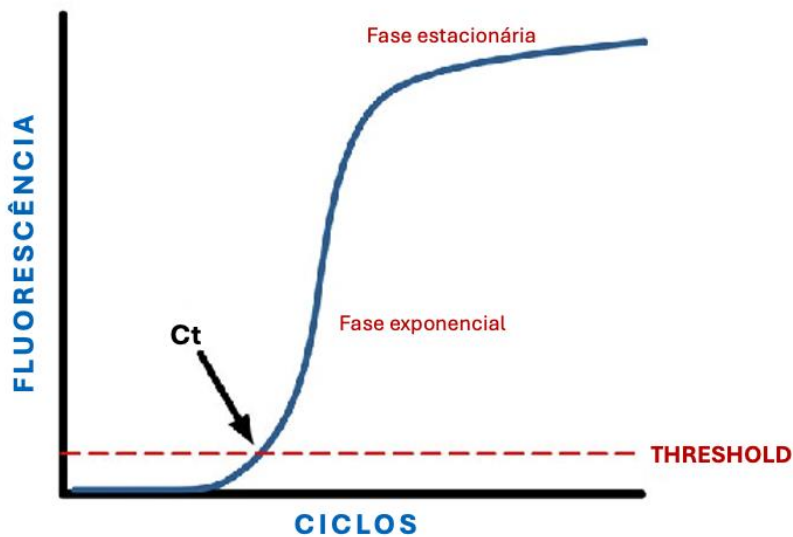


Figura 40. Gráfico da curva de amplificação de uma reação de PCR em tempo real (adaptado de Santos et al., 2023).
Ct – Cycle threshold.

5.4.2. Curvas de *melting*

As curvas de *melting* em tempo real, também conhecidas como curvas de dissociação, são utilizadas na técnica de PCR em tempo real para determinar a temperatura na qual os produtos amplificados começam a se dissociar em cadeias simples de DNA (Fig. 41 A). Essas curvas são geradas medindo a fluorescência do corante ou dos fluoróforos após cada ciclo de amplificação, enquanto a temperatura é aumentada lentamente. Quando os produtos amplificados começam a se desassociar, a fluorescência diminui.

As curvas de *melting* são úteis para a análise pós-PCR, permitindo a identificação de diferentes sequências de DNA com base nas suas temperaturas de dissociação. Geralmente, cada produto de PCR de DNA tem uma temperatura de dissociação característica, que pode ser usada para distinguir entre diferentes produtos amplificados na mesma reação (Fig. 41 B).

O gráfico da curva de *melting* é representado por picos e vales que correspondem às transições de fase (DNA cadeia dupla e DNA cadeia simples) (Fig. 41 B).

As principais vantagens das curvas de *melting* são a identificação de produtos não específicos, uma vez que cada produto tem a sua própria T_m , análise de PCR Multiplex e redução da necessidade de eletroforese em gel.

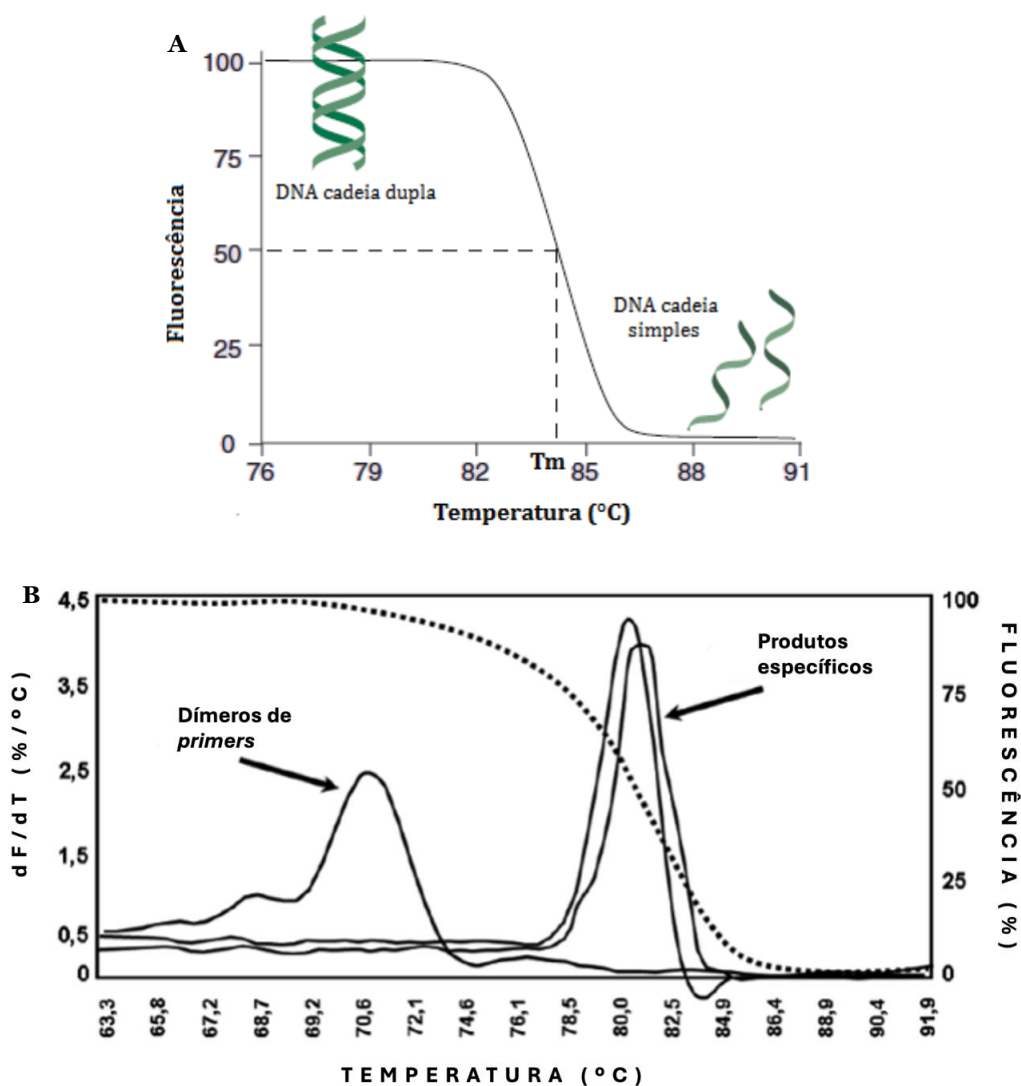


Figura 41. Representação gráfica da curva de *melting* de um ensaio de PCR em tempo real (A) (Tavares, 2012). Gráfico da primeira derivada da curva de *melting* (B) (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011).

dF/dT – derivada da curva de *melting* em relação à temperatura; T_m – temperatura de *melting*.

5.4.3. Quantificação dos resultados

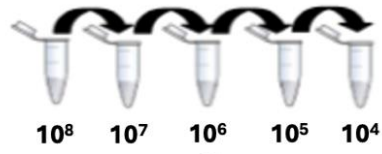
A quantificação das sequências de DNA ou cDNA alvo, de uma concentração desconhecida é determinada a partir dos valores Ct, e pode ser descrita em termos relativos ou absolutos.

A quantificação relativa baseia-se em comparar a expressão do DNA alvo com um DNA padrão, sendo o método da comparação do limiar ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e o mais utilizado. Para este método, é calculada a diferença entre os valores Ct do gene alvo e do gene de referência, o qual geralmente é um gene *housekeeping*. Isso resulta no valor ΔCt , que representa a diferença na expressão do gene alvo em relação ao gene de referência para cada amostra. Quanto menor o valor de Ct, maior é a quantidade de DNA alvo, pois atinge-se o limiar com um menor número de ciclos (Ruiz-Villalba *et al.*, 2021).

Se existirem diferentes grupos experimentais, por exemplo, tratamento vs. controle, o ΔCt do grupo de controle é subtraído do ΔCt do grupo de tratamento. Isso resulta no valor $\Delta\Delta Ct$, que reflete a diferença na expressão do gene alvo em relação ao grupo de controle entre as condições experimentais, e pode ser calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para que o cálculo da fórmula seja válido, tanto a eficiência da amplificação do DNA alvo como a do DNA de referência devem ser aproximadamente iguais (Ruiz-Villalba *et al.*, 2021).

Em contraste com a quantificação relativa, que compara a expressão gênica entre diferentes condições, a quantificação absoluta fornece um valor numérico absoluto da quantidade de material genético presente nas amostras. Nesta técnica, determina-se o número exato de cópias do DNA alvo. Isso é feito a partir de uma curva padrão, gerada após diversas amplificações do gene alvo presente numa gama de concentrações iniciais do modelo, sendo depois determinados os valores Ct para cada concentração do modelo. Subsequentemente, é traçada uma regressão linear simples destes valores Ct em relação ao logaritmo do número de cópias inicial (Fig. 42). O sinal de fluorescência das amostras desconhecidas é então comparado à curva-padrão para determinar a quantidade absoluta de material genético presente em cada amostra (Smith & Osborn, 2009).

Séries de diluições do gene alvo



↓ Construção da curva-padrão

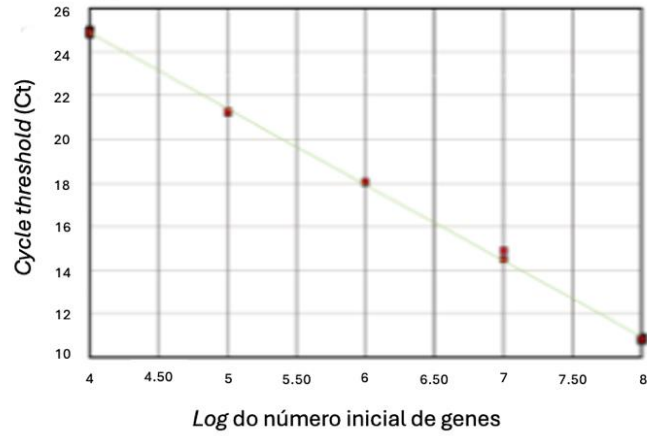


Figura 42. Gráfico da curva-padrão determinada após sucessivas diluições de amostras com concentrações de DNA alvo conhecidas (adaptado de Smith & Osborn, 2009).

6. Controle de Qualidade

O controle de qualidade das análises efetuadas pode ser interno, realizado pelos próprios técnicos do laboratório, ou externo, adquirido a um grupo ou entidade externa ao laboratório, denominado por avaliação externa da qualidade (AEQ).

O controle da qualidade define-se como o conjunto de atividades planeadas e sistemáticas destinadas a garantir que os requisitos de qualidade serão cumpridos. Estas podem corresponder à limpeza adequada do laboratório, calibração de equipamentos, prazo de validade de reagentes, formação adequada dos técnicos do laboratório, entre outras (Castillo *et al.*, 2011).

