



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2019

**SOFIA ISABEL
DOMINGUES COMBO**

**BACTERIOLOGIA E VIROLOGIA: METODOLOGIAS
LABORATORIAIS DE AJUDA AO DIAGNÓSTICO
CLÍNICO EM ÂMBITO HOSPITALAR**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

Ano 2019

**SOFIA ISABEL
DOMINGUES COMBO**

**BACTERIOLOGIA E VIROLOGIA: METODOLOGIAS
LABORATORIAIS DE AJUDA AO DIAGNÓSTICO
CLÍNICO EM ÂMBITO HOSPITALAR**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Catarina Chaves, responsável pelo Setor de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e sob coorientação da Professora Doutora Adelaide Almeida, professora auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho ao meu namorado que esteve sempre presente para me apoiar e à minha família que me apoiou incansavelmente durante todo o meu percurso.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar Com Agregação, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Ana Sofia Duarte
Professora Auxiliar, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa

orientadora

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar Com Agregação, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero agradecer primeiramente ao Doutor Fernando Rodrigues por me permitir realizar o estágio no Serviço de Patologia Clínica.

Agradecer à Doutora Cristiana Lopes e à Doutora Vanda Mota por me orientarem nos Serviços de Serologia e Biologia Molecular, respetivamente.

Agradecer à minha orientadora Doutora Catarina Chaves pela sua paciência e disponibilidade para responder às minhas questões.

Agradecer a todos os técnicos de laboratório pelo apoio, ajuda e conhecimentos que me transmitiram e que tão abertamente me acolheram.

Agradecer à minha coorientadora Professora Doutora Adelaide Almeida pela sua disponibilidade para responder às minhas questões e pela sua paciência e trabalho em me apoiar neste estágio e trabalho.

Agradecer aos meus pais pelo incansável apoio durante todo o meu percurso.

Agradecer ao meu namorado pelo carinho, paciência e apoio que me concebeu ao longo do meu percurso.

palavras-chave

Microbiologia clínica, Serologia, Biologia Molecular, Bacteriologia, Micobacteriologia.

resumo

Este trabalho tem como objetivo descrever as metodologias, classificadas em diretas e indiretas, mas também em manuais e automatizadas, utilizadas durante um estágio realizado nos Setores de Bacteriologia, Micobacteriologia, Biologia Molecular e Serologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

keywords

Clinical Microbiology, Bacteriology, Mycobacteriology, Molecular Biology, Serology

abstract

This paper aims to describe the methodologies, classified into direct and indirect, but also manual and automated, applied during an internship carried out at the Bacteriology, Mycobacteriology, Molecular Biology and Serology Sectors of the Clinical Pathology Service of the Coimbra Hospital and University Center.

Índice

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	VI
1. Introdução	1
2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	2
3. Diagnóstico e Controlo: Cultura, Observação e Detecção	3
3.1 Métodos Clássicos	3
3.2 Métodos Moleculares Diretos	3
3.3 Métodos Moleculares Indiretos:	3
4. Microbiologia	5
5. Bacteriologia	5
5.1. Meios de cultura:	6
5.2. Caldos de enriquecimento:	9
5.3. Equipamentos:.....	10
5.4. Produtos Biológicos:	15
5.4.1. Urina	15
5.4.2. Expetorações, Aspirados Brônquicos e Lavados Brônquicos	17
5.4.3. Fezes	18
5.4.4. Hemoculturas	20
5.4.5. Exsudados	21
5.4.6. Líquidos diversos	22
5.4.7. BÍlis	23
5.4.8. Biópsias	23
5.4.9. Cateter	24
5.5. Dados estatísticos relativos ao Setor de Bacteriologia	25
6. Micobacteriologia	26
7. Biologia Molecular	30
7.1. Extração de ácidos nucleicos.....	31
7.1.1. QIAcube	31
7.1.2. EZ1® Advanced XL	32

7.1.3.	eMAG®	32
7.2.	Amplificação de ácidos nucleicos	33
7.2.1.	PCR	33
7.2.2.	qPCR	34
7.3.	Extração + Amplificação de ácidos nucleicos.....	36
	Gene XPERT®	36
	FilmArray® EZ Configuration	36
	FilmArray® SYSTEMS Torch	37
	Cobas® 4800 System	37
7.4.	Sequenciação de ácidos nucleicos.....	38
	3130 Genetic Analyser	38
7.5.	Imunoensaios.....	38
	Cobas® Elecsys 6000	38
	AutoLipa 48	38
	DS2® Automated ELISA System	39
7.6.	Dados estatísticos relativamente ao Setor de Biologia Molecular	40
8.	Serologia	41
8.1.	Metodologias Manuais	42
8.1.1.	Rapid Plasma Reagin	42
8.1.2.	Treponema Passive Particle Agglutination	44
8.1.3.	Fluorescent Treponema Antibody Absorption Test	45
8.1.4.	Rosa de Bengala	46
8.1.5.	Reação de Wright	47
8.1.6.	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Legionella pneumophila</i>	48
8.2.	Metodologias Automatizadas	49
8.2.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	49
8.2.2.	Enzyme Linked Fluorescent Assay	50
8.2.3.	Chemiluminescence Immuno Assay	52
8.2.4.	Indirect Immunofluorescence	56
8.3.	Dados estatísticos relativos ao Setor de Serologia	57
9.	Conclusão	58
10.	Referências Bibliográficas	59

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas

- DNA – (Ácido Desoxirribonucleico);
- RNA – (Ácido Ribonucleico);
- BCSA – *Burkholderia cepacia* Agar;
- BHI – Brain Heart Infusion Broth (Caldo de Infusão Coração Cérebro);
- cDNA – (Ácido Desoxirribonucleico complementar);
- CAM – *Campylobacter* spp. Agar;
- CBGN – Caldo Bacillus de Gram Negativos;
- CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra;
- CLED – Cystine Lactose Electrolyte Deficient (Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos);
- CLIA – Chemiluminescence Immuno Assay (Imunoensaio quimioluminescente);
- CM – Cooked Meat;
- CMI – Concentração Mínima Inibitória;
- CMIA – Chemiluminescent Microplate Immunoassay (Imunoensaio quimioluminescente em microplaca);
- CMV – Citomegalovírus;
- CNA – Colistin and Nadilixic Acid (Colistina e Ácido Nadilixico);
- COS – Columbia Agar com 5% de Sangue de Ovelha;
- EBNA – Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (Antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr);
- EBV – Epstein-Barr Virus (Vírus Epstein-Barr);
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetracético);
- ELFA – Enzyme Linked Fluorescent Assay;
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay;
- FTA-abs – Fluorescent Treponemal Antibody absorption;
- HAE 2 – Haemophilus Chocolate 2 agar;
- HAV– Hepatitis A Virus (Vírus da Hepatite A);
- HBV – Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B);
- HCV – Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C);
- HSV-1 – Herpes Simplex Vírus type 1 (Herpes simplex tipo 1);
- HSV-2 – Herpes Simplex Vírus type 2 (Herpes simplex tipo 2);
- HEKT – Hektoen Enteric Agar;
- HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana);
- HK – HK Columbia 5%;
- KV – Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar with 5% Sheep Blood;

- IA – Índice de Avidéz;
- IFI – Imunofluorescência Indireta;
- IFN- γ – Interferon- γ ;
- Ig – Imunoglobulina;
- LCR – Líquido Cefalorraquidiano;
- MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight;
- MHE – Muller Hinton E agar 90 mm;
- MHF – Muller Hinton agar 5% horse blood + 20 mg/L β -NAD;
- NE – Meio para Anaeróbios Não Esporulados;
- OLA – Olympus Laboratory Automation (Automação Laboratorial da Olympus);
- PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase);
- PVX – PolyVitex Chocolate Agar;
- qPCR – Real Time Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real);
- RPR – Rapid Plasm Reagin;
- RSV – Respiratory Syncytial Virus (Vírus sincicial respiratório);
- RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa);
- SMAC – Sorbitol MacConkey Agar;
- SS – Meio para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.;
- TOXO – *Toxoplasma* spp.;
- TPHA – *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay (Ensaio de hemaglutinação de *Treponema pallidum*);
- TPPA – *Treponema pallidum* Particle Agglutination Assay (Ensaio de aglutinação de partículas *Treponema pallidum*);
- TSA – Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos;
- URL – Unidades Relativas de Luz;
- UV – Ultra Violeta;
- VZV – Varicella Zoster Virus (Vírus Varicela-zóster);
- YER – Yersinia CIN Agar.

Índice de Figuras

Figura 1: Equipamento BACT/ALERT® 3D.....	10
Figura 2: No fundo do frasco apresentam-se sensores de emulsão líquida que permitem a alteração de cor a detetar pelo equipamento.	10
Figura 3: Diferença entre hemocultura negativa e hemocultura positiva com alteração de cor do fundo do frasco.....	10
Figura 4: Painel do equipamento onde o número de culturas é visualizado. É possível verificar a existência de culturas positivas pela cor amarela de fundo.....	11
Figura 5: Câmara de anaerobiose.....	11
Figura 6: Lâmina com poços utilizada no equipamento VITEK® MS.....	12
Figura 7: Software que permite verificar em tempo real o resultado da amostra a ser analisada pelo equipamento VITEK® MS.....	12
Figura 8: Equipamento utilizado para TSA automatizado, VITEK® 2.	13
Figura 9: Identificação das cartas para TSA automatizado no equipamento VITEK® 2.	13
Figura 10: TSA manual com disco e E-test.....	14
Figura 11: Equipamento GeneXpert® XVI.	14
Figura 12: Procedimentos comuns para urinas. Adaptado de Fonseca et al., 2004.	15
Figura 13: Sementeira em meio COS com <i>E. coli</i> a partir do produto biológico urina.	16
Figura 14: Sementeira em meio COS com <i>Proteus mirabilis</i> a partir do produto biológico urina.	16
Figura 15: Sementeira em meio CLED com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> a partir do produto biológico urina.	16
Figura 16: Sementeira em meio CLED com <i>E. coli</i> a partir do produto biológico urina.....	16
Figura 17: Sementeiras em meio Uricult Trio com <i>E. coli</i> a partir do produto biológico urina.	16
Figura 18: Procedimentos comuns para produtos biológicos respiratórios do trato inferior. Adaptado de Fonseca et al., 2004.....	17
Figura 19: Sementeira em meio PVX com <i>E. coli</i> a partir da amostra biológica lavado brônquico.....	17
Figura 20: Sementeira em meio COS com <i>S. aureus</i> a partir da amostra biológica expetoração.	17
Figura 21: Sementeira em meio HAE com <i>Klebsiella aerogenes</i> a partir da amostra biológica expetoração.	18
Figura 22: Sementeira em meio CLED com <i>P. aeruginosa</i> a partir de amostra biológica expetoração.	18
Figura 23: Procedimentos comuns a realizar para produtos biológicos fecais. Adaptado de Fonseca et al., 2004.....	18
Figura 24: Sementeira em meio HEKT com <i>E. coli</i> a partir de produto biológico fecal.	19
Figura 25: Procedimentos comuns realizados para hemoculturas positivas. Adaptado de Fonseca et al., 2004.....	20
Figura 26: Sementeira em meio COS com <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>E. faecalis</i> a partir de hemocultura positiva.	20
Figura 27: Sementeira em meio CLED com <i>K. pneumoniae</i> a partir de hemocultura positiva. .	20
Figura 28: Sementeira em meio NE com <i>Fusobacterium</i> spp. a partir do produto biológico pus de abscesso.....	21
Figura 29: Sementeira em meio COS com <i>E. coli</i> e <i>Corynebacterium striatum</i> a partir do produto biológico exsudado de ferida cirúrgica.	21
Figura 30: Sementeira em meio PVX com <i>Paenibacillus macerans</i> a partir de uma gotado produto biológico LCR.	22