Para garantir a exatidão e a fiabilidade das técnicas de manuseamento de amostras biológicas, a extração de ácidos nucleicos e os processos de amplificação de ácidos nucleicos, como a PCR em tempo real, o controle da qualidade é da maior importância. Dado o papel crucial que estas técnicas desempenham no diagnóstico de diversas doenças e na monitorização da eficácia dos tratamentos, é essencial implementar medidas rigorosas de controle da qualidade para minimizar os erros e garantir a validade dos resultados dos testes (Castillo *et al.*, 2011).

As técnicas de amostragem biológica são cruciais para garantir a exatidão e a fiabilidade dos testes laboratoriais. Para que se obtenha um teste válido, é essencial um manuseamento adequado da amostra, desde a sua recolha até ao seu processamento. Técnicas como a centrifugação, a pipetagem e o armazenamento desempenham um papel significativo na integridade das amostras biológicas. A centrifugação é frequentemente utilizada para separar os componentes de uma amostra com base na sua densidade, ao passo que uma pipetagem cuidadosa ajuda a evitar a contaminação e assegura a precisão das medições. Além disso, as condições de armazenamento corretas, como o controle da temperatura e da humidade, são fundamentais para preservar as amostras e evitar a degradação dos ácidos nucleicos. Os técnicos de laboratório podem minimizar os erros e melhorar a qualidade dos resultados seguindo os protocolos estabelecidos para o manuseamento de amostras (Castillo *et al.*, 2011).

Na técnica de PCR em tempo real, é adicionado um controle interno a cada amostra da reação de PCR, que permite monitorizar a eficiência da amplificação e detetar possíveis inibidores ou falhas técnicas. Os resultados dos controlos internos são interpretados em conjunto com os resultados das amostras de interesse, apenas num canal de leitura diferente. Se os controlos internos amplificarem o resultado da reação é considerado válido. Por outro lado, se os controlos internos não amplificarem, terá que se repetir a análise para essas amostras. Se o controle interno não amplificar e a amostra também não, terá de se repetir a técnica para essa amostra, contudo se o controle interno não amplifica, mas a amostra amplifica pode se considerar o resultado válido, pois houve inibição do controle interno e um dos motivos pode ter sido a competição dos reagentes da reação (Castillo *et al.*, 2011).

Para além do controlo de qualidade interno, também existe o controlo de qualidade externo. O principal objetivo da AEQ é garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados dos testes laboratoriais. Como já mencionado, isto é essencial para garantir a segurança dos pacientes, a qualidade dos diagnósticos e a integridade dos dados de pesquisa (Castillo *et al.*, 2011).

Nos programas da AEQ, o laboratório recebe amostras de controlo de qualidade de uma entidade externa e processa as amostras no laboratório, juntamente com as outras amostras da rotina diária. O laboratório analisa então essas amostras da mesma maneira que faria com as amostras reais e envia os resultados de volta à entidade externa, para comparação (Castillo *et al.*, 2011).

Os resultados do laboratório são então comparados com os resultados obtidos pela entidade externa e a entidade envia o *feedback* sobre a concordância ou discordância dos resultados. Qualquer discrepância nos resultados pode indicar problemas com o desempenho do laboratório e requer investigação adicional ou repetição da análise (Castillo *et al.*, 2011).

O LBM é regulamentado pelo programa UK NEQAS, o INSTAND e o Programa Nacional de AEQ do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

7. Conclusão

Durante o presente estágio, pude aprender os procedimentos da rotina do LBM, adquirindo um entendimento prático e aprofundado das atividades relacionadas com a recepção e processamento de amostras, preparação de reagentes, programação de equipamentos para extração e amplificação de ácidos nucleicos, preparação das amostras para amplificação, e validação dos resultados, tendo realizado a rotina de um Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica.

Foi uma oportunidade extremamente valiosa, que me permitiu consolidar e expandir o meu conhecimento teórico, adquirido ao longo dos últimos 5 anos, além de desenvolver habilidades práticas essenciais no contexto da biopatologia molecular. A integração no ambiente hospitalar reforçou a importância crucial da precisão, rigor e atenção aos detalhes em cada etapa dos processos laboratoriais, ressaltando a responsabilidade inerente a esse trabalho no suporte ao diagnóstico e cuidado do paciente.

No entanto, é importante destacar que não estive imune a desafios ao longo deste percurso. A complexidade dos procedimentos em biopatologia molecular apresentou um grande desafio inicial, exigindo dedicação e persistência para superar barreiras. Além disso, a gestão do tempo e a priorização de tarefas, a necessidade de autonomia e responsabilidade na execução dos processos, assim como a interpretação de resultados inesperados, foram áreas que demandaram atenção e esforço adicionais. A adaptação ao ambiente profissional, compreendendo formas de comunicação eficazes, a hierarquia e as expectativas operacionais, também representaram desafios significativos.

Estas dificuldades, foram essenciais para o meu crescimento e desenvolvimento profissional. Com a orientação e o apoio recebidos por parte da equipa de profissionais do CHUSJ, fui capaz de superar os obstáculos, transformando-os em oportunidades para aprender e fortalecer as minhas habilidades práticas e interpessoais.

Este estágio consolidou a minha convicção de que a biopatologia molecular desempenha um papel vital na prática clínica, fornecendo dados para diagnósticos precisos que impactam diretamente na saúde e no bem-estar dos pacientes. As competências adquiridas durante o estágio curricular, certamente abrirão portas para futuras colaborações e iniciativas de pesquisa, bem como para uma atuação mais eficaz e informada no âmbito da saúde.

Em resumo, as dificuldades encontradas ao longo do estágio curricular, embora desafiadoras, contribuirão para uma aprendizagem significativa e para o desenvolvimento das competências necessárias para superar os aspetos complexos e dinâmicos da biopatologia molecular, reforçando a importância do contínuo investimento em formação e pesquisa nessa área.

Capítulo 2: Projeto de Investigação

1. Introdução

No rescaldo da pandemia da COVID-19, em maio de 2022, foram confirmados alguns casos de varíola dos macacos (Monkeypox) em países não endêmicos, por todo o mundo, suscitando receio acrescido de uma nova epidemia. As primeiras manifestações clínicas da Monkeypox (Mpox) são dominadas por sinais e sintomas não específicos, incluindo mialgias e adenopatias, evoluindo para lesões cutâneas variáveis. Estas, são inicialmente maculopapulares, características da doença Mpox, e evoluem para vesículas e pústulas antes da formação de crostas. O diagnóstico diferencial pode ser difícil tendo em conta que outras patologias cursam com lesões cutâneas semelhantes, como aquelas causadas pelo molusco contagioso, o *Treponema pallidum*, vírus da varicela zoster, sarampo, *Rickettsia spp.* e a sarna. Embora, na maioria dos casos, se trate de uma doença autolimitada e sem consequências sérias, o diagnóstico definitivo é particularmente importante nos grupos de risco onde se incluem os indivíduos imunodeprimidos, que podem ser vítimas de quadros graves e mortais. No surto recente de Mpox, a transmissão foi predominante por contacto sexual, em homens que fazem sexo com homens.

Uma vez que a sintomatologia é semelhante a outras doenças, e a técnica de deteção de vírus Mpox é uma técnica abrangente em que deteta todos os vírus da família *Poxviridae* decidiu-se testar as mesmas amostras para *Molluscum contagiosum* (MCV), uma vez que se trata de vírus da mesma família.

1.1. Monkeypox

Monkeypox é uma doença zoonótica causada pelo vírus Mpox, que pertence ao género *Orthopoxvirus* e à família *Poxviridae*. Os Poxvirus têm uma forma característica de tijolo (240 nm por 300 nm) e um genoma de cadeia dupla de DNA com tamanho entre 130-360 kilo pares de base (kpb). A parte central do genoma contém genes envolvidos em funções-chave, como a transcrição e montagem de novas partículas víricas, enquanto os localizados nos terminais estão envolvidos nas interações vírus-hospedeiro (Hussain *et al.*, 2022). Replicam no citoplasma das células hospedeiras ligando-se aos glicosaminoglicanos para entrar nas células (Lansiaux *et al.*, 2022).

O vírus Mpox é transmitido por contato direto através de fluídos corporais ou lesões infetadas, ou indiretamente através de objetos contaminados, como fômites (roupas de cama ou utensílios pessoais). O vírus também pode ser transmitido pelo ar, através de gotículas respiratórias, durante o contato próximo prolongado com uma pessoa infetada (Nolen *et al.*, 2016). Indivíduos infetados são infeciosos desde o dia anterior ao aparecimento dos sintomas até desaparecimento

de todas as lesões, com reposição de pele íntegra, o que pode demorar entre duas e quatro semanas.

O período de incubação do vírus Mpox varia entre 5 e 21 dias. Os sintomas podem variar entre leves a graves e incluem febre, cefaleias, mialgias, odinofagia, fadiga e linfadenopatia (inflamação dos gânglios linfáticos). As erupções cutâneas são um sinal característico da doença, começando como pápulas (lesões elevadas na pele) que evoluem para vesículas (bolhas cheias de líquido) e, finalmente, crostas. Os casos mais graves podem ainda apresentar complicações como pneumonia, encefalite e manifestações oculares (Kumar *et al.*, 2022).

Não existe um tratamento específico para o vírus Mpox, mas sim tratamento de suporte fornecido para controlar os sintomas e prevenir complicações. Este tipo de tratamento inclui medicamentos para reduzir a febre e a dor, bem como a hidratação adequada e o cuidado da pele para evitar infecções secundárias. A vacina contra a varíola (vírus *vaccinia*) demonstrou alguma eficácia na prevenção e na redução da gravidade da doença. Para o tratamento, também podem ser utilizados medicamentos antivirais, como Cidofovir, Tecovirimat (ST-246) e Brincidofovir (Kumar *et al.*, 2022).

1.2. *Molluscum contagiosum*

Molluscum contagiosum (MCV) é um vírus de cadeia dupla de DNA com 200 a 300 nm de comprimento, sendo a única espécie do seu género. Só se consegue replicar na epiderme humana, não afetando assim outros órgãos. Causa uma infecção viral cutânea frequentemente encontrada nas crianças, indivíduos sexualmente ativos e doentes imunocomprometidos. Tal como o Mpox, também é um poxvirus, mais especificamente *Molluscipoxvirus* da família *Poxviridae* (Zorec *et al.* 2018). São conhecidos quatro genótipos principais do MCV, entre os quais o genótipo 1 do vírus (MCV1), que é mais frequente em crianças (98% dos casos) e o genótipo 2 do vírus (MCV2), que está associado à transmissão sexual, sendo também o principal responsável pelas lesões cutâneas ocorridas em indivíduos VIH positivos (Badri & Gandhi, 2023).

O MCV provoca pápulas características pequenas (3-5 mm em média), cor da pele, em forma de cúpula e umbilicadas, algumas das quais têm um centro caseoso. As lesões são tipicamente em número inferior a 20 e geralmente não se encontram nas palmas das mãos e plantas dos pés. No entanto, as lesões podem apresentar-se atipicamente grandes ("molusco gigante") ou disseminadas em doentes imunocomprometidos (Morand *et al.*, 2017).

A transmissão do MCV pode ocorrer através do contacto direto, incluindo contacto sexual, ou indireto, via fômites: toalhas, roupa interior, brinquedos, lâminas de barbear e instrumentos de tatuagem. O MCV também pode propagar para a pele não infetada através de autoinoculação pelo ato de esfregar as lesões. Foram documentadas transmissões *in utero* e pré-parto, resultando em

molusco contagioso congênito ou em lesões cutâneas que surgem nos primeiros meses de vida (Meza-Romero *et al.*, 2019).

O diagnóstico de molusco contagioso baseia-se na examinação clínica. Em caso de dificuldade de diagnóstico pode-se utilizar a dermatoscopia, microscopia confocal, histopatologia e também a PCR em tempo real, que pesquisa o gene P43K dos genótipos MCV1 e MCV2 (Edwards *et al.*, 2021).

Os doentes procuram frequentemente tratamento por razões estéticas, para evitar o estigma social ou simplesmente para evitar a transmissão a outras pessoas. Atualmente, as opções de tratamento incluem a remoção física das lesões, medicamentos tópicos e tratamento sistêmico. A remoção física das lesões baseia-se principalmente na crioterapia com nitrogênio líquido, na curetagem e na cauterização química com ácido tricloroacético. O imiquimod, a cantaridina, o hidróxido de potássio e a tretinoína são alguns dos tratamentos tópicos aplicados nas lesões de molusco contagioso. O cidofovir, inibidor da DNA polimerase, tem sido utilizado e demonstrado sucesso em pessoas imunodeprimidas, mas pode induzir nefrotoxicidade e neutropenia quando utilizado por via intravenosa. Em indivíduos infetados pelo VIH, a principal ferramenta no tratamento de molusco contagioso é a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (Badri & Gandhi, 2023).

1.3. Caso clínico

Um paciente do género masculino, com 22 anos apresentou-se na Consulta de Doenças Infecciosas em março de 2023 com lesões eritematosas na base do pénis, na sua maioria pustulosas e algumas umbilicadas, com 2-3 mm de diâmetro. O paciente negou a presença de sintomas sistémicos, como febre e dores de cabeça, bem como exsudado peniano. No surto recente de Mpox, a transmissão foi predominante em homens que fazem sexo com homens. O paciente foi questionado e afirmou que mantinha uma relação sexual monogâmica heterossexual e negou ter tido relações sexuais com outros homens, mas também referiu que teve relações sexuais desprotegidas em novembro de 2022. Foi realizado um pedido de rastreio completo de infeções sexualmente transmissíveis, incluindo testes de qPCR para vírus Mpox das lesões e zaragatoa orofaríngea. Os testes de anticorpos contra o VIH e o VHC foram negativos; estava vacinado contra o VHB. Os testes de qPCR para *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, Vírus Herpes Simplex 1 e 2 e Papilomavírus também foram negativos. Tanto a zaragatoa da lesão cutânea como a zaragatoa da orofaringe foram positivas para vírus Mpox. Uma vez que não existiam fatores de risco para o vírus Mpox, a sintomatologia e lesões são semelhantes a outras doenças, e a técnica de deteção de vírus Mpox é uma técnica abrangente em que deteta todos os vírus da família *Poxviridae* decidiu-se testar as mesmas amostras para MCV, por se tratar de um vírus da mesma família. A deteção de MCV foi positiva em 6 amostras de Mpox, com Cts muito mais baixos que para Mpox, resultados que levam à necessidade de testar a presença de MCV, sempre que se obtém resultados de Mpox positivos.

2. Materiais e Métodos

Obtenção das amostras. Durante o período entre maio de 2022 e maio de 2023, o LBM do CHUSJ analisou 234 amostras, de 109 pacientes, para pesquisa de vírus MPX. As amostras foram obtidas através de zaragatoas do exsudado da lesão cutânea, zaragatoa da orofaringe e zaragatoa ano-genital (se justificável).

Preparação das amostras. As zaragatoas secas foram colocadas num tubo de 2 mL e, a cada tubo, foram adicionados 290 µL de tampão de lise G2 (800 mM hidrocloreto guanidina; 30mM Tris-HCl, pH 8.0; 30 mM EDTA, pH 8.0; 5% Tween 20; 0.5% Triton X-100) e 10 µL de proteínase K. Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas no banho seco a 56°C pelo menos durante 15 minutos.

Extração de DNA. O DNA foi extraído a partir de 200 µL da mistura resultante da incubação a 56°C, utilizando o Kit da Qiagen EZ1 DSP Virus, que contem partículas magnéticas. A extração de DNA foi totalmente automatizada, no equipamento EZ1 Advanced da Qiagen, num programa de 43 minutos. O DNA foi recuperado em 60 µL de tampão de eluição e utilizado para deteção de MPX.

Deteção de vírus MPX por qPCR. Utilizou-se o PCR em tempo real para a deteção do vírus MPX nas amostras selecionadas. Os *primers* específicos utilizados foram: (forward: 5' – CCDCAYCARYTVGCIACIBTIGAYT – 3'; reverse 1: 5' – GMDATIAYIGTYTTICCTGAICCCAT – 3'; reverse 2: 5' – GCCACGAATGTCTTACCACTTCCCAT – 3'). O qPCR foi realizado segundo as instruções do Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 10 µM de cada *primer* e 10 µM de cada uma das 4 sondas. O termociclador foi programado para 96 °C durante 5 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos, 45 °C por 20 segundos e 60 °C por 40 segundos (Luciani, Léa *et al.* 2021).

Deteção de MCV por qPCR. O protocolo de qPCR foi realizado segundo as instruções do Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), com 10 µM de cada um dos *primers* e 10 µM da sonda de hidrólise. Cada reação tinha o volume final de 50 µL, com 30 µL da mistura e 20 µL da amostra. A amplificação foi realizada no termociclador Rotor-Gene Q da Qiagen (versão do software 2.3.4), programado para 95 °C durante 2 minutos e 45 ciclos de 95 °C por 20 segundos e 60 °C por 45 segundos, com aquisição no canal FAM. Não foi utilizado controlo positivo e o controlo negativo era água (Trama *et al.*, 2007).

Sonda: 5' – 6FAM-AAG CTT GCT CAG CAG CTT CTG GGT ATC GGA CAA GC–BHQ1 -3'

Primer Forward: 5' – AAC CTA CGC TAC CTG AAG CTG GA-3'

Primer Reverse: 5' – CAG GCT CTT GAT GGT CGA AAT GGA-3'

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização das amostras e população de MPX

Um total de 234 amostras de 109 pacientes foram analisadas para a detecção de vírus MPX. Do total dos pacientes, 98 eram do sexo masculino (89,9%), sendo os restantes do sexo feminino e a média das idades era de 34 anos.

Alguns dos pacientes apresentavam outras doenças como, sífilis (32%), *Neisseria gonorrhoeae* (12,8%), *Chlamydia trachomatis* (11,9%), Herpes 1 & 2 (2,8%) e Varicella zoster vírus (0,9%).

Para a detecção de vírus MPX foi utilizada a técnica de qPCR e obtiveram-se 95 amostras positivas (40,6%), todas estas de pacientes do sexo masculino.

3.2. Caracterização das amostras e população de MCV

Como referido anteriormente, a técnica de identificação de vírus MPX por qPCR permite detetar uma sequência nucleotídica conservada em todos os vírus da família *Poxviridae* (Luciani, Léa *et al.* 2021). Isto significa que, um resultado positivo pode indicar a presença de qualquer Poxvirus. Como o MCV também é um Poxvirus, tal como o vírus MPX, decidiu-se testar para MCV, as amostras positivas para o vírus MPX (Trama *et al.*, 2007).

As 95 amostras positivas para o vírus MPX que foram analisadas para a detecção de MCV pertenciam a indivíduos do sexo masculino, com idades entre 21 e 65 anos e média de idades de 35 anos.

Para analisar o MCV utilizou-se a técnica de qPCR com sondas de hidrólise *Taqman* e obtiveram-se 6 amostras positivas (6,3%).

3.3. Análise e discussão dos resultados obtidos nos ensaios de qPCR

Em 23 de julho de 2022, a Mpox foi declarada uma emergência de saúde pública internacional pela OMS. Entre 1 de janeiro e 23 de julho de 2022, foram notificados à OMS 16 016 casos confirmados laboratorialmente de Mpox e cinco mortes em 75 países dos 5 continentes (Huggett *et al.*, 2022).

A maior parte da população humana não tem imunidade não só à varíola, mas também a outras infeções por poxvírus causadas por vírus zoonóticos, como o vírus Mpox. Este facto é demonstrado por surtos cada vez mais frequentes de infeções humanas causadas por este vírus em vários países, como o surto de 2022 (Li *et al.*, 2006). A fim de desenvolver uma resposta rápida para evitar a propagação da infeção, e dada a semelhança das manifestações clínicas da Mpox com

uma infecção generalizada de molusco contagioso causada pelo MCV, é necessário realizar diagnósticos diferenciais de determinados agentes infecciosos (Maksyutov *et al.*, 2016).

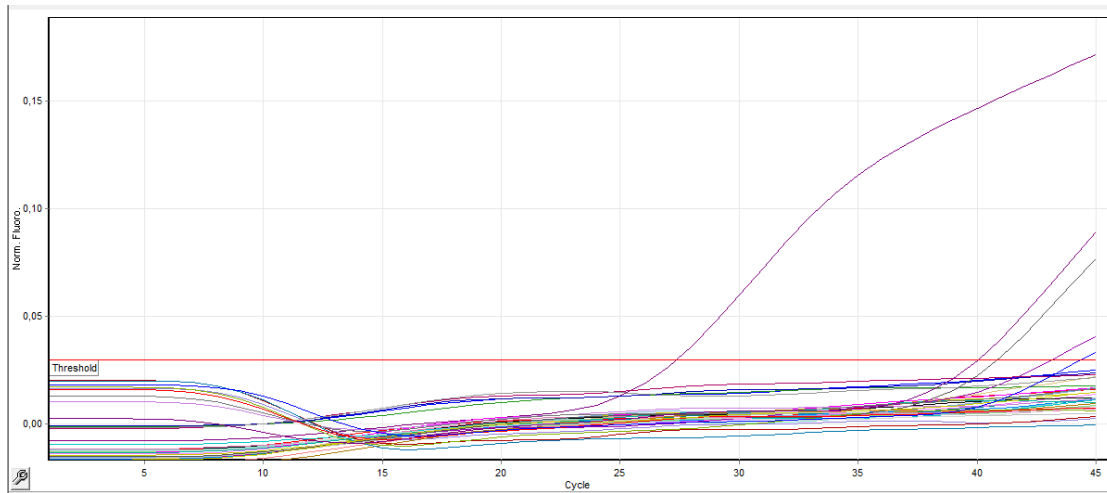
Tal como aconteceu com a COVID-19, a qPCR é a única técnica capaz de ser utilizada a uma velocidade que permite fornecer feedback atempado sobre quaisquer intervenções de saúde pública (Huggett *et al.*, 2022).