Figura 31: Sementeira em meio NE com <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Enterococcus avium</i> a partir do produto biológico bÍlis.	23
Figura 32: Procedimentos comuns realizados para identificação de microrganismos em cateteres. Adaptado de Fonseca et al., 2004.....	24
Figura 33: Sementeira em meio COS com <i>S. epidermidis</i> a partir do produto biológico ponta de cateter.	24
Figura 34: Número de isolados por produto biológico com o número de isolados mais frequentes, no ano de 2018.....	25
Figura 35: Procedimentos para a identificação de micobactÉrias e suas suscetibilidades a antibióticos. Adaptado de ECDC, 2018 e Stinson et al., 2014.....	26
Figura 36: LOW positivo.	27
Figura 37: Equipamento BACTEC™ MGIT™.	28
Figura 38: Equipamento BACTEC™ 9120 Blood Culture System.	28
Figura 39: Bandas do teste GenoType Mycobacterium CM que indicam as várias espécies presentes nas amostras, através da conjugação dos primers.....	29
Figura 40: Equipamento QIAcube.	31
Figura 41: Extrator EZ1® Advanced XL.....	32
Figura 42: Extrator eMAG®.....	33
Figura 43: Equipamento BioRad CFX96.....	34
Figura 44: Equipamentos 7300 Real-Time PCR System e 7500 Real-Time PCR System.	34
Figura 45: Equipamento Rotor-Gene Q®.....	35
Figura 46: Equipamento FilmArray® EZ Configuration.....	36
Figura 47: Equipamento Filmarray® SYSTEMS Torch.....	37
Figura 48: Número de alguns testes realizados no Setor de Biologia Molecular, no ano de 2018.	40
Figura 49: PrincÍpio do teste RPR. Adaptado de Bula informativa do kit.	43
Figura 50: RPR: Controlo positivo (+), controlo negativo (-) e amostras positivas (A, B e C)..	43
Figura 51: RPR: A amostra D apresenta o fenómeno de zona no primeiro poço, uma vez que a quantidade de aglutinação é menor que as seguintes diluições.....	43
Figura 52: Placa de TPPA e interpretação de resultados: Amostra A – Negativo; Amostra B – Positivo; Título de 640. Adaptado de Bula informativa do kit.....	44
Figura 53: PrincÍpio da metodologia de Imunofluorescência Indireta. Adaptado de Bula informativa do kit.....	45
Figura 54: FTA-abs de uma amostra positiva. Ampliação 10x100=1000X.....	45
Figura 55: Teste de Rosa de Bengala.....	46
Figura 56: Metodologia de Reação de Wright. Adaptado de Bula informativa do kit.....	47
Figura 57: Resultados da Reação de Wright: O título corresponde à concentração do último tubo a demonstrar aglutinação. Neste exemplo o título corresponde a 1/160. Adaptado de Bula informativa do kit.....	47
Figura 58: Representação de um poço da lâmina do teste <i>Legionella pneumophila</i> . Adaptado de Bula informativa do kit.	48
Figura 59: PrincÍpio de ELISA. Adaptado de Bulas informativas dos kit's a utilizar no equipamento Analyser.....	49
Figura 60: Equipamento Analyser I.	49
Figura 61: Tiras de ELISA utilizadas no aparelho Analyser I.	49
Figura 62: PrincÍpio do método ELFA no equipamento VIDAS. Adaptado de Manual informativo do equipamento.	50
Figura 63: Equipamento VIDAS.....	51
Figura 64: Barretes a utilizar no equipamento VIDAS.	51

Figura 65: Monotestes do VirClia®	52
Figura 66: Equipamento VirClia®	52
Figura 67: Princípio da metodologia usada pelo equipamento VirClia®. Adaptado de Bula informativa do kit.	53
Figura 68: Equipamento Liason® XL.....	54
Figura 69: Princípio de uma das metodologias utilizada no Liason® XL. Adaptado de Bula informativa do kit.	54
Figura 70: Princípio de uma das reações da metodologia utilizada no Liason® XL. Adaptado de Bula informativa do kit.	55
Figura 71: Equipamento ARCHITECT plus.....	55
Figura 72: Lâminas para corar no equipamento MAGO Plus®.....	56
Figura 73: Equipamento MAGO Plus®.....	56

Índice de Tabelas

Tabela 1: Desenho de placa com as diferentes diluições e soluções para o teste TPPA. Adaptado da Bula informativa do kit.....	44
Tabela 2: Quadro de intensidades de fluorescência para obtenção de resultados em forma de Título. Adaptado da Bula informativa do kit.....	48
Tabela 3: Interpretação de resultados segundo avidéz de IgG. Adaptado de Bobić, 2009 e Prince e Lapé-Nixon, 2014.....	51
Tabela 4: Quantidade de alguns testes realizados no Setor de Serologia, no ano de 2018.	57

Todas as figuras e tabelas são da autoria do responsável pela redação deste documento.

1. Introdução

No âmbito do Mestrado em Microbiologia lecionado no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro foi realizado um estágio de 17 de Setembro de 2018 a 17 de Março de 2019 no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e este presente relatório, realizados segundo as diretivas de avaliação da Unidade Curricular Dissertação/Projeto/Estágio.

Este serviço contém variadas valências, sendo a Microbiologia Clínica a área em que foi realizado o estágio curricular, mais especificamente nos Setores de Bacteriologia, Micobacteriologia, Biologia Molecular e Serologia. O Serviço de Patologia Clínica do CHUC reúne uma vasta quantidade de técnicas laboratoriais e equipamentos modernos e automatizados, que fazem dele o local de excelência para adquirir novos conhecimentos e consolidar outros adquiridos.

Este estágio teve como principal objetivo a aplicação prática dos conhecimentos teóricos obtidos no primeiro ano do curso de Mestrado, mas também a compreensão da gestão dos laboratórios através da integração nas equipas técnicas e realização de tarefas proporcionadas por estas.

O presente trabalho aborda algumas das metodologias aplicadas e equipamentos utilizados em cada setor onde foi realizado o estágio.

Os testes realizados nos Setores são utilizados com o objetivo de identificar os microrganismos infecciosos responsáveis pela doença e suas resistências, bem como avaliar a imunidade do doente, de modo a monitorizar e travar a infeção.

2. Caracterização do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

O estágio do mestrado em Microbiologia foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do CHUC, que tem como diretor o Doutor Fernando Rodrigues.

O Serviço de Patologia Clínica tem como objetivo complementar e facilitar o diagnóstico clínico, permitindo assim uma melhor adequação do tratamento e prevenção.

Este serviço é constituído por salas de colheita, laboratório de urgência, zona de receção de amostras, salas administrativas, salas de validação, zona de lavagem e laboratórios de Microbiologia, Micobacteriologia, Imunologia, Serologia, Biologia Molecular, Hematologia e Bioquímica.

Para além das amostras internas, o Serviço de Patologia Clínica, também tem a capacidade de receber amostras provenientes de outras unidades de saúde.

No Serviço de Patologia Clínica é utilizado um sistema integrado de gestão laboratorial denominado de CliniData-MaxData (Maxdata Software S.A., Carregado, Portugal), onde se encontram identificadas todas as amostras e respetivas análises a realizar com o historial do doente. Este sistema permite um rápido e fácil acesso ao histórico de um doente, bem como às listas de análises a realizar, permitindo assim uma melhor validação de resultados e uma melhor organização no funcionamento do laboratório, respetivamente.

O estágio curricular foi realizado no Setor de Biologia Molecular localizado no Hospital Pediátrico de Coimbra localizado na Avenida Bissaya Barreto em Santo António dos Olivais, Coimbra e nos Setores de Serologia e Microbiologia situados no Edifício São Jerónimo localizado na Praceta Professor Mota Pinto, Coimbra.

3. Diagnóstico e Controlo: Cultura, Observação e Detecção

3.1 Métodos Clássicos

Os métodos clássicos da Microbiologia compreendem principalmente a cultura e a realização de esfregaço em lâminas para coloração.

No laboratório são realizados esfregaços em lâminas para coloração segundo as metodologias de Gram ou de Ziehl-Neelsen, segundo o produto biológico, para serem observadas no dia de chegada destes mesmos.

Os meios quando semeados são colocados a incubar em estufas com temperatura e atmosfera apropriadas para o crescimento dos microrganismos. Após a sementeira são realizados conjuntos para incubar, que deverão ser posteriormente observados em primeiro lugar, devido à sua urgência e importância como é o caso do conjunto dos pediátricos, queimados, transplantados hepáticos e urgência. Os restantes são distribuídos segundo a amostra biológica como é o caso das hemoculturas, urinas, líquidos e outros.

A observação das sementeiras é realizada diariamente na manhã seguinte, começando sempre pelas placas de pacientes urgentes. Em simultâneo são também observados Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA) importantes para um tratamento rápido no combate a infeções.

Aquando das observações são analisadas a diversidade microbiana, a morfologia dos microrganismos presentes, o odor, o tipo de disseminação, alterações de cor do meio e das colónias e a presença de halos de inibição em caso de TSA.

3.2 Métodos Moleculares Diretos

Após validação dos resultados observados nas placas é sempre realizada a identificação dos microrganismos presentes na placa que foram considerados relevantes para a infeção.

Todos os microrganismos contêm ácidos nucleicos diferentes e específicos, que podem ser Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e/ou Ácido Ribonucleico (RNA), mas também um conjunto distinto de proteínas, que os permite distinguir.

Atualmente são utilizados equipamentos baseados em metodologias moleculares, que comparam sequências de ácidos nucleicos e espectros de proteínas, para permitir realizar, sempre que possível, uma identificação objetiva.

3.3 Métodos Moleculares Indiretos:

Os métodos moleculares indiretos consistem na deteção de moléculas pertencentes ao sistema imunitário, como as Imunoglobulinas (Ig) e reagentes, e às suas interações.

Aos detritos libertados pelas células e aos corpos estranhos ao organismo dá-se o nome de antigénios (Owen *et al*, 2013). Quando as células se danificam e libertam os detritos no meio extracelular, os anticorpos não específicos, como é o caso das reagentes, ligam-se para uma melhor

fagocitose por parte dos macrófagos (Gordon, 2016; Wynn and Vannella, 2016). Assim os linfócitos T migram até aos gânglios linfáticos para apresentar o antígeno aos linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos e em células memória (Owen *et al.*, 2013). Os plasmócitos começam imediatamente a produzir anticorpos específicos, glicoproteínas, para o meio extracelular (Kurosaki *et al.*, 2015). Os anticorpos específicos ligam-se aos antígenos com o objetivo de os imobilizar e sinalizar para posterior eliminação. Estes anticorpos são classificados em Ig como, IgG, IgD, IgE, IgA e IgM (Altshuler *et al.*, 2010).

No Setor de Serologia os anticorpos específicos a serem avaliados são as IgM, IgG e IgA, e ainda a avididade das IgG, isto é, a medição das forças entre os anticorpos IgG presentes na amostra e os antígenos correspondentes. As IgM são as primeiras a serem produzidas após a infeção e apenas perduram por uma semana, por isso quando são detetadas pode significar que o doente tem presente uma infeção ativa (Kurosaki *et al.*, 2015, Owen *et al.*, 2013). As IgA estão normalmente presentes abundantemente nos tecidos mucosos, intestinos, lágrimas e saliva e promovem o processo anti-inflamatório aquando da infeção (Mason, 2008). Por fim, as IgG são as imunoglobulinas que aparecem em último lugar e que após a infeção podem-se prolongar, dando imunidade ao paciente, diminuir, dando apenas alguma proteção em caso de reinfeção, ou desaparecer. Quando um paciente apresenta positividade para esta IgG mas não para a IgM significa que o paciente já teve contacto prévio com o antígeno em questão, mas sendo que a infeção não foi recente (Kurosaki *et al.*, 2015).

Para avaliar o estado de imunidade de um doente são necessárias pelo menos duas amostras em diferentes períodos de tempo, uma vez que apenas com uma amostra não é possível verificar a evolução da possível infeção.

Se aquando da gravidez existir uma infeção e a grávida não apresentar imunidade, existe um aumento da probabilidade de a criança vir a desenvolver graves problemas. Assim, no caso das grávidas é indispensável a verificação e controlo da imunidade e infeções. Também o controlo após a gravidez é importante uma vez que os anticorpos maternos se podem transferir para a criança, principalmente as IgG (Rojas-Torres *et al.*, 2014). Para os imunossuprimidos, os imunossuppressores podem interferir em muito os resultados, por isso é também importante estar sempre atento a variações drásticas (McShane *et al.*, 2016).

4. Microbiologia

A Microbiologia engloba vários setores como o Setor de Micobactérias, o de Bacteriologia, o de Micologia e o de Parasitologia. A Doutora Catarina Chaves é a responsável pelo laboratório de Bacteriologia. Neste relatório apenas serão abordados os laboratórios de Bacteriologia e Micobacteriologia.

No laboratório de Microbiologia são utilizadas tanto técnicas clássicas como técnicas automatizadas, que permitem, sempre que possível, um diagnóstico rápido, claro e exato.

5. Bacteriologia

Este setor tem como principal função identificar as possíveis bactérias responsáveis pela doença no paciente, permitindo assim ajudar no diagnóstico e monitorização, mas também no tratamento através da deteção de possíveis resistências a antibióticos.

As metodologias consistem inicialmente na realização de sementeiras e enriquecimentos em diferentes tipos de meios, mas também na realização de testes moleculares requisitados pelo clínico e que dependem do tipo de produto biológico.

As culturas primárias compreendem todas as sementeiras efetuadas a partir de uma amostra biológica, enquanto que as repicagens compreendem todas as sementeiras realizadas a partir de colónias das culturas primárias.

Neste setor utilizam-se maioritariamente as recomendações publicada pelo European Committee on antimicrobial susceptibility testing (European Committee on antimicrobial susceptibility testing, 2019) e as recomendações publicadas pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Fonseca *et al.*, 2004).

5.1. Meios de cultura:

- Columbia Agar com 5% de Sangue de Ovelha (COS) (OXOID Ltd., Cheshire, Inglaterra)

Este meio é geralmente utilizado como meio de isolamento primário uma vez que tem como objetivo permitir o crescimento universal de microrganismos. Este meio não contém glicose, o que permite distinguir microrganismos capazes de hemólise e não capazes. A hemólise é caracterizada pela destruição das hemácias, que provoca uma alteração de cor no meio (Murray *et al.*, 2007; OXOID, 2009).

- Cystine Lactose Electrolytes Deficient Agar (CLED) (Frilabo Lda., Porto, Portugal)

Este meio é caracterizado pela presença de cistina, lactose e pela ausência de eletrólitos. A presença de cistina permite o crescimento de microrganismos dependentes de cistina, nomeadamente as bactérias coliformes. A lactose é utilizada com o intuito de distinguir bactérias fermentadores de lactose e não fermentadoras. Por fim a ausência de eletrólitos minimiza o “swarming”, isto é a proliferação e movimento de espécies de *Proteus* spp. Este meio contém ainda azul de bromotimol que serve como indicador de pH. Aquando da presença de microrganismos fermentadores da lactose, o pH do meio diminui. Esta reação gera uma alteração visível macroscopicamente através da alteração de coloração do meio de azul para amarelo (Fonseca *et al.*, 2004).

- Chocolate Agar PolyViteX (PVX) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Este meio contém sangue hemolisado e PolyViteX. A hemólise do sangue presente no meio permite a libertação de fatores de crescimento como o factor X (hemina) enquanto que, o PolyViteX fornece o fator V (NAD), que possibilitam a proliferação de *Haemophilus* spp. Este meio destina-se principalmente aos *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus pneumoniae* (bioMérieux, 2019c; Murray *et al.*, 2007).

- Haemophilus Chocolate 2 agar (HAE 2) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Como o próprio nome indica, este meio é próprio para o crescimento de *Haemophilus* spp. O meio HAE consiste numa gelose de chocolate, mais especificamente, um PVX com antibióticos. Por ser específico, é maioritariamente utilizado para amostras que contenham elevada diversidade microbiana, como são exemplos as expetorações (bioMérieux, 2019d).

- Columbia CNA Agar (Colistin and nalidixic acid - CNA) (OXOID Ltd., Cheshire, Inglaterra)

Meio de COS melhorado e seletivo para microrganismos de Gram-positivo, nomeadamente para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Este meio contém colistina e ácido nalidixico que inibem microrganismos de Gram-negativo (Murray *et al.*, 2007; OXOID, 2019b).

- HK Columbia 5% (HK) (BIOGERM S.A., Maia, Portugal)

Semelhante ao COS, no entanto, contém sangue de cavalo. Este meio é utilizado no laboratório para testar a suscetibilidade dos microrganismos anaeróbios a discos de antibiótico de netilmicina (BIOGERM, 2019; Murray *et al.*, 2007).

- Anaeróbios Não Esporulados (NE) (BIOGERM S.A., Maia, Portugal)

Meio HK Columbia 5% com suplementos para o isolamento de microrganismos anaeróbios não esporulados (Murray *et al.*, 2007).

- Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar with 5% Sheep Blood (KV) (Becton Dickinson and Company, New Jersey, U.S.)

Este meio é utilizado para o isolamento seletivo de bactérias de Gram-negativo anaeróbias, através do uso de kanamicina e vancomicina como agentes seletivos (Becton, Dickinson and Company, 2013; Murray *et al.*, 2007).

- Salmonella e Shigella (SS) (Frilabo Lda., Porto, Portugal)

Este meio seletivo é utilizado para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., através da inibição de microrganismos de Gram positivo e outras *Enterobacteriaceae* que não *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Murray *et al.*, 2007).

- Hektoen Enteric Agar (HEKT) (Frilabo Lda., Porto, Portugal)

Este meio tem também como objetivo o isolamento e diferenciação de bacilos enteropatogénicos de Gram negativos nomeadamente *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Os indicadores azul de bromotimol e fucsina são os que permitem a diferenciação macroscópica (Murray *et al.*, 2007).

- Campylobacter Agar (CAM) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Meio específico para isolamento de *Campylobacter jejuni* (bioMérieux, 2019b; Murray *et al.*, 2007).

- Yersinia CIN Agar (YER) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Meio seletivo para *Yersinia* spp., constituído por peptonas responsáveis pelos nutrientes, violeta de cristal e desoxicolato de sódio e ainda agentes antimicrobianos responsáveis pela inibição seletiva de microrganismos de Gram negativo e de Gram-positivo (bioMérieux, 2019g; Murray *et al.*, 2007).

- Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) (OXOID Ltd., Cheshire, Inglaterra)

Para as fezes das crianças é realizada uma sementeira em MacConkey parcialmente seletiva, a partir de uma cultura de *Escherichia coli* O157, para diferenciar e isolar diferentes serotipos desta estirpe (OXOID, 2019c; Murray *et al.*, 2007).

- *Burkholderia cepacia* (BCSA) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Este meio é constituído com o intuito de maximizar a proliferação da *B. cepacia*, uma vez que se pode tornar num microrganismo oportunista aquando casos clínicos como a fibrose cística, em que o sistema imunológico se encontra debilitado (LiPum, 2001). Nestes casos a monitorização deste microrganismo é essencial (bioMérieux, 2019a).

- Tryptone Soya Agar with Sheep Blood e Tryptic Soy Agar (OXOID Ltd., Cheshire, Inglaterra) (Frilabo Lda., Porto, Portugal)

Meios não seletivos utilizados como controlo dos TSA automatizados (Frilabo, 2019; OXOID, 2014).

- Mueller Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l β -NAD (MHF) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Para realizar os TSA manuais, são também necessários meios específicos que não reajam com os antibióticos a utilizar. Este meio é utilizado para testar a suscetibilidade de microrganismos fastidiosos, como por exemplo os *Haemophilus* spp. (bioMérieux, 2019e).

- Mueller Hinton E agar 90 mm (MHE) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

Para os microrganismos não fastidiosos utiliza-se este meio, sem sangue de cavalo, para realizar os TSA manuais. (bioMérieux, 2019f).

- Uricult Trio (Orion Diagnostica Ltd., Espoo, Finlândia)

Meio de cultura para infeções urinárias. Este tipo de sementeiras é normalmente aplicado a crianças para a deteção presuntiva de microrganismos. Este teste permite o crescimento simultâneo em meio CLED, SMAC e meio seletivo de *E. coli* (Orion, 2019).

5.2. Caldos de enriquecimento:

- Caldo Bacillus de Bactérias de Gram Negativo (CBGN) (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA)

Para a suspeita de bacilos de Gram negativo é utilizado o meio de enriquecimento não seletivo CBGN. É utilizado como meio de enriquecimento não seletivo para produtos biológicos como as fezes (Murray *et al.*, 2007).

- Brain Heart Infusion Broth (BHI) (OXOID Ltd., Cheshire, Inglaterra)

Este meio permite o crescimento geral de microrganismos. É utilizado frequentemente como meio de culturas primárias para produtos biológicos que necessitem de um primeiro enriquecimento para microrganismos como por exemplo, biópsias e cateteres. Tem como principais constituintes, infusão de cérebro-coração, peptonas e glucose (Becton, Dickinson and Company, 2009; OXOID, 2019a; Murray *et al.*, 2007).

- Cooked meat (CM) (BIOGERM S.A., Maia, Portugal)

Este meio é constituído por um caldo e por grânulos de carne cozida que tanto permitem o crescimento de microrganismos aeróbios no cimo do caldo como microrganismos anaeróbios no fundo do caldo junto aos grânulos de carne. Este meio é utilizado no laboratório principalmente como cultura primária de enriquecimento de biópsias e outros cujo seja importante a pesquisa de microrganismos anaeróbios (Becton, Dickinson and Company, 2009).

5.3. Equipamentos:

- BACT/ALERT[®] 3D (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

As hemoculturas são culturas de sangue em meio líquido que permitem o crescimento não seletivo de microrganismos (bioMérieux, 2016). Para as hemoculturas são utilizados frascos próprios para a utilização num equipamento denominado de BACT/ALERT[®] 3D (Figura 1).



Figura 1: Equipamento BACT/ALERT[®] 3D.

São utilizados três tipos de frascos de hemocultura, sendo que são utilizados para a pesquisa de aeróbios e anaeróbios facultativos em colheitas de adulto, aeróbio e anaeróbios facultativos em colheitas de criança e anaeróbios e facultativos (bioMérieux, 2018; Bulas informativas dos frascos de hemocultura).

Os frascos contêm sensores de emulsão líquida no fundo que reagem ao aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) e à diminuição de pH através de mudança de cor visível macroscopicamente (Figura 2 e 3). Este teste colorimétrico é frequentemente controlado e analisado pelo equipamento de modo a facilitar a deteção de hemoculturas positivas, isto é, hemoculturas onde tenha ocorrido um crescimento de microrganismos.



Figura 2: No fundo do frasco apresentam-se sensores de emulsão líquida que permitem a alteração de cor a detetar pelo equipamento.



Figura 3: Diferença entre hemocultura negativa e hemocultura positiva com alteração de cor do fundo do frasco.

O equipamento disponibiliza em tempo real o número de amostras que contém, o número de amostras que positivaram e as que se mantiveram sem reação. O equipamento também é capaz de demonstrar onde se encontram as amostras positivas e negativas a retirar, através de um painel demonstrado na Figura 4.