A possibilidade de monitorizar o qPCR revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e cDNA/RNA. O qPCR permite a quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa e reprodutível, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. A determinação do *Cycle threshold* (Ct) permite correlacionar o aumento da fluorescência com a quantidade inicial do DNA alvo.

Para realizar a técnica de qPCR é utilizado um termociclador ótico para monitorizar a fluorescência e, neste estudo, foram utilizadas as sondas de hidrólise *Taqman*.

Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador Rotor-Gene Q 5plex da Qiagen e no mesmo computador com a versão de software 2.3.4. Em todas as reações considerou-se o *Threshold* igual a 0,03 e apenas foi utilizado controlo negativo, pois o kit comercial não tem controlo positivo. Os resultados das reações de qPCR estão apresentados nas figuras 43, 44, 45 e 46.

(A)



(B)

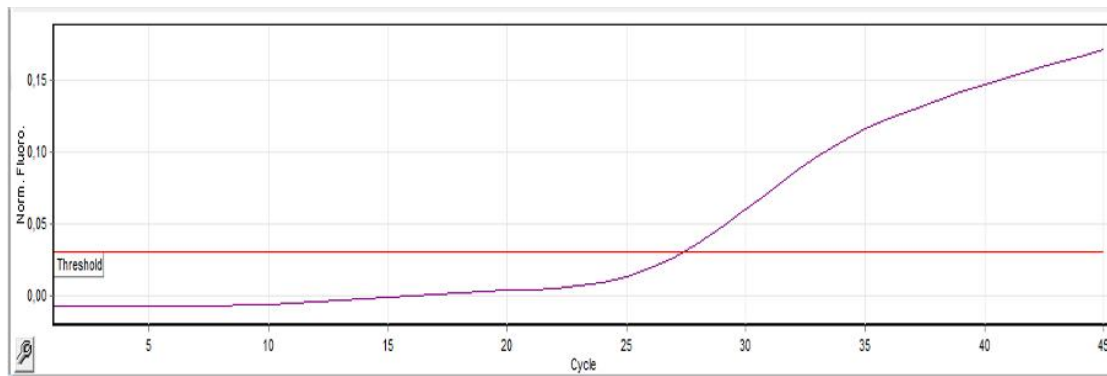


Figura 43. Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controlo negativo (A). Curva de amplificação da amostra positiva com Ct igual a 27,37 (B). Interseção da linha vertical vermelha (Threshold) com a curva define o valor de Ct no eixo X. Cycle threshold (Ct)

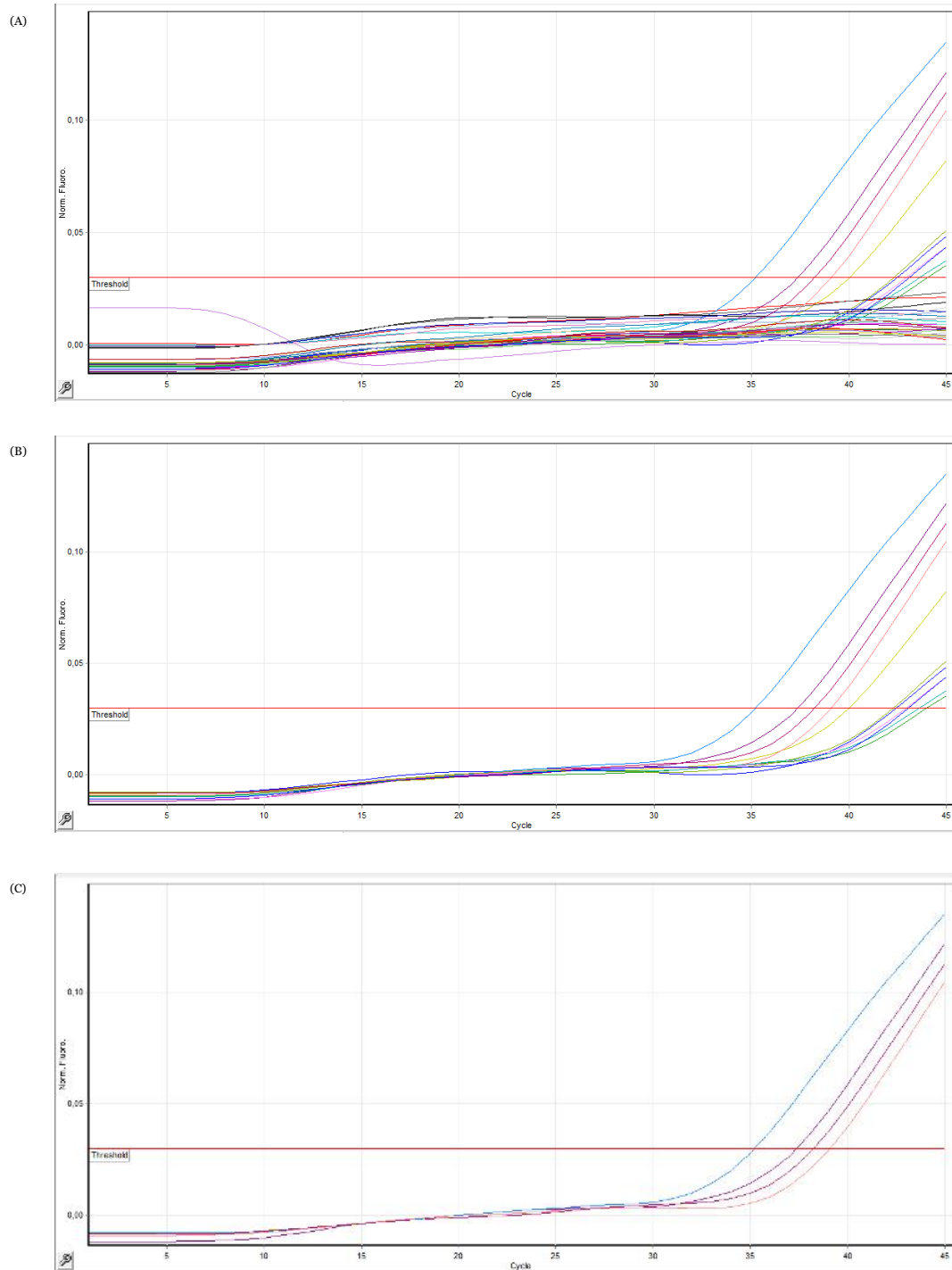
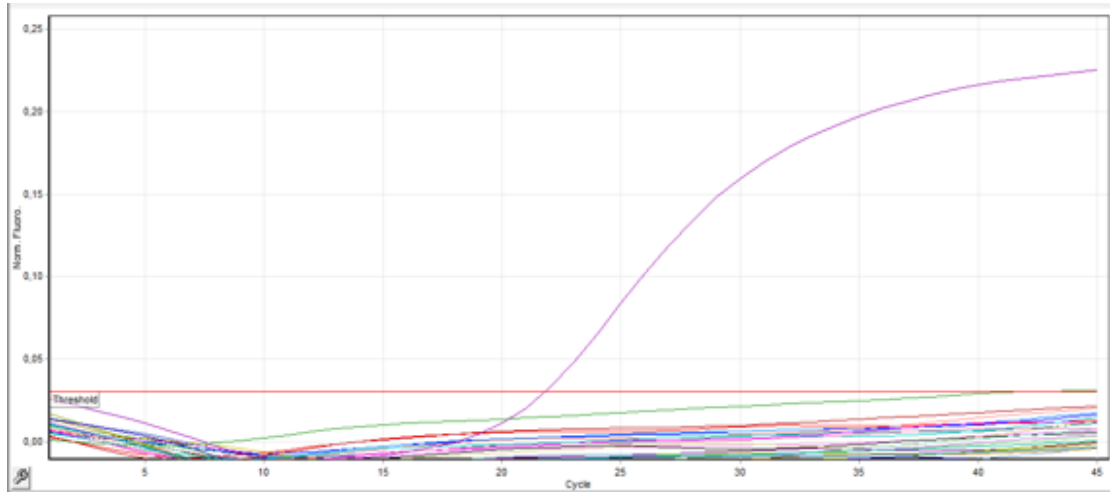


Figura 44. Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controlo negativo (A). Curva de amplificação das amostras que amplificaram (amostras positivas e amostras com amplificações inespecíficas) (B). Curva de amplificação das amostras positivas com Cts iguais a 35,23; 37,39; 38,27 e 39,11.

(A)



(B)

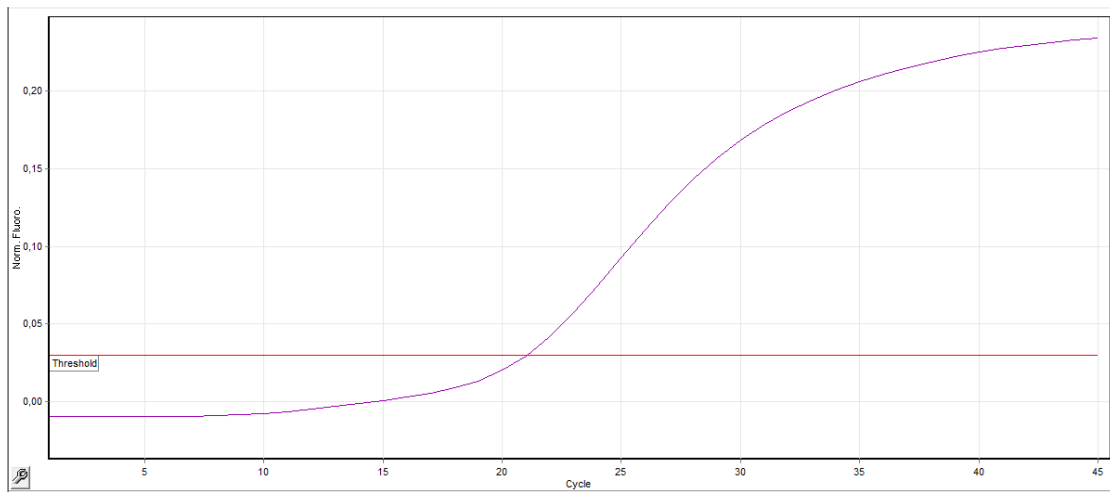


Figura 45. Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV em 35 amostras com controle negativo (A). Curva de amplificação da amostra positiva com Ct igual a 21,05 (B).

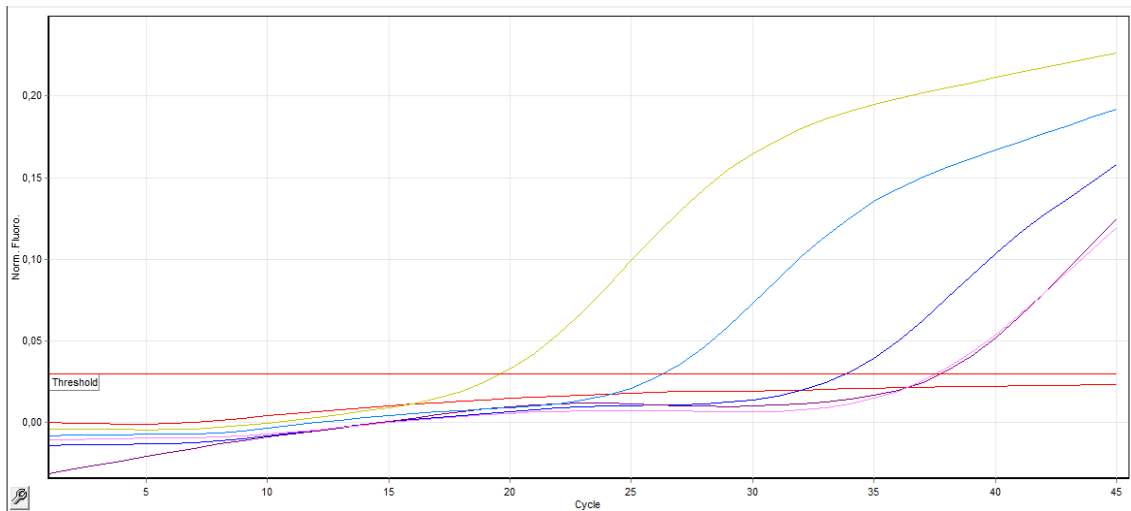


Figura 46. Curva de amplificação por qPCR para detecção de MCV das amostras anteriormente positivas com controlo negativo.

Das 95 amostras analisadas (fig. 43, 44, 45), 6 obtiveram resultado positivo com Cts de 27,37; 35,23; 37,39; 38,27; 39,11 e 21,05. Para além das 6 amostras consideradas positivas, também houve algumas que amplificaram ($n = 11$), com Cts de 40,03; 40,07; 40,88; 43,15; 44,41; 42,31; 42,46; 42,94; 43,08; 43,64 e 44,05. Estas amostras não foram consideradas positivas pois possuíam valores de Cts “tardios”, o que corresponde a amplificações inespecíficas que podem ocorrer devido à degradação das sondas da reação (Salgado, Maristela Marques *et al.* 2013). Neste estudo não se consideraram amostras positivas com valores de Cts iguais ou superiores a 40.

A amostra positiva com o menor valor de Ct (Ct = 21,05) (fig. 45) foi utilizada como controlo positivo num novo ensaio. Neste ensaio (fig. 45) só se analisaram as amostras anteriormente positivas para comparar os Cts entre os resultados sem controlo negativo e os resultados com controlo positivo. Todas as amostras analisadas obtiveram resultados positivos, com valores de Cts iguais a 19,68 (controlo positivo), 26,32; 33,87; 37,61; 37,79. Apesar de, inicialmente, na detecção de MCV termos obtido 6 amostras positivas, neste ensaio apenas se testaram 5 das mesmas, pois a 6^a amostra não tinha volume suficiente para ser testada. Para a amostra que não foi testada, esperava-se um resultado positivo com valor de Ct entre 30 e 35.

Os resultados do último ensaio, em que se utilizou uma amostra como controlo positivo (fig. 46), são concordantes com os resultados anteriormente obtidos (fig. 43, 44, 45), sem controlo positivo.

O protocolo de detecção de MCV utilizado também consegue identificar os genótipos do MCV através da pirosequenciação, no entanto esta identificação não tem relevância clínica, uma vez que o tratamento é o mesmo independente do genótipo de MCV (Trama *et al.* 2007).

Os resultados deste estudo demonstram a viabilidade da realização de um diagnóstico laboratorial fiável e definitivo do molusco contagioso com um ensaio molecular de qPCR. As semelhanças de sintomas e lesões entre diferentes infeções como Mpox, o molusco contagioso, a sífilis e a varicela zoster, pode levar a um diagnóstico errado. Assim, os resultados obtidos no presente estudo salientam a importância de diferentes abordagens metodológicas para a obtenção de um diagnóstico correto.

Referências Bibliográficas

- Arnold, A., MacMahon, E., (2017). Adenovirus infections, *Medicine*, 45 (12), 777-780. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.09.016>.
- Ahmad, I., & Wilson, D. W. (2020). HSV-1 Cytoplasmic Envelopment and Egress. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 5969. <https://doi.org/10.3390/ijms21175969>.
- Akhtar, A., Fuchs, E., Mitchison, T., Shaw, R. J., St Johnston, D., Strasser, A., Taylor, S., Walczak, C., & Zerial, M. (2011). A decade of molecular cell biology: achievements and challenges. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(10), 669–674. <https://doi.org/10.1038/nrm3187>.
- Al-Heeti, O. M., Cathro, H. P., & Ison, M. G. (2022). Adenovirus Infection and Transplantation. *Transplantation*, 106(5), 920–927. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003988>.
- Alexander L. (2016). Rapid, Effective DNA Isolation from *Osmanthus* via Modified Alkaline Lysis. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 27(2), 53–60. <https://doi.org/10.7171/jbt.16-2702-001>.
- Ali, N., Rampazzo, R. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>.
- Ali, Z., Jin, G., Hu, Z., Wang, Z., Khan, M. A., Dai, J., & Tang, Y. (2018). A Review on NanoPCR: History, Mechanism and Applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 18(12), 8029–8046. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.16390>.
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European journal of internal medicine*, 34, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>.
- Aslan, A. T., & Balaban, H. Y. (2020). Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World journal of gastroenterology*, 26(37), 5543–5560. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543>.
- Backstedt, B. T., Buyuktanir, O., Lindow, J., Wunder, E. A., Jr, Reis, M. G., Usmani-Brown, S., Ledizet, M., Ko, A., & Pal, U. (2015). Efficient Detection of Pathogenic Leptospire Using 16S Ribosomal RNA. *PloS one*, 10(6), e0128913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128913>.
- Badri T, Gandhi GR. *Molluscum Contagiosum*. [Updated 2023 Mar 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441898/>.
- Banerjee, A., Kulkarni, S., & Mukherjee, A. (2020). Herpes Simplex Virus: The Hostile Guest That Takes Over Your Home. *Frontiers in microbiology*, 11, 733. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00733>.

- Borchers, A. T., Chang, C., Gershwin, M. E., & Gershwin, L. J. (2013). Respiratory syncytial virus—a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 45(3), 331–379. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>.
- Bouزيد, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., & Tyler, K. M. (2013). Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), 115–134. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-12>.
- Britton, R. A., & Young, V. B. (2014). Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*, 146(6), 1547–1553. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.059>.
- Butler, D. F., & Myers, A. L. (2018). Changing Epidemiology of *Haemophilus influenzae* in Children. *Infectious disease clinics of North America*, 32(1), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.10.005>.
- Castillo, D., Harcourt, B., Hatcher, C., Jackson, M., Katz, L., Mair, R., Mayer, L., Mcgee, L., Novak, R., Rahalison, L., Schmink, S., Theodore, M. J., Thomas, J., Vuong, J., Wang, X. (2011). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual. 2nd edition.
- Caugant, D. A., & Brynildsrud, O. B. (2020). *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), 84–96. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0282-6>.
- Cavrini, F., Liguori, G., Andreoli, A., & Sambri, V. (2010). Multiple nucleotide substitutions in the *Neisseria meningitidis* serogroup C *ctrA* gene cause false-negative detection by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 3016–3018. <https://doi.org/10.1128/JCM.00103-10>.
- CDC. (2021). Chlamydial infections - STI treatment guidelines. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/chlamydia.htm> (consultado em 19/09/2023).
- CDC. (2019). Where Histoplasmosis Comes From. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/causes.html> (consultado em 15/01/2024).
- CDC. (2019). Amebiasis. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/> (consultado em 17/01/2024).
- CDC. (2019). Cryptosporidiosis. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html> (consultado em 15/04/2023).
- Chakravorty, S., Afzali, B., & Kazemian, M. (2022). EBV-associated diseases: Current therapeutics and emerging technologies. *Frontiers in immunology*, 13, 1059133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059133>.

- Chen, B. S., Lee, H. C., Lee, K. M., Gong, Y. N., & Shih, S. R. (2020). Enterovirus and Encephalitis. *Frontiers in microbiology*, 11, 261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00261>.
- Chen, Y., Gin, J. W., Wang, Y., de Raad, M., Tan, S., Hillson, N. J., Northen, T. R., Adams, P. D., & Petzold, C. J. (2023). Alkaline-SDS cell lysis of microbes with acetone protein precipitation for proteomic sample preparation in 96-well plate format. *PloS one*, 18(7), e0288102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288102>.
- Clark, A. (2019). Infectious diseases [Review of Infectious diseases]. Quizlet. <https://quizlet.com/426771857/lecture-6-infectious-diseases-flash-cards/?funnelUUID=d720ab5b-f450-43a6-a5af-559018a79794> (consultado em 11/01/2024).
- Costa, D., & Iraola, G. (2019). Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00072-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-18>.
- Creative Diagnostics. (s.d.). Respiratory Syncytial Virus Antigens. www.creative-diagnostics.com. <https://www.creative-diagnostics.com/tag-respiratory-syncytial-virus-antigens-51.htm> (consultado em 26/01/2024).
- Crobach, M. J. T., Vernon, J. J., Loo, V. G., Kong, L. Y., Péchiné, S., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2018). Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical microbiology reviews*, 31(2), e00021-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>.
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A., & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 38(7), 1211–1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 447–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>.
- de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature reviews. Microbiology*, 14(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>.
- Dion, CF., Ashurst, JV. *Streptococcus pneumoniae*. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470537/>.
- Dioverti, M. V., & Razonable, R. R. (2016). Cytomegalovirus. *Microbiology spectrum*, 4(4), 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015>.
- Duell, B. L., Su, Y. C., & Riesbeck, K. (2016). Host-pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS letters*, 590(21), 3840–3853. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12351>.