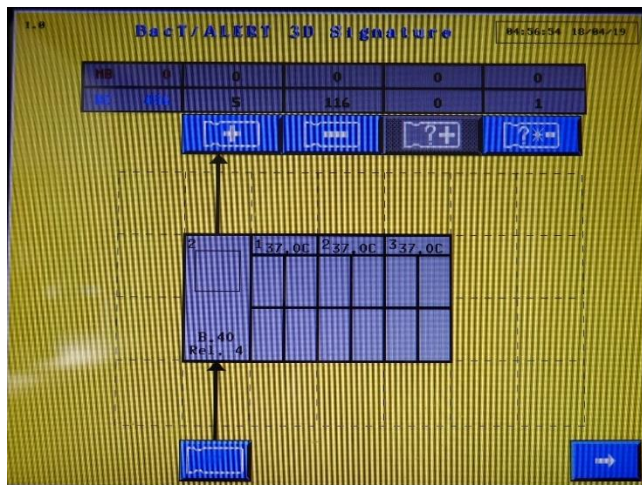


Figura 4: Painel do equipamento onde o número de culturas é visualizado. É possível verificar a existência de culturas positivas pela cor amarela de fundo.

- Whitley DG250 Workstation (Don Whitley Scientific Ltd., Bingley, Inglaterra)

Esta câmara de anaerobiose é utilizada para a incubação e manuseamento de sementeiras para a pesquisa de microrganismos anaeróbios (Figura 5). Dentro da câmara existem três gases. O CO₂ serve para criar atmosfera e o azoto é utilizado para preencher a câmara. No entanto é o hidrogénio que tem o papel fundamental de se ligar ao oxigénio e formar água, permitindo assim o ambiente de anaerobiose (Don Whitley Scientific Ltd., 2019).



Figura 5: Câmara de anaerobiose.

- VITEK® MS (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)

VITEK® MS é um equipamento de espectrometria de massa que utiliza a técnica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) com o objetivo de identificar microrganismos. Para esta técnica são utilizadas lâminas com poços a que se adicionam uma colónia, uma solução de lise e uma matriz (Figura 6).



Figura 6: Lâmina com poços utilizada no equipamento VITEK® MS.

A técnica MALDI-TOF consiste na ionização da amostra presente no poço da lâmina para que as moléculas migrem, com a adição de carga elétrica a partir do anel de eletrodos, até ao sensor. As moléculas durante a migração separam-se por tamanhos, permitindo assim ao software gerar um gráfico que representará o perfil proteico da espécie (Figura 7) (bioMérieux, 2018a).

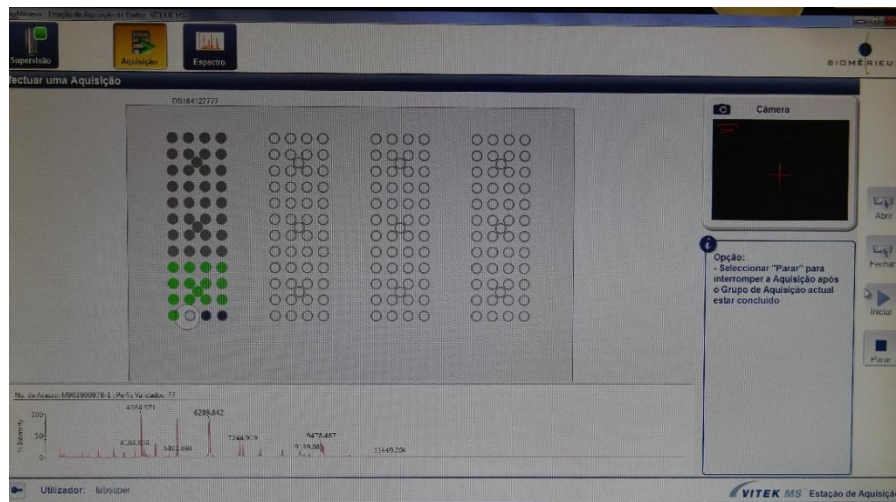


Figura 7: Software que permite verificar em tempo real o resultado da amostra a ser analisada pelo equipamento VITEK® MS.

- VITEK® 2 para TSA (VITEK TWO XL) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França)
Este equipamento permite para além da identificação, a realização de TSA (Figura 8).



Figura 8: Equipamento utilizado para TSA automatizado, VITEK® 2.

No laboratório este equipamento é maioritariamente utilizado para TSA, uma vez que a identificação se realiza no VITEK® MS. Para este equipamento são utilizadas cartas descartáveis que permitem a incubação de microrganismos sob diferentes concentrações e tipos de antibióticos e diferentes condições que permitem a identificação através do perfil fenotípico (Figura 9). No laboratório são utilizadas cartas para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., para bactérias de Gram negativo, para bactérias de Gram negativo multirresistentes e ainda cartas para pneumococos. Os resultados são monitorizados pelo aparelho através de turbidimetria. (bioMérieux, 2018b).



Figura 9: Identificação das cartas para TSA automatizado no equipamento VITEK® 2.

Quando os organismos são fastidiosos ou os antibióticos a testar não se encontram nos conjuntos das cartas, são realizados TSA's manuais. São vários os antibióticos utilizados para variados microrganismos, como é o caso dos *Streptococcus* β -hemolíticos e dos *Haemophilus* spp.

Para a realização de TSA's manuais são utilizados dois tipos de meios o MHF e o MHE. A sua utilização depende se o microrganismo a testar é fastidioso ou não. Para a realização de TSA's são utilizados antibióticos sob dois tipos de formas, disco ou tira E-teste. Os discos têm na

sua constituição uma concentração exata de antibiótico que inibe o crescimento de microrganismos em seu redor formando um halo. Por sua vez, as tiras do E-teste permitem a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), uma vez que contém diferentes concentrações do antibiótico ao longo da tira. Na Figura 10 pode verificar-se a utilização do disco de antibiótico e do E-teste para a realização de um TSA manual.

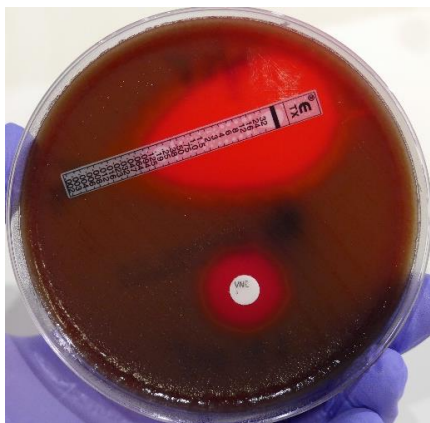


Figura 10: TSA manual com disco e E-test.

- GeneXpert[®] XVI (Cepheid, Califórnia, EUA)

Este equipamento (Figura 11) é baseado numa PCR em tempo real (qPCR), teste molecular que permite detetar e quantificar sequencias de ácidos nucleicos dos microrganismos em tempo real. Para o equipamento são utilizados kit's que contém já todos os reagentes necessários à reação. Cada kit é específico para cada microrganismo relevante. O trabalho manual consiste apenas na colocação da amostra no kit e a colocação do kit no equipamento, o que rentabiliza o tempo do clínico (Cepheid., 2014).

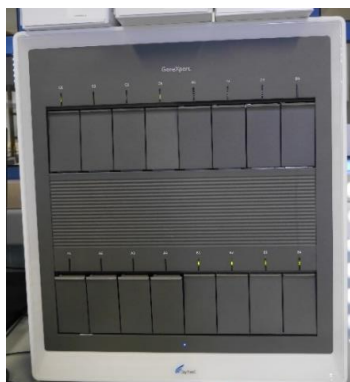


Figura 11: Equipamento GeneXpert[®] XVI.

No laboratório são utilizados vários kit's (*Streptococcus* do grupo B de Lancefield, toxinas de *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* e genes de resistência associados às carbapenemases em bactérias de Gram negativo).

5.4. Produtos Biológicos:

5.4.1. Urina

As infeções urinárias são uma das infeções mais frequentes para as quais são utilizados antibióticos. Devido à sua elevada sobreutilização, tem vindo a verificar-se um aumento de resistências aos antibióticos, por isso é importante um bom diagnóstico para um tratamento mais adequado (Hillier *et al.*, 2007; O’Neill, 2016; Schmiemann *et al.*, 2010). Os microrganismos mais comuns nas infeções urinárias são a *E. coli* seguida pela *Klebsiella pneumoniae* (Lee *et al.*, 2018). A *E. coli* é de grande importância uma vez que a causa do elevado número de infeções está relacionada com o facto de esta pertencer à microbiota intestinal humana (Lewis *et al.*, 2013).

Todo o produto biológico urinário a ser recolhido deve desprezar o primeiro jato e chegar ao laboratório em frascos que contenham ácido bórico, que permite a estabilização e conservação do produto biológico até ao seu processamento (Murray *et al.*, 2007). Ao chegar ao setor são realizadas culturas primárias e COS e CLED a partir dos frascos com ansas de 1 µL. Os procedimentos a realizar encontram-se na Figura 12 apresentada abaixo.

As culturas primárias podem obter três resultados diferentes: sem crescimento de microrganismos, crescimento de microrganismos relevantes e/ou predominantes e flora mista (3 ou mais microrganismos presentes). Apenas as sementeiras que apresentam crescimento de microrganismos relevantes e predominantes devem ser analisadas. As restantes são descartadas e é pedida nova amostra.

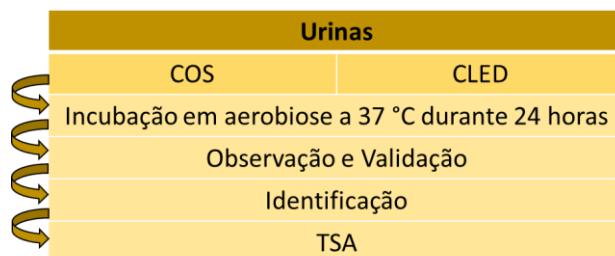


Figura 12: Procedimentos comuns para urinas. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004.

Abaixo nas Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 são apresentadas algumas colónias, obtidas a partir de urina, em variados meios de cultura.

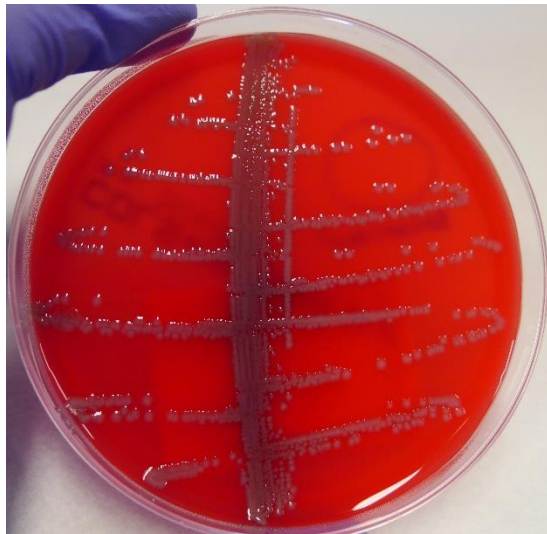


Figura 13: Sementeira em meio COS com *E. coli* a partir do produto biológico urina.

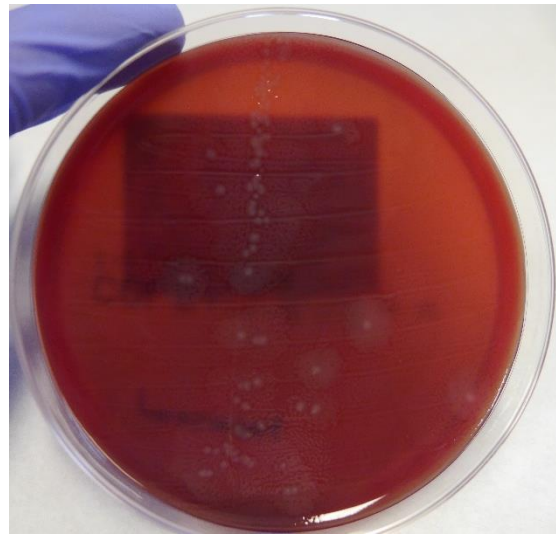


Figura 14: Sementeira em meio COS com *Proteus mirabilis* a partir do produto biológico urina.

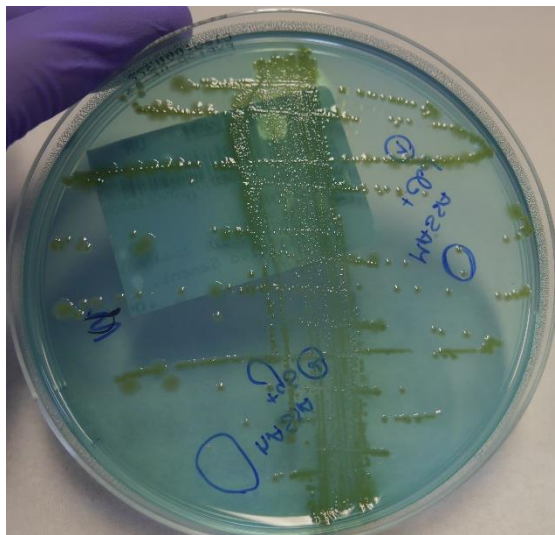


Figura 15: Sementeira em meio CLED com *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* a partir do produto biológico urina.

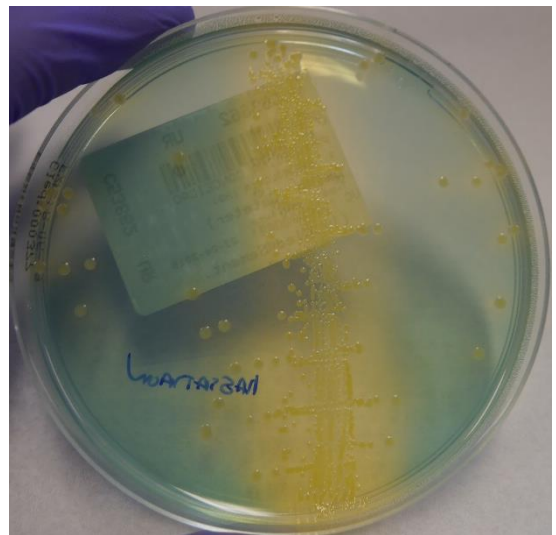


Figura 16: Sementeira em meio CLED com *E. coli* a partir do produto biológico urina.



Figura 17: Sementeiras em meio Uricult Trio com *E. coli* a partir do produto biológico urina.

5.4.2. Expetorações, Aspirados Brônquicos e Lavados Brônquicos

As infeções do trato respiratório inferior foram as segundas infeções mais prevalentes em Portugal em 2017. As principais bactérias que provocam infeções respiratórias da comunidade são os *S. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e ainda *Haemophilus influenzae* (PPCIRA, 2018).

Dos vários tipos de produtos biológicos respiratórios do trato inferior, foram maioritariamente avaliados as expetorações, os aspirados broncoalveolares e os lavados broncoalveolares. Abaixo na Figura 18 é apresentado o procedimento mais frequente para os produtos biológicos respiratórios que chegam ao laboratório.

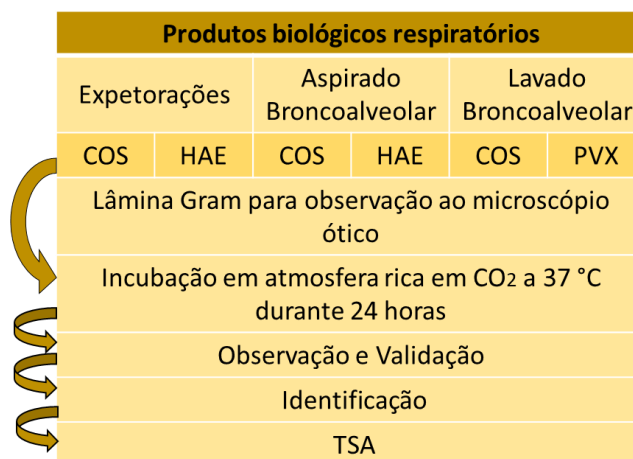


Figura 18: Procedimentos comuns para produtos biológicos respiratórios do trato inferior. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004.

Abaixo nas Figuras 19, 20, 21 e 22 são apresentadas algumas colónias obtidas a partir de produtos biológicos respiratórios com ansas de 10 µL.

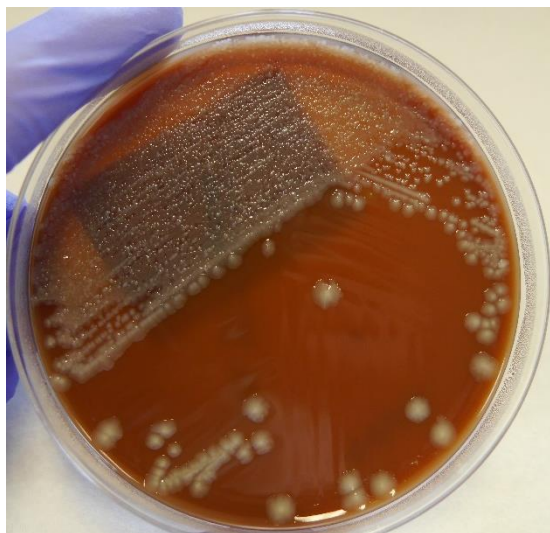


Figura 19: Sementeira em meio PVX com *E. coli* a partir da amostra biológica lavado brônquico.

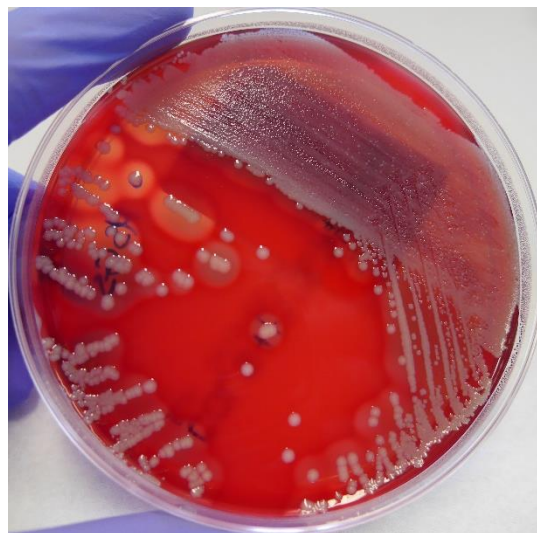


Figura 20: Sementeira em meio COS com *S. aureus* a partir da amostra biológica expetoração.

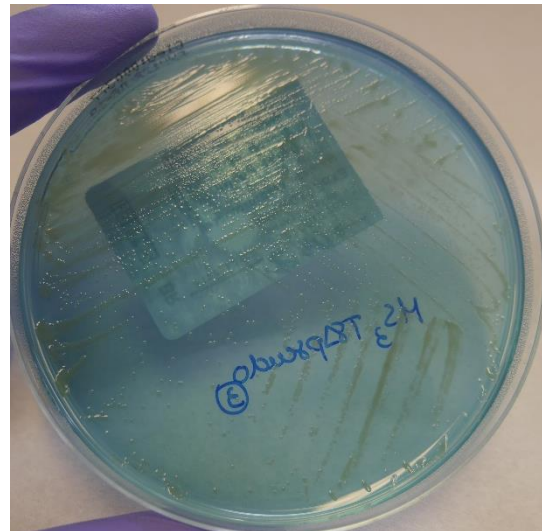


Figura 21: Sementeira em meio HAE com *Klebsiella aerogenes* a partir da amostra biológica expetoração.

Figura 22: Sementeira em meio CLED com *P. aeruginosa* a partir de amostra biológica expetoração.

5.4.3. Fezes

As fezes são um produto biológico com elevada diversidade bacteriana (Fraher *et al.*, 2012), por isso é necessário primeiro fazer um enriquecimento específico para o crescimento de bactérias que possam ser a causa da infeção. Para isso são utilizados vários meios seletivos que permitem o enriquecimento e crescimento de vários tipos de microrganismos.

Na Figura 23 é apresentado o fluxograma mais frequente para pesquisa de bactérias nas fezes.

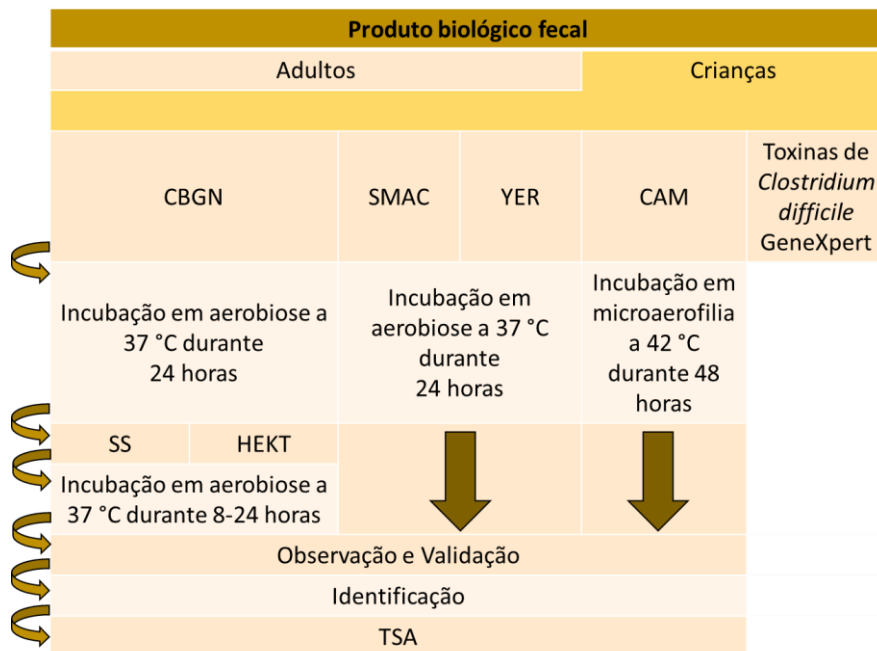


Figura 23: Procedimentos comuns a realizar para produtos biológicos fecais. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004.

Na Figura 24 é apresentado um exemplo de uma sementeira, realizada com uma ansa de 10 μ L, que teve como origem as fezes.

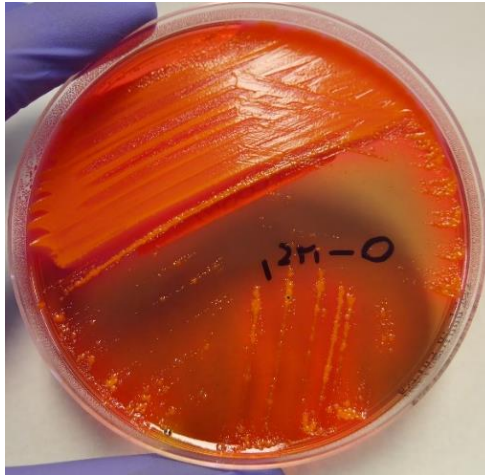


Figura 24: Sementeira em meio HEKT com *E. coli* a partir de produto biológico fecal.

5.4.4. Hemoculturas

As hemoculturas que o BACT/ALERT® 3D identifica como positivas (Página 10), ou seja com desenvolvimento de microrganismos, são sujeitas ao fluxograma apresentado abaixo na Figura 25.

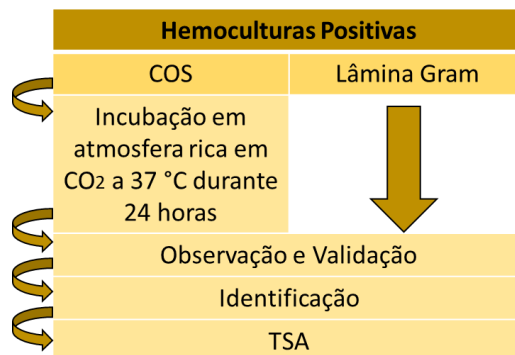


Figura 25: Procedimentos comuns realizados para hemoculturas positivas. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004.

Abaixo nas Figuras 26 e 27 são apresentadas algumas colónias, obtidas a partir do espalhamento de três gotas das hemoculturas.



Figura 26: Sementeira em meio COS com *Staphylococcus epidermidis* e *E. faecalis* a partir de hemocultura positiva.