- Edwards, S., Boffa, M. J., Janier, M., Calzavara-Pinton, P., Rovati, C., Salavastru, C. M., Rongioletti, F., Wollenberg, A., Butacu, A. I., Skerlev, M., & Tiplica, G. S. (2021). 2020 European guideline on the management of genital molluscum contagiosum. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 35(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/jdv.16856>.
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2016). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Critical reviews in microbiology*, 42(3), 406–417. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958050>.
- Esneau, C., Duff, A. C., & Bartlett, N. W. (2022). Understanding Rhinovirus Circulation and Impact on Illness. *Viruses*, 14(1), 141. <https://doi.org/10.3390/v14010141>.
- Fiolet, T., Kherabi, Y., MacDonald, C. J., Ghosn, J., & Peiffer-Smadja, N. (2022). Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(2), 202–221. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>.
- Fuchs, W., & Brockmeyer, N. H. (2014). Sexually transmitted infections. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 12(6), 451–463. <https://doi.org/10.1111/ddg.12310>.
- Gadkar, Vijay J., and Martin Filion. 2014. "New Developments in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Technology" *Current Issues in Molecular Biology* 16, no. 1: 1-6. <https://doi.org/10.21775/cimb.016.001>.
- Gaitonde, D. Y., Moore, F. C., & Morgan, M. K. (2019). Influenza: Diagnosis and Treatment. *American family physician*, 100(12), 751–758.
- Gimferrer, L., Andrés, C., Rando, A., Piñana, M., Codina, M. G., Martin, M. D. C., Fuentes, F., Rubio, S., Alcubilla, P., Pumarola, T., & Antón, A. (2018). Evaluation of Seegene Allplex Respiratory Panel 1 kit for the detection of influenza virus and human respiratory syncytial virus. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 105, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.006>.
- Goldschmidt, P., Degorge, S., Merabet, L., & Chaumeil, C. (2014). Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PloS one*, 9(6), e94886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094886>.
- Greber, U. F., & Flatt, J. W. (2019). Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annual review of virology*, 6(1), 177–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015550>.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(2), 10.1101/pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>.
- Green, Michael & Sambrook, Joseph. (2018). Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. [pdb.prot095133](https://doi.org/10.1101/pdb.prot095133). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095133>.

- Green, Michael & Sambrook, Joseph. (2018). Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. pdb.proto95133. <https://doi.org/10.1101/pdb.proto95042>.
- Guadalupe Frías-De-León, M., García-Salazar, E., & Acosta-Altamirano, G. (2023). Virulence Attributes in *Aspergillus fumigatus*. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.111778.
- Guillén, N. (2023). Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2158656>.
- Gundamraj, V., & Hasbun, R. (2023). Viral meningitis and encephalitis: an update. *Current opinion in infectious diseases*, 36(3), 177–185. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000922>.
- Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>.
- Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5.
- Hadi, Assist. Prof. Dr. Ameer & Mohammed, Shakir & Jebor, Mohammed. (2015). Molecular Study of Epstein Barr Virus, P16 and Bcl2 Gene Expression in Tissues from Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6. 1050-1063.
- Han, S. X., Jia, X., Ma, J. L., & Zhu, Q. (2013). Molecular beacons: a novel optical diagnostic tool. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(2), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0209-7>.
- Harp, D. F., & Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 157(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.02.024>.
- Hawkins, S. F. C., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1546, 125–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- Hayat, Azam. (2012). The Molecular Interactions between Two Activation Pathways of Complement are Essential for a Protective Innate Immune Response to *Neisseria Meningitidis* Infection.
- Heldman, M. R., Chang, Y. C., Saullo, J., Baker, A. W., Maziarz, E. K., Tam, P. C., Messina, J. A., Reynolds, J. M., Wolfe, C. R., & Alexander, B. D. (2023). 641. Limited Utility of Epstein-Barr Virus (EBV) Surveillance for Predicting Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder in EBV Seropositive Adult Lung Transplant Recipients. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(Suppl 2), ofad500.705. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad500.705>.

Hewavisenti, R. V., Arena, J., Ahlenstiel, C. L., & Sasson, S. C. (2023). Human papillomavirus in the setting of immunodeficiency: Pathogenesis and the emergence of next-generation therapies to reduce the high associated cancer risk. *Frontiers in immunology*, *14*, 1112513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112513>.

Hirsch, H. H., Martino, R., Ward, K. N., Boeckh, M., Einsele, H., & Ljungman, P. (2013). Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *56*(2), 258–266. <https://doi.org/10.1093/cid/cis844>.

Hollingshead, S., & Tang, C. M. (2019). An Overview of *Neisseria meningitidis*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1969*, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9202-7_1.

Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in microbiology*, *26*(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>.

Houen, G., & Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, *11*, 587380. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587380>.

Huggett, J. F., French, D., O'Sullivan, D. M., Moran-Gilad, J., & Zumla, A. (2022). Monkeypox: another test for PCR. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *27*(32), 2200497. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.32.2200497>.

Hussain, A., Kaler, J., Lau, G., & Maxwell, T. (2022). Clinical Conundrums: Differentiating Monkeypox From Similarly Presenting Infections. *Cureus*, *14*(10), e29929. <https://doi.org/10.7759/cureus.29929>.

Ibekwe, T., Kwaghe, V., Habib, Z., & Ibekwe, P. (2021). The Role of Antiviral Drugs in the Case-Management of Respiratory Syncytial Virus, Influenza and COVID-19. *J Antivir Antiretrovir*. <https://doi.org/10.35248/1948-5964.13.s16.002>.

Jackson, D. J., & Gern, J. E. (2022). Rhinovirus Infections and Their Roles in Asthma: Etiology and Exacerbations. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, *10*(3), 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.01.006>.

Janssen, K. J. H., Dirks, J. A. M. C., Dukers-Muijrs, N. H. T. M., Hoebe, C. J. P. A., & Wolffs, P. F. G. (2018). Review of *Chlamydia trachomatis* viability methods: assessing the clinical diagnostic impact of NAAT positive results. *Expert review of molecular diagnostics*, *18*(8), 739–747. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1498785>.

Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V., & Ebrahimpour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of medical virology*, *93*(8), 4638–4646. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>.

- Jha, A., Jarvis, H., Fraser, C., JM Openshaw, P. (2016) Respiratory Syncytial Virus. SARS, MERS and other Viral Lung Infections, capítulo 5. European Respiratory Society. ISBN: 9781849840699.
- Jiang, Z., Li, S., Zhu, C., Zhou, R., & Leung, P. H. M. (2021). Mycoplasma pneumoniae Infections: Pathogenesis and Vaccine Development. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2), 119. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020119>.
- Johnston, C., Koelle, D. M., & Wald, A. (2011). HSV-2: in pursuit of a vaccine. *The Journal of clinical investigation*, 121(12), 4600–4609. <https://doi.org/10.1172/JCI57148>.
- Kannan, S., Balakrishnan, J., & Govindasamy, A. (2020). Listeria monocytogens - Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. *Microbial pathogenesis*, 149, 104575. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104575>.
- Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., & Ochner, C. (2018). Entamoeba Histolytica: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*, 2018, 4601420. <https://doi.org/10.1155/2018/4601420>.
- Kashyap, S., & Sarkar, M. (2010). Mycoplasma pneumonia: Clinical features and management. *Lung India: official organ of Indian Chest Society*, 27(2), 75–85. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.63611>.
- Katevatis, C., Fan, A., & Klapperich, C. M. (2017). Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PloS one*, 12(5), e0176848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>.
- Kearney E. (2013). Internal quality control. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1065, 277–289. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0_18.
- Kemper, L., & Hensel, A. (2023). Campylobacter jejuni: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Applied microbiology and biotechnology*, 107(9), 2725–2754. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12456-w>.
- Kerr J. R. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *Journal of clinical pathology*, 72(10), 651–658. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>.
- Kohil, A., Jemmieh, S., Smatti, M. K., & Yassine, H. M. (2021). Viral meningitis: an overview. *Archives of virology*, 166(2), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04891-1>.
- Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A., & van de Beek, D. (2023). Human Listeriosis. *Clinical microbiology reviews*, 36(1), e0006019. <https://doi.org/10.1128/cmr.00060-19>.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>.

- Koshy, L., Anju, A. L., Harikrishnan, S., Kutty, V. R., Jissa, V. T., Kurikesu, I., Jayachandran, P., Jayakumaran Nair, A., Gangaprasad, A., Nair, G. M., & Sudhakaran, P. R. (2017). Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Molecular biology reports*, 44(1), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4085-9>.
- Kotton, C. N., & Kamar, N. (2023). New Insights on CMV Management in Solid Organ Transplant Patients: Prevention, Treatment, and Management of Resistant/Refractory Disease. *Infectious diseases and therapy*, 12(2), 333–342. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00746-1>.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Huprikar, S., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., & The Transplantation Society International CMV Consensus Group (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*, 102(6), 900–931. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002191>.
- Kreling, V., Falcone, F. H., Kehrenberg, C., & Hensel, A. (2020). *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs?. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(24), 10409–10436. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10974-5>.
- Kumar, N., Acharya, A., Gendelman, H. E., & Byrareddy, S. N. (2022). The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. *Journal of autoimmunity*, 131, 102855. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102855>.
- Kunz, A. N., & Ottolini, M. (2010). The role of adenovirus in respiratory tract infections. *Current infectious disease reports*, 12(2), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0084-5>.
- Lansiaux, E., Jain, N., Laivacuma, S., & Reinis, A. (2022). The virology of human monkeypox virus (hMPXV): A brief overview. *Virus research*, 322, 198932. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198932>.
- Laurén, A., Braun, M., Byrne, P., Cazzin, C., Colletti, K., Cox, C., Dietz, L., Emrich, T., Geddes, K., Herr, K., Iles, T., Rogue, A., Verlinden, Y., & Timmerman, P. (2021). Applying context of use to quantitative polymerase chain reaction method validation and analysis: a recommendation from the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis*, 13(23), 1723–1729. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0218>.
- Lautenschlager I. (2009). CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 22(11), 1031–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00907.x>.
- Leblanc-Maridor, M., Beaudou, F., Seegers, H., Denis, M., & Belloc, C. (2011). Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. *BMC microbiology*, 11, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-113>.