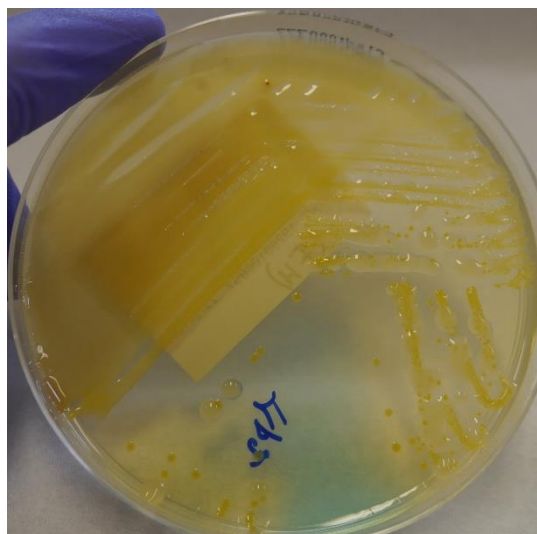


Figura 27: Sementeira em meio CLED com *K. pneumoniae* a partir de hemocultura positiva.

5.4.5.Exsudados

Os exsudados podem ser profundos ou superficiais, associados a feridas fechadas e a feridas abertas, respetivamente. Ambos devem ser extraídos por punção, aspiração ou, caso tal não seja possível por zaragatoas (Fonseca *et al.*, 2004).

Para os exsudados de feridas são normalmente realizadas culturas primárias em meio COS e realizados esfregaços para coloração pelo método de Gram.

Para os exsudados vaginais e retais são normalmente realizados testes no equipamento GeneXpert como por exemplo teste para pesquisa de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

Abaixo nas Figuras 28 e 29 são apresentadas algumas colónias realizadas a partir de zaragatoa ou gota dos exsudados.

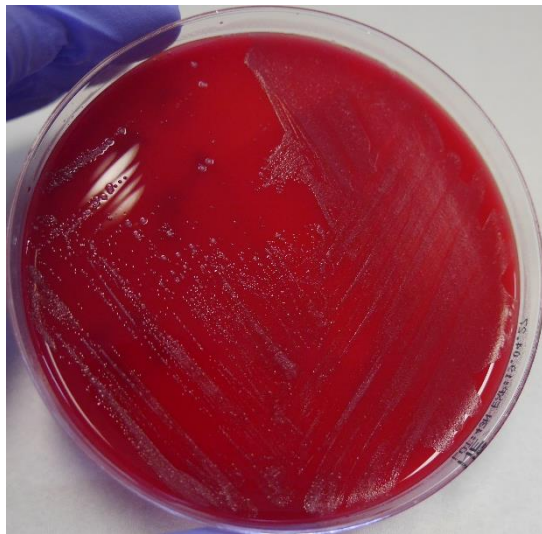


Figura 28: Sementeira em meio NE com *Fusobacterium* spp. a partir do produto biológico pus de abscesso.



Figura 29: Sementeira em meio COS com *E. coli* e *Corynebacterium striatum* a partir do produto biológico exsudado de ferida cirúrgica.

5.4.6. Líquidos diversos

Os produtos biológicos líquidos compreendem o líquido cefalorraquidiano (LCR), o líquido pleural, o líquido sinovial, o líquido peritoneal e ainda outros líquidos.

- LCR

No caso da bacteriologia é utilizado o sedimento resultante da centrifugação do LCR. A partir do sedimento realizam-se assim sementeiras em meio COS, BHI, PVX e coloração pelo método de Gram (Figura 30).

- Líquido Peritoneal

Líquido peritoneal deve ser semeado em CM, COS e deve ser feita uma lâmina para coloração pelo método de Gram. A sementeira em CM servirá como enriquecimento de anaeróbios para que se possa posteriormente fazer uma repicagem para os meios de anaerobiose (NE, HK e KV).

- Líquido Pleural e Sinovial

Para os líquidos pleural e sinovial, uma vez que são líquidos com menos flora microbiana, são necessários meios que permitam um melhor enriquecimento para o crescimento dos microrganismos por isso são ainda acrescentados o PVX e o BHI, relativamente ao líquido peritoneal.



Figura 30: Sementeira em meio PVX com *Paenibacillus macerans* a partir de uma gotado produto biológico LCR.

5.4.7. BÍLIS

Para a bÍlis são normalmente realizadas cinco sementeiras em meios de CNA, CLED e meio de anaerobiose (NE, HK e KV), que permitem isolar bactÉrias de Gram-positivo, de Gram-negativo e anaerÓbrios, respetivamente. Este método permite verificar um panorama geral de todos os microrganismos.

Abaixo, na Figura 31, estão representadas algumas colÓnias obtidas a partir de uma gota de bÍlis em meio NE.

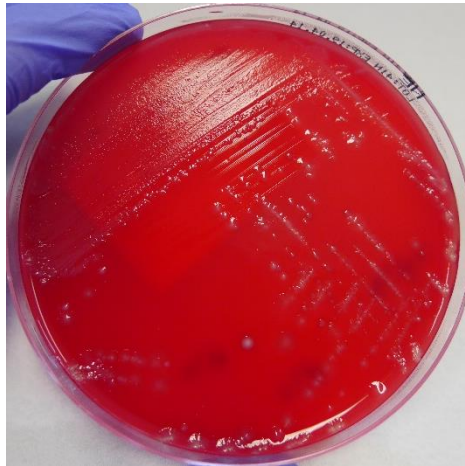


Figura 31: Sementeira em meio NE com *Clostridium perfringens* e *Enterococcus avium* a partir do produto biolÓgico bÍlis.

5.4.8. BiÓpsias

Para as biÓpsias são utilizados inicialmente dois meios de enriquecimento, o BHI e o CM que têm como objetivo permitir o crescimento não seletivo de microrganismos. O BHI utiliza-se em casos em que a amostra necessita de um enriquecimento mais intenso, por outro lado o CM permite um melhor crescimento de microrganismos anaerÓbrios. ApÓs o enriquecimento são então realizadas repicagens para identificao e TSA.

5.4.9. Cateter

Para este produto biológico são inicialmente utilizados os meios COS e BHI. O BHI utiliza-se apenas quando o cateter é de pequeno diâmetro, o que não permite a realização de uma sementeira ou quando o cateter é comprido, impedindo assim a realização de uma colonização giratória. Após o enriquecimento no meio BHI é realizada uma repicagem para meio COS (Figura 32) (Fonseca *et al.*, 2004).

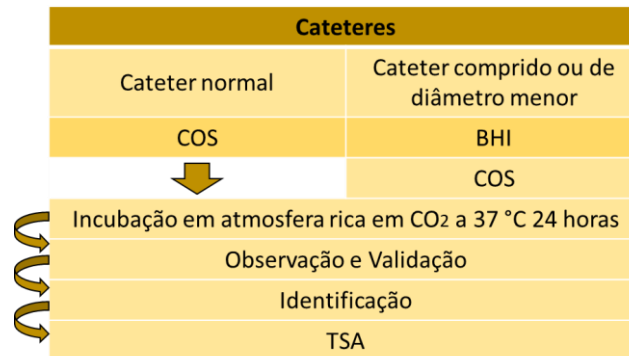


Figura 32: Procedimentos comuns realizados para identificação de microrganismos em cateteres.

Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004.

Abaixo na Figura 33 estão representadas colónias de *S. epidermidis*, o microrganismo mais detetado em 2018 em cateteres no CHUC.

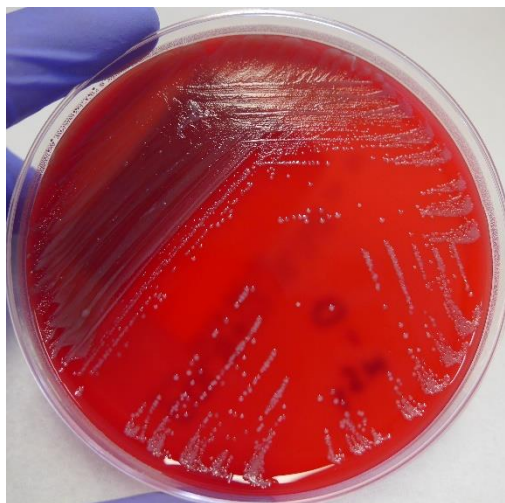


Figura 33: Sementeira em meio COS com *S. epidermidis* a partir do produto biológico ponta de cateter.

5.5. Dados estatísticos relativos ao Setor de Bacteriologia

Em 2018 foram detetados 23181 isolados de microrganismos relevantes. Os produtos biológicos predominante são as urinas e as hemoculturas, sendo a prevalência de infeções associada à *E.coli* e aos *Staphylococcus epidermidis*, respetivamente. No entanto os dois microrganismos mais prevalentes foram a *E.coli* e o *Staphylococcus aureus*. Abaixo na Figura 34 estão representados os isolados por produto biológico.

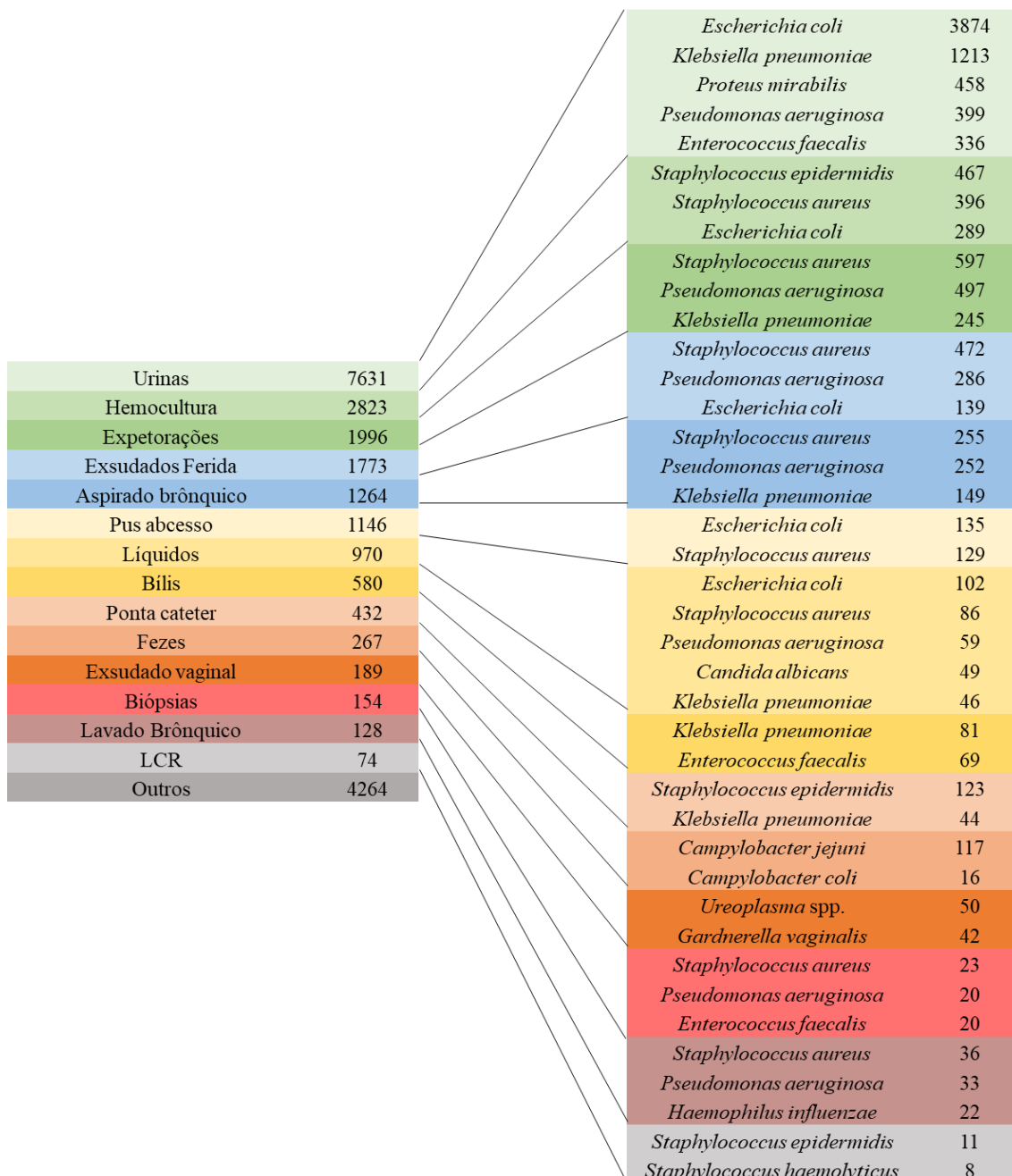


Figura 34: Número de isolados por produto biológico com o número de isolados mais freqüentes, no ano de 2018.

6. Micobacteriologia

Das micobactérias, a que causa mais preocupação atualmente é o *Mycobacterium tuberculosis* uma vez que é uma das doenças que mais mata no mundo (WHO, 2018). Algumas micobactérias são oportunistas podendo causar doença quando o organismo se encontra com o sistema imunitário deprimido, por esse motivo é importante detetar, identificar e tratar os casos de infeção por micobactérias (Wagner and Young, 2004). No laboratório são realizados exames moleculares diretos e exames culturais para identificação da micobactéria e das suas resistências. Na Figura 35 abaixo representa o fluxo de trabalho com os exames culturais.

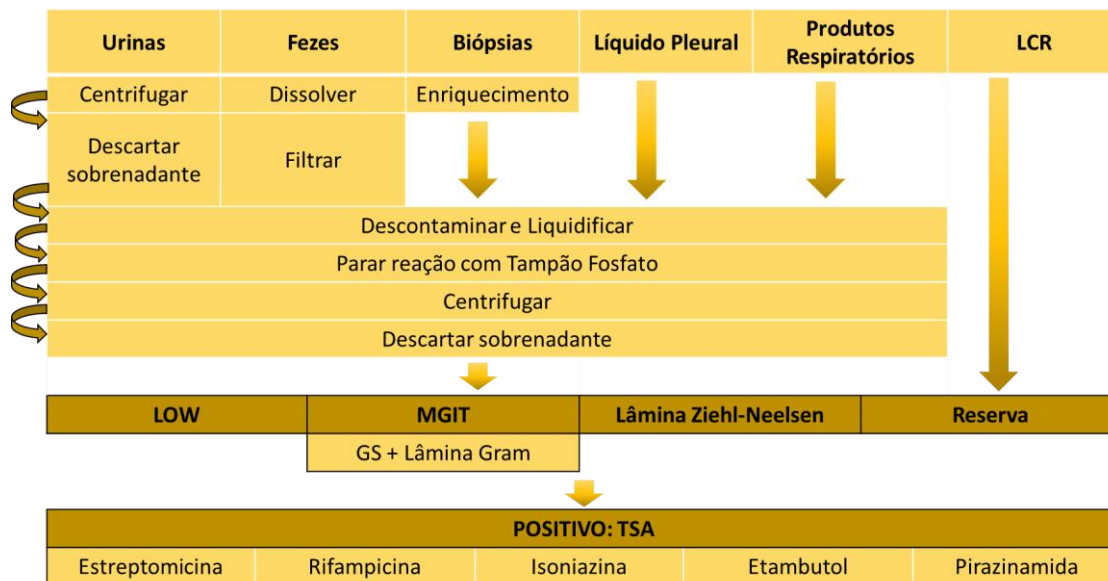


Figura 35: Procedimentos para a identificação de micobactérias e suas suscetibilidades a antibióticos.

Adaptado de ECDC, 2018 e Stinson *et al.*, 2014.

O exame direto para as micobactérias consiste na coloração de uma lâmina que é realizada a partir da amostra descontaminada com citrato de NaOH, isto é, ausente de outros microrganismos que dificultem a visualização de micobactérias. O método utilizado para a coloração é o Ziehl-Neelsen, que permite diferenciar os bacilos resistentes à descoloração dos não resistentes à descoloração. Essa diferenciação está diretamente ligada à presença de elevada concentração de lípidos presentes na parede celular, que apesar de permitirem a primeira coloração com fucsina, não permitem a descoloração pelo ácido clorídrico e álcool, não permitindo assim a segunda coloração com azul de metileno. Os resistentes à descoloração denominam-se ácido-álcool resistentes.

Lowenstein-Jensen é um meio utilizado para a cultura de micobactérias, com especial atenção para o *M. tuberculosis*. A sua análise é feita a nível macroscópico como é visível na Figura 36.



Figura 36: LOW positivo.

MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube e BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Tube (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA) são tubos com meio de cultura para o crescimento de micobactérias que são colocados a incubar no equipamento BACTEC™ MGIT™ 960 mycobacterial detection system (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA) (Figura 37) (Becton, Dickinson and Company, 2019). Este equipamento permite a deteção do crescimento de micobactérias através da leitura periódica de fluorescência.

O tubo de cultura contém agar de Middlebrook 7H9 e um composto fluorescente envolvido em silicone permeável e sensível ao oxigénio. Com o crescimento das micobactérias o oxigénio é consumido deixando de inibir a fluorescência. A cultura deve manter-se entre 4 a 13 dias a incubar. O equipamento deteta a fluorescência emitida frequentemente através da indução de fluorescência por uma Light Emitting Diode (LED) e deteção por um detetor de luz (Manual informativo do equipamento).

Em caso de positividade são realizadas uma sementeira em COS e uma lâmina para coloração Gram para verificar se a positividade se deve realmente à presença de micobactérias ou de outras bactérias.

Após verificar a presença de micobactérias são realizados ainda TSA's, também eles realizados neste equipamento. Estes testes de susceptibilidade são semi-quantitativos uma vez que comparam o crescimento do tubo de cultura com um outro tubo de cultura a que foi adicionado um antibiótico, com o intuito de permitir verificar a possibilidade de resistências a antibióticos, nomeadamente a estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol. BACTEC™ MGIT™ 960 PZA é o tipo de tubo que contém tal como o anterior agar de Middelbrook, no entanto contém o pH mais baixo. Este tubo é utilizado no TSA para o antibiótico pirazinamida, também utilizado no equipamento BACTEC™ MGIT™ 960 mycobacterial detection system.



Figura 37: Equipamento BACTEC™ MGIT™.

Por último, os frascos de Cultura BACTEC™ Myco/F Lytic são frascos de hemoculturas com meio líquido que permitem a pesquisa de micobactérias presentes no sangue. (Becton, Dickinson and Company, 2019a) Estes frascos são utilizados no aparelho BD Bactec™ 9120 Blood Culture System (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA) (Figura 38) (Becton, Dickinson and Company, 2019b). Este equipamento permite monitorizar a fluorescência a partir de um sensor de CO₂, presente no fundo do frasco de cultura (Manual informativo do equipamento). Quando estes se apresentam como positivos são realizados exames diretos e sementeiras em COS e uma lâmina para coloração pelo método de Gram.



Figura 38: Equipamento BACTEC™ 9120 Blood Culture System.

Para além de testes culturais são ainda realizados testes moleculares, a partir das reservas de amostra armazenadas, que consistem na deteção de DNA de modo a identificar o microrganismo causador da doença e as suas possíveis capacidades de desenvolver resistências.

GenoType MTBDR plus e GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) são os kit's mais utilizados no laboratório, que contêm todos os componentes necessários à amplificação e à hibridização dos ácidos nucleicos. Para este teste são utilizadas sondas que vão hibridizar com o DNA e permitir identificar o possível microrganismo e as possíveis mutações frequentes que possibilitam as resistências (Hain Lifescience, 2014, 2015). Na Figura 39 são demonstrados alguns resultados da hibridização com o teste GenoType Mycobacterium CM.

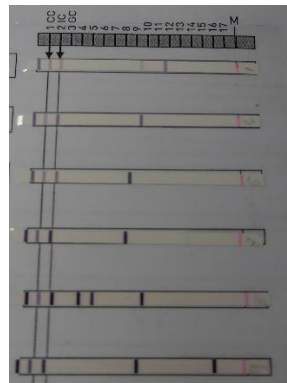


Figura 39: Bandas do teste GenoType Mycobacterium CM que indicam as várias espécies presentes nas amostras, através da conjugação dos primers.

7. Biologia Molecular

O Setor de Biologia Molecular é constituído por laboratórios e gabinetes de validação que estão sob responsabilidade da Doutora Henriqueta Pereira.

Este setor tem como objetivo realizar a pesquisa de moléculas, como ácidos nucleicos, anticorpos, entre outras associadas a infeções, através da análise molecular a produtos biológicos como soro, plasma, LCR, expetorações, lavados, líquido amniótico, urina, entre outros.

Os métodos utilizados são divididos em diretos e indiretos, que tem como alvo a pesquisa de microrganismos e a resposta do organismo a antigénios estranhos associados à infeção, respetivamente.

No setor, realizam-se frequentemente análises às cargas de Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis B Virus (HBV) e Hepatitis C Virus (HCV), aos marcadores e aos genótipos de microrganismos, através de dois principais métodos: imunoensaios e extração seguida de amplificação, deteção e sequenciação.

7.1. Extração de ácidos nucleicos

Todos os microrganismos contêm ácidos nucleicos que podem ser DNA e/ou RNA. A extração consiste em essencialmente quatro passos: lise celular, adesão, lavagem e eluição (Manual informativo do equipamento).

7.1.1. QIAcube

O equipamento QIAcube (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha) (Figura 41) permite a extração tanto de ácidos nucleicos como de proteínas de 12 amostras simultaneamente.

O equipamento utiliza um agitador orbital que, juntamente com reagente de lise, facilita a lise celular. Posteriormente o lisado é colocado numa coluna de spin onde os ácidos nucleicos e as proteínas se ligam à membrana de sílica ou à resina de purificação da coluna. O QIAcube tem incorporada uma microcentrifuga, que permite as lavagens e separação total de contaminantes dos alvos de extração. De seguida a coluna é transferida para um tubo para libertar os ácidos nucleicos e as proteínas com a ajuda da microcentrifugadora (Manual informativo do equipamento).



Figura 40: Equipamento QIAcube.

7.1.2.EZ1® Advanced XL

O equipamento EZ1® Advanced XL (EZ1) (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha) (Figura 42) permite a extração automatizada de ácidos nucleicos de 14 amostras por corrida. O EZ1 contém incorporado um local de inserção de cartões que indicam ao equipamento o protocolo de purificação a realizar.

O equipamento utiliza cartuchos de reagentes individuais que utilizam tecnologia de partículas magnéticas para imobilizar os ácidos nucleicos durante as lavagens (Manual informativo do equipamento).



Figura 41: Extrator EZ1® Advanced XL.

7.1.3.eMAG®

Este equipamento (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França) (Figura 43) é um extrator de ácidos nucleicos que utiliza partículas de sílica magnéticas que permitem a extração tanto de DNA como de RNA a partir de tubos de amostra primários. No Laboratório este equipamento é utilizado principalmente a partir de plasma, LCR e urina. O eMAG® tem a vantagem de conter duas zonas de trabalho independentes que permitem a execução de duas metodologias de extração em simultâneo. Este equipamento permite ainda a extração a partir de amostras muito pequenas (10 µL) através da colocação desta diretamente no descartável de reação (Bula informativa do equipamento).



Figura 42: Extrator eMAG®.

7.2. Amplificação de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são únicos para cada microrganismo, no entanto existem zonas conservadas que permitem agrupar os organismos. Para a amplificação de ácidos nucleicos é necessária a preparação da mastermix, isto é um conjunto de reagentes como polimerase, nucleótidos, primers, buffer e $MgCl_2$, para colocar nos tubos de reação da placa juntamente com a amostra. Nos testes os Controlos Negativos e Positivos são sempre obrigatórios no entanto, alguns testes utilizam Controlos Internos e Externos, utilizados para a validação da qualidade da amostra, processo de extração ou inibição da reação de PCR e para a validação do próprio teste, respetivamente. Para que o resultado do teste seja validado, todos os controlos devem corresponder ao desejado (Murray *et al.*, 2007).