- Lecuit M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *Cellular microbiology*, 22(4), e13186. <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>.
- Ledoux, M. P., & Herbrecht, R. (2023). Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(2), 131. <https://doi.org/10.3390/jof9020131>.
- Li, L., Ma, J., Guo, P., Song, X., Li, M., Yu, Z., Yu, Z., Cheng, P., Sun, H., & Zhang, W. (2022). Molecular beacon based real-time PCR p1 gene genotyping, macrolide resistance mutation detection and clinical characteristics analysis of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *BMC infectious diseases*, 22(1), 724. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07715-6>.
- Li, L., Ma, J., Yu, Z., Li, M., Zhang, W., & Sun, H. (2023). Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*: An updated review. *Microbiological research*, 266, 127221. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221>.
- Li, P., Li, M., Yue, D., & Chen, H. (2022). Solid-phase extraction methods for nucleic acid separation. A review. *Journal of separation science*, 45(1), 172–184. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100295>.
- Li, Y., Olson, V. A., Laue, T., Laker, M. T., & Damon, I. K. (2006). Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 36(3), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.012>.
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(7), 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>.
- Lin, E. Y., Adamson, P. C., & Klausner, J. D. (2021). Epidemiology, Treatments, and Vaccine Development for Antimicrobial-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*: Current Strategies and Future Directions. *Drugs*, 81(10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01530-0>.
- Liu, Y., Hill, M. G., Klose, T., Chen, Z., Watters, K., Bochkov, Y. A., Jiang, W., Palmenberg, A. C., & Rossmann, M. G. (2016). Atomic structure of a rhinovirus C, a virus species linked to severe childhood asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(32), 8997–9002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606595113>.
- Luo M. (2012). Influenza virus entry. *Advances in experimental medicine and biology*, 726, 201–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9.
- Lynch, D. L., Pavlova, A., Fan, Z., & Gumbart, J. C. (2023). Understanding Virus Structure and Dynamics through Molecular Simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 19(11), 3025–3036. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00116>.
- Lynch, J. P., 3rd, & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37(4), 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>.

- Lynch, J. P., 3rd, Fishbein, M., & Echavarria, M. (2011). Adenovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32(4), 494–511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283287>.
- Lynne, S. G. (2007). *Diagnostic medical parasitology*. American Society for Microbiology Press. ISBN: 1-55581-380-1.
- Maksyutov, R. A., Gavrilova, E. V., & Shchelkunov, S. N. (2016). Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of virological methods*, 236, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.024>.
- Marquart M. E. (2021). Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. *Virulence*, 12(1), 766–787. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1889812>.
- McCarty, T. P., White, C. M., & Pappas, P. G. (2021). Candidemia and Invasive Candidiasis. *Infectious disease clinics of North America*, 35(2), 389–413. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.007>.
- McCormick, A., Loeffler, J., & Ebel, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular microbiology*, 12(11), 1535–1543. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x>.
- Mcpherson, R. A., & Pincus, M. R. (2022). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. (24th edition). Elsevier Science. ISBN: 978-0-323-67320-4.
- Mekuria, S., Tolossa, D., Abebe, T., Nour, T. Y., Tesfaye, A., & Roble, A. K. (2023). Prevalence, Antimicrobial Drug Resistance and Associated Risk Factors of *Streptococcus Pneumoniae* Bacteria Infection Among Under-Five Children With Acute Lower Respiratory Tract Infection Attending Sheik Hassan Yebere Referral Hospital, Jig-Jiga, Ethiopia. *Infection and drug resistance*, 16, 3511–3523. <https://doi.org/10.2147/IDR.S409919>.
- Mestrovic, T., & Ljubin-Sternak, S. (2018). Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 23(4), 656–670. <https://doi.org/10.2741/4611>.
- Meza-Romero, R., Navarrete-Dechent, C., & Downey, C. (2019). *Molluscum contagiosum*: an update and review of new perspectives in etiology, diagnosis, and treatment. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 12, 373–381. <https://doi.org/10.2147/CCID.S187224>.
- Mittal, J., Ponce, M. G., Gendlina, I., & Nosanchuk, J. D. (2019). *Histoplasma Capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, 422, 157–191. https://doi.org/10.1007/82_2018_114.
- Mohamed, Z. H., Rhein, C., Saied, E. M., Kornhuber, J., & Arenz, C. (2018). FRET probes for measuring sphingolipid metabolizing enzyme activity. *Chemistry and physics of lipids*, 216, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.09.014>.
- Moody C. A. (2022). Regulation of the Innate Immune Response during the Human Papillomavirus Life Cycle. *Viruses*, 14(8), 1797. <https://doi.org/10.3390/v14081797>.

- Morand, A., Delaigue, S., & Morand, J. J. (2017). Review of poxvirus: emergence of monkeypox. *Panorama des poxvirus : émergence du monkeypox. Medecine et sante tropicales*, 27(1), 29–39. <https://doi.org/10.1684/mst.2017.0653>.
- Mukherjee, B., Patra, S., & Kumar Das, A. (2013). Pre-analytical errors in the clinical laboratory and how to minimize them. *International Journal of Bioassays*. 551-553. ISSN: 2278-778X.
- Mullegama, S. V., Alberti, M. O., Au, C., Li, Y., Toy, T., Tomasian, V., & Xian, R. R. (2019). Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 359–383. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_30.
- Murray, S. M., & McKay, P. F. (2021). Chlamydia trachomatis: Cell biology, immunology and vaccination. *Vaccine*, 39(22), 2965–2975. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.043>.
- Nam, H. H., & Ison, M. G. (2019). Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ (Clinical research ed.)*, 366, 15021. <https://doi.org/10.1136/bmj.l5021>.
- Naughton, P., Healy, M., Enright, F., & Lucey, B. (2021). Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *British journal of biomedical science*, 78(3), 107–116. <https://doi.org/10.1080/09674845.2021.1903683>.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>.
- Nazir, Ruqeya & Rehman, Sabeedah & Nisa, Marofull & Baba, Uqab. (2019). Exploring bacterial diversity. [10.1016/B978-0-12-817495-1.00007-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00007-4).
- Negi, Neema & Das, Bimal. (2017). Streptococcus pneumoniae: An insight into Molecular Pathogenesis and Virulence Factors. *Pneumococcal Diseases in Children*. Chapter 5.
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature reviews. Microbiology*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>.
- Nolen, L. D., Osadebe, L., Katomba, J., Likofata, J., Mukadi, D., Monroe, B., Doty, J., Hughes, C. M., Kabamba, J., Malekani, J., Bomponda, P. L., Lokota, J. I., Balilo, M. P., Likafi, T., Lushima, R. S., Ilunga, B. K., Nkawa, F., Pukuta, E., Karhemere, S., Tamfum, J. J., ... Reynolds, M. G. (2016). Extended Human-to-Human Transmission during a Monkeypox Outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerging infectious diseases*, 22(6), 1014–1021. <https://doi.org/10.3201/eid2206.150579>.
- Noor, A., & Krilov, L. R. (2016). Enterovirus Infections. *Pediatrics in review*, 37(12), 505–515. <https://doi.org/10.1542/pir.2016-0103>.
- Ntanasis-Stathopoulos, I., Kyriazoglou, A., Lontos, M., A Dimopoulos, M., & Gavriatopoulou, M. (2020). Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(3), 1281–1285.

- O'Leary, J. K., Sleator, R. D., & Lucey, B. (2021). *Cryptosporidium* spp. diagnosis and research in the 21st century. *Food and waterborne parasitology*, 24, e00131. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00131>.
- Oscorbin, I., & Filipenko, M. (2023). Bst polymerase - a humble relative of Taq polymerase. *Computational and structural biotechnology journal*, 21, 4519–4535. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.008>.
- Oyouni A. A. A. (2023). Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *Journal of infection and public health*, 16(4), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.014>.
- Pai, S., Enoch, D. A., & Aliyu, S. H. (2015). Bacteremia in children: epidemiology, clinical diagnosis and antibiotic treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(9), 1073–1088. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1063418>.
- Pamer E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature reviews. Immunology*, 4(10), 812–823. <https://doi.org/10.1038/nri1461>.
- Parrott, G. L., Kinjo, T., & Fujita, J. (2016). A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 7, 513. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00513>.
- Peeling, R. W., Heymann, D. L., Teo, Y. Y., & Garcia, P. J. (2022). Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet (London, England)*, 399(10326), 757–768. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02346-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02346-1).
- Pesch, M. H., Saunders, N. A., & Abdelnabi, S. (2021). Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Prevention, Presentation, Management and Neonatal Outcomes. *Journal of midwifery & women's health*, 66(3), 397–402. <https://doi.org/10.1111/jmwh.13228>.
- Petca, A., Borislavski, A., Zvanca, M. E., Petca, R. C., Sandru, F., & Dumitrascu, M. C. (2020). Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 20(6), 186. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9316>.
- Phan, T., Stephenson, R., Cai, T., Andacic, N., & McKew, G. (2022). A comparison of SARS-CoV-2 RNA extraction with the QuickGene-810 Nucleic Acid Isolation System compared to the EZ1 Advanced DSP Virus Kit. *Access microbiology*, 4(5), acmi000353. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000353>.
- Phillips J. A. (2019). Chlamydia Infections. *Workplace health & safety*, 67(7), 375–376. <https://doi.org/10.1177/2165079919853590>.
- Pizza, M., & Rappuoli, R. (2015). *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. *Current opinion in microbiology*, 23, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.006>.
- Pleschka S. (2013). Overview of influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 1–20. https://doi.org/10.1007/82_2012_272.

Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J.E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Medica*, 42, 243-258. <https://doi.org/10.25100/CM.V42I2.778>.

Qiagen (2021). EZ1&2 Virus Handbook.

Qiagen (2014). QIAamp DNA Micro Handbook. 3th edition.

Quillin, S. J., & Seifert, H. S. (2018). *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 16(4), 226–240. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.169>.

Qvarnstrom, Y., James, C., Xayavong, M., Holloway, B. P., Visvesvara, G. S., Sriram, R., & da Silva, A. J. (2005). Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5491–5497. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5491-5497.2005>.

Radkov, A. D., Hsu, Y. P., Booher, G., & VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 87, 991–1014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>.

Rajapakse S. (2022). Leptospirosis: clinical aspects. *Clinical medicine (London, England)*, 22(1), 14–17. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>.

Randazzo, W., D'Souza, D. H., & Sanchez, G. (2018). Norovirus: The Burden of the Unknown. *Advances in food and nutrition research*, 86, 13–53. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.005>.

Rawaa Haseeb Khazal, Mustafa Mohammed Mahmood, Walah Haleem Jaata, Ali. Abd Al Rifa. Chyad, Sahar Adal Maged, & Atyaf Salim ali. (2023). Pathogenesis and Pathophysiology of Acute Bacterial Meningitis. *International Journal of Pharmaceutical and Bio Medical Science*, 3(11), 623–632. <https://doi.org/10.47191/ijpbms/v3-i11-07>.

Reação em cadeia da polimerase. (2023). Wikipédia, a enciclopédia livre. Retrieved 21:27, setembro 15, 2023 from https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Rea%C3%A7%C3%A3o_em_cadeia_da_polimerase&oldid=66603181.

Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>.

Rocha, W. R. V. da, Nunes, L. E. ., Neves, M. L. R. ., Ximenes, E. C. P. de A., & Albuquerque, M. C. P. de A. (2021). Candida genus - Virulence factores, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms. *Research, Society and Development*, 10(4), e43910414283. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14283>.

- Roda, S., Seminari, E., Pieri, T. C., Sachs, M., Di Matteo, A. M., Belliato, M., Corbella, M., Degani, A., Piralla, A., & Bruno, R. (2022). Sars-Cov 2 versus Flu: ECMO-associated bloodstream infections. *The new microbiologica*, 45(1), 35–39.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1275, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3.
- Rohde M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>.
- Roncero, C., & Vázquez de Aldana, C. R. (2020). Glucanases and Chitinases. *Current topics in microbiology and immunology*, 425, 131–166. https://doi.org/10.1007/82_2019_185.
- Rosenberg, J., & Galen, B. T. (2017). Recurrent Meningitis. *Current pain and headache reports*, 21(7), 33. <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0635-7>.
- Rouphael, N. G., & Stephens, D. S. (2012). *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 799, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-346-2_1.
- Rovida, F., Campanini, G., Piralla, A., Adzasehoun, K. M., Sarasini, A., & Baldanti, F. (2013). Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 77(3), 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.020>.
- Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life* (Basel, Switzerland), 11(6), 496. <https://doi.org/10.3390/life11060496>.
- Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in medical virology*, 28(6), e2003. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>.
- Sadowy, E., & Hryniewicz, W. (2020). Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: importance of molecular methods. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(12), 2247–2256. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03991-9>.
- Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e00228-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>.
- Sanar, A. C. (2021). Leptospirose, dando visão a uma doença negligenciada. | Colunistas. Sanarmed. <https://sanarmed.com/leptospirose-dando-visao-a-uma-doenca-negligenciada-colunistas/> (consultado em 12/11/2023).

- Santos, A. S. L., Daniel, A., Cristina, B., Rodrigues, C., Pereira, C., Regina, D., Diogo Gama Caetano, Veiga, E., Fernanda, Tavares, F., Freitas, F., Lins, A., Vasques, J., Livia Melo Villar, Leon, A., Rodrigues, L., Santo, Spitz, N., & Alves, N. (2023). Diagnóstico de infecções virais. Editora FIOCRUZ EBooks, 47–86. <https://doi.org/10.7476/9786557082119.0004>.
- Santos-Ferreira, N., Van Dycke, J., Neyts, J., & Rocha-Pereira, J. (2021). Current and Future Antiviral Strategies to Tackle Gastrointestinal Viral Infections. *Microorganisms*, 9(8), 1599. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081599>.
- Schlech W. F. (2019). Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018>.
- Schmitz, T. C., Dede Eren, A., Spierings, J., de Boer, J., Ito, K., & Foolen, J. (2021). Solid-phase silica-based extraction leads to underestimation of residual DNA in decellularized tissues. *Xenotransplantation*, 28(1), e12643. <https://doi.org/10.1111/xen.12643>.
- Sell, J., & Dolan, B. (2018). Common Gastrointestinal Infections. *Primary care*, 45(3), 519–532. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.008>.
- Shang, Z., Tan, S., & Ma, D. (2021). Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. *International journal of biological sciences*, 17(14), 4073–4091. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64762>.
- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>.
- Shetty, P.J., & Dairawan, M. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 8(1). 39-45. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- Shieh W. J. (2022). Human adenovirus infections in pediatric population - An update on clinicopathologic correlation. *Biomedical journal*, 45(1), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.08.009>.
- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1392, 161–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.
- Smith, J. C., Mailman, T., & MacDonald, N. E. (2013). How to get and get rid of gonorrhea. *Advances in experimental medicine and biology*, 764, 219–239. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4726-9_19.

SNS24. (s.d.). Doenças Infecciosas: Clamídia. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/clamidia/>. (consultado em 12/09/2023).

Soliman S. S. M. (2023). Editorial: Candida spp.-transmission, pathogenesis, host-pathogen interaction, prevention, and treatment. *Frontiers in microbiology*, 14, 1258837. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1258837>.

Stevens, A., Muratore, K., Cui, Y., Johnson, P. J., & Zhou, Z. H. (2021). Atomic Structure of the *Trichomonas vaginalis* Double-Stranded RNA Virus 2. *mBio*, 12(2), e02924-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02924-20>.

Suzuki H. (2019). Rotavirus Replication: Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 248(4), 285–296. <https://doi.org/10.1620/tjem.248.285>.

Tavares, F. (2012). Comparação de Metodologias no Estudo de SNPs mitocondriais com interesse Forense com base numa amostra da População de Timor-Leste. <https://doi.org/10.13140/2.1.1328.2885>.

Tille, P. M. (2017). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (14th ed.). Elsevier. ISBN: 9780323354820.

Themes, U. F. O. (2017, February 19). 31 *Haemophilus* and *Bordetella*. *Basicmedical Key*. <https://basicmedicalkey.com/31-haemophilus-and-bordetella/> (consultado em 15/01/2024).

Thomson, N. R., & Clarke, I. N. (2010). *Chlamydia trachomatis*: small genome, big challenges. *Future microbiology*, 5(4), 555–561. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.31>.

To, K. K. W., Yip, C. C. Y., & Yuen, K. Y. (2017). Rhinovirus - From bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 116(7), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.04.009>.

Tong, L., Huang, S., Zheng, C., Zhang, Y., & Chen, Z. (2022). Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Children: Early Recognition and Management. *Journal of clinical medicine*, 11(10), 2824. <https://doi.org/10.3390/jcm11102824>.

Torretta, S., Zuccotti, G., Cristofaro, V., Etori, J., Solimeno, L., Battilocchi, L., D'Onghia, A., Bonsembiante, A., Pignataro, L., Marchisio, P., & Capaccio, P. (2021). Diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR Using Different Sample Sources: Review of the Literature. *Ear, nose, & throat journal*, 100(2_suppl), 131S–138S. <https://doi.org/10.1177/0145561320953231>.

Trama, J. P., Adelson, M. E., & Mordechai, E. (2007). Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real-time PCR and Pyrosequencing. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 40(4), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.09.007>.

- Tsai, T. A., Tsai, C. K., Kuo, K. C., & Yu, H. R. (2021). Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 54(4), 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.10.002>.
- Tzeng, Y. L., Thomas, J., & Stephens, D. S. (2016). Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. *Critical reviews in microbiology*, 42(5), 759–772. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022507>.
- Unemo, M., Seifert, H. S., Hook, E. W., 3rd, Hawkes, S., Ndowa, F., & Dillon, J. R. (2019). Gonorrhoea. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 79. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0128-6>.
- Uwiringiyeyezu, T., El Khalfi, B., Saile, R., Belhachmi, J., & Soukri, A. (2022). Comparability of CMV DNA Extraction Methods and Validation of Viral Load. *Methods and protocols*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.3390/mps5010006>.
- Van Gerwen, O. T., & Muzny, C. A. (2019). Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1666. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19972.1>.
- Vandini, S., Biagi, C., Fischer, M., & Lanari, M. (2019). Impact of Rhinovirus Infections in Children. *Viruses*, 11(6), 521. <https://doi.org/10.3390/v11060521>.
- Vk, C., Ty, L., Wf, L., Ywy, W. S., An, S., S, Z., & A, M. (2018). Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses. *Microbiological research*, 207, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.015>.
- Wada, Y., Harun, A., Yean, C. Y., & Zaidah, A. R. (2023). A Nanoplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of Vancomycin- and Linezolid-Resistant Genes in *Enterococcus*. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(4), 722. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040722>.
- Watanabe, M., Nishikawaji, Y., Kawakami, H., & Kosai, K. I. (2021). Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*, 13(12), 2502. <https://doi.org/10.3390/v13122502>.
- Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L., & Xu, Z. (2020). Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 80, 104205. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104205>.
- Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J., & Linhares, I. M. (2017). Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 24(10), e00203-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00203-17>.
- Wright, W. F., Pinto, C. N., Palisoc, K., & Baghli, S. (2019). Viral (aseptic) meningitis: A review. *Journal of the neurological sciences*, 398, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.050>.

- Yao, B., Sun, D., Ren, Y., & Wang, M. (2022). Introducing Theoretical Principles of Semi-, Relative, and Absolute Quantification via Conventional, Real-Time, and Digital PCR to Graduate and Senior Undergraduate Students of Chemistry. *J. Chem. Educ.*, 99, 2, 603–611. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00530>.
- Yin, X., & Feng, Z. (2019). Hepatitis E Virus Entry. *Viruses*, 11(10), 883. <https://doi.org/10.3390/v11100883>.
- Young, K., Davis, L. & DiRita, V. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 5, 665–679. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>.
- Zainel, A., Mitchell, H., & Sadarangani, M. (2021). Bacterial Meningitis in Children: Neurological Complications, Associated Risk Factors, and Prevention. *Microorganisms*, 9(3), 535. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030535>.
- Zhang, Q., Zhu, S., Zhang, X., Su, L., Ni, J., Zhang, Y., & Fang, L. (2023). Recent insights into reverse genetics of norovirus. *Virus research*, 325, 199046. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199046>.
- Zheng, J., Yang, R., Shi, M., Wu, C., Fang, X., Li, Y., Li, J., & Tan, W. (2015). Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications. *Chemical Society reviews*, 44(10), 3036–3055. <https://doi.org/10.1039/c5cs00020c>.
- Zhou, J., Law, D. K., Sill, M. L., & Tsang, R. S. (2007). Nucleotide sequence diversity of the *bexA* gene in serotypeable *Haemophilus influenzae* strains recovered from invasive disease patients in Canada. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1996–1999. <https://doi.org/10.1128/JCM.00612-07>.
- Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>.
- Zorec, T. M., Kutnjak, D., Hošnjak, L., Kušar, B., Trčko, K., Kocjan, B. J., Li, Y., Križmarić, M., Miljković, J., Ravnikar, M., & Poljak, M. (2018). New Insights into the Evolutionary and Genomic Landscape of *Molluscum Contagiosum Virus* (MCV) based on Nine MCV1 and Six MCV2 Complete Genome Sequences. *Viruses*, 10(11), 586. <https://doi.org/10.3390/v10110586>.
- Zou, Y., Mason, M. G., Wang, Y., Wee, E., Turni, C., Blackall, P. J., Trau, M., & Botella, J. R. (2017). Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS biology*, 15(11), e2003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003916>.