7.2.1.PCR

O PCR é uma técnica *in vitro* que permite uma reação enzimática de amplificação de ácidos nucleicos.

- GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA)

Este equipamento permite a realização automatizada de PCR e possui já alguns programas de PCR pré-definidos, no entanto é possível realizar a sua alteração (Manual informativo do equipamento).

7.2.2.qPCR

qPCR é uma PCR que permite a deteção e quantificação em tempo real de sequências de ácidos nucleicos, através da produção de fluorescência.

- BioRad CFX96™ (CFX96) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA)

O equipamento CFX96 (Figura 44) permite a deteção e quantificação, por fluorescência, de até cinco alvos numa corrida com volumes de amostra a partir de 10 µL (Bula informativa do equipamento).



Figura 43: Equipamento BioRad CFX96.

- 7300 Real-Time PCR System e 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA)

Ambos os equipamentos (Figura 45) combinam ciclos térmicos com a aplicação específica e a deteção de fluorescência. Esta fluorescência é convertida e utilizada por um software que calcula a acumulação de produtos de PCR a cada ciclo. Os equipamentos utilizam uma lâmpada de halogénio para a fluorescência (Bulas informativas dos equipamentos).



Figura 44: Equipamentos 7300 Real-Time PCR System e 7500 Real-Time PCR System.

- Smart Cycler II (Cepheid Inc., Sunnyvale, EUA)

Este equipamento tem como objetivo a amplificação, detecção e quantificação de sequências de DNA e RNA. As reações de uma amostra são realizadas num tubo específico para os módulos independentes. O Smart Cycler II utiliza até quatro LED's e quatro detetores para quatro alvos em simultâneo. No laboratório este equipamento é utilizado para detecção de *Neisseria meningitidis* e *S. pneumoniae*, ADNV, Enterovírus, *Bordetella* spp., Influenza A e B, Respiratory Syncytial Virus (RSV), *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (Bula informativa do equipamento).

- Rotor-Gene Q®

No Laboratório o Rotor-Gene Q® (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha) (Figura 46) utiliza o qPCR para a amplificação, detecção e quantificação de ácidos nucleicos em tubos. Contém até seis canais de excitação para leitura de fluorescência. No laboratório é utilizado para a pesquisa de Vírus da Hepatite E, VZV, Parvovírus B19, 16S de *Leptospira* spp., Parechovirus e ainda a *Bordetella* spp. (Manual informativo do equipamento).



Figura 45: Equipamento Rotor-Gene Q®.

7.3. Extração + Amplificação de ácidos nucleicos

Gene XPERT®

A metodologia deste equipamento (Cepheid Inc., Sunnyvale, EUA) encontra-se descrito na Página 14. No laboratório é utilizado para a pesquisa do Vírus Influenza A e B, RSV, Enterovírus, *Streptococcus* spp., *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

FilmArray® EZ Configuration

Este equipamento (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França) (Figura 47) apenas permite utilizar amostras do trato respiratório, LCR e fezes com o objetivo de detetar os principais microrganismos responsáveis pelas doenças respiratórias, pelas meningites/encefalites e pelas gastroenterites. Este equipamento permite as reações de preparação, amplificação, deteção num painel de sistema fechado e interpretação dos seus resultados em aproximadamente uma hora (Manual informativo do equipamento).

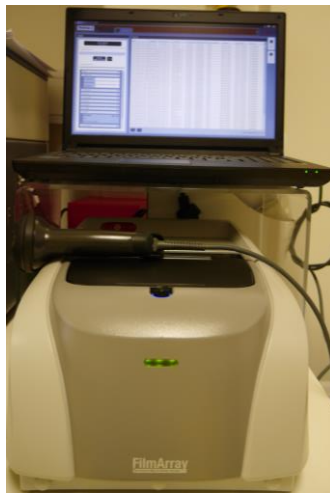


Figura 46: Equipamento FilmArray® EZ Configuration.

FilmArray® SYSTEMS Torch

O FilmArray® SYSTEMS Torch (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França) (Figura 48) apresenta-se de forma muito semelhante ao equipamento acima apresentado, no entanto permite com menos espaço a realização de vários testes em simultâneo com diferentes testes. Tal como FilmArray® EZ, também este necessita de bolsas fechadas que contenham todos os reagentes. Atualmente são apresentados vários kit's, no entanto os utilizados no laboratório são os kit's para respiratório, gastrointestinais e meningites/encefalites, que permitem identificar dezenas de microrganismos em simultâneo na mesma amostra, em aproximadamente uma hora (Manual do equipamento).



Figura 47: Equipamento Filmarray® SYSTEMS Torch.

Cobas® 4800 System

O Cobas® 4800 System (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça) é constituído por dois aparelhos, o cobas x 4800 e o cobas z 4800, responsáveis pela extração, deteção e quantificação de sequências de ácidos nucleicos virais, respetivamente. Este sistema é apenas utilizado no Laboratório de Biologia Molecular para a quantificação de HIV-1, HBV e HCV. Este equipamento permite a entrada de tubos de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) centrifugados, onde a amostra pipetada pelo equipamento é o plasma. Para a extração e purificação, os ácidos nucleicos aderem à superfície de sílica das partículas magnéticas de vidro para posteriores lavagens. Após a extração, os ácidos nucleicos são inseridos no equipamento cobas z 4800 para a realização de qPCR. Este teste é utilizado principalmente para a monitorização das terapias (Manual informativo do equipamento).

7.4. Sequenciação de ácidos nucleicos

3130 Genetic Analyser

Após a extração e amplificação dos ácidos nucleicos, estes podem ser sequenciados, totalmente ou parcialmente. Nos laboratórios de análises clínicas a sequenciação é direcionada para as zonas mais conservadas e conhecidas do material genético. O equipamento 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, EUA) permite a sequenciação de DNA através do método de Sanger. O 3130 Genetic Analyser, equipado com quatro capilares, realiza uma eletroforese capilar que permite uma análise precisa com quantidades mínimas de cDNA, comparativamente ao sistema de placas de gel.

No Laboratório de Biologia Molecular este equipamento é utilizado para a sequenciação de vírus de HIV-1. Sendo o HIV um vírus, cujo genoma é RNA, é necessário primeiramente converter o RNA para cDNA através de Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), para posterior amplificação por PCR e sequenciação.

Para o HIV-1 são utilizados sete primers que possibilitam o overlapping de sequências para o gene *pol*, para a sequenciação cíclica com didesoxinucleótidos (Manual informativo do equipamento).

7.5. Imunoensaios

Cobas® Elecsys 6000

Este sistema (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça) permite a junção de diferentes módulos para testes de química clínica e imunoquímica. No Laboratório de Biologia Molecular o sistema usado apenas contém o módulo cobas e 601, que permite realizar imunoensaios com uma tecnologia patenteada de eletroquimioluminescência a partir de produtos biológicos como plasma, soro e urina (Bula informativa do equipamento). Neste equipamento são realizados testes aos antígenos e anticorpos relativamente aos microrganismos HIV, HBV, HCV e Vírus da Hepatite A (HAV).

AutoLipa 48

O AutoLipa 48 (INNOGENETICS N.V., Gante, Bélgica) é utilizado no Laboratório de Biologia Molecular para testes de hibridização em tiras, para desenvolvimentos de cor, sujeitos a sistemas de homogeneização, incubação e arrefecimento. Este teste é utilizado para a genotipagem de HBV e HCV (Manual informativo do equipamento).

DS2® Automated ELISA System

No laboratório, o equipamento DS2® Automated ELISA System (DS2) (DYNEX Technologies, Chantilly, EUA) é utilizado para realizar um teste de diagnóstico *in vitro* para deteção de infeções por *M. tuberculosis*, no entanto, não distingue doença de infeção latente.

Para este equipamento são utilizados tubos de sangue específicos que contêm proteínas que induzem a produção de interferon- γ (IFN- γ) por parte dos linfócitos, em indivíduos infetados. Após a colheita de sangue, os tubos são incubados a 37 °C durante dezasseis horas para a produção de IFN- γ . Posteriormente, os tubos são centrifugados para separação do plasma, necessário para a deteção e quantificação do IFN- γ pelo DS2 através do ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha). Este ensaio é realizado no equipamento DS2 através da metodologia de ELISA. O equipamento realiza medições através de densidade ótica e o software realiza uma curva standard e converte os resultados em IU/mL para todas as amostras (Bula informativa do kit).

7.6. Dados estatísticos relativamente ao Setor de Biologia Molecular

Em 2018 foram realizados 56046 testes. O vírus para a qual são realizados mais testes é o HBV, no entanto o teste para quantificação de Ag/Ac de HIV 1/2 é o teste mais realizado no Setor de Serologia. Na Figura 49 estão presentes o número de alguns testes realizados no Setor de Biologia Molecular ao longo do ano de 2018.

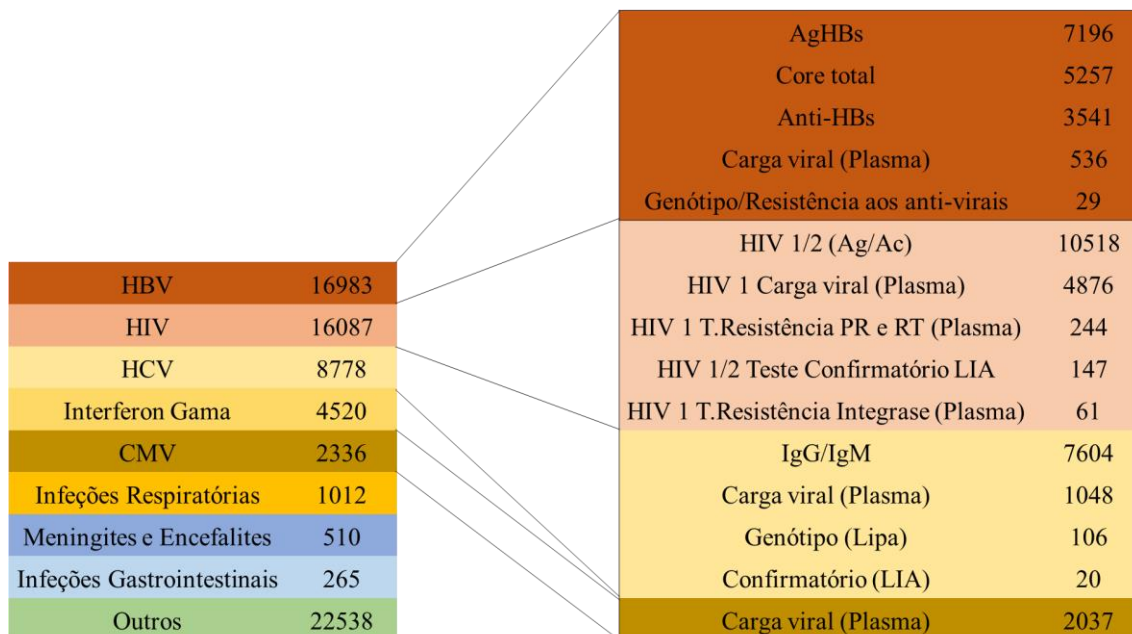


Figura 48: Número de alguns testes realizados no Setor de Biologia Molecular, no ano de 2018.

8. Serologia

O Setor de Serologia é constituído por uma sala de validação e pelo Laboratório de Serologia, sob chefia da Doutora Lucília Araújo, patologista clínica.

O Laboratório de Serologia tem como objetivo avaliar a imunidade do paciente, realizar o diagnóstico, monitorizar e identificar o agente infeccioso responsável pela doença, através da análise de produtos biológicos como o soro, plasma e o LCR.

As amostras chegam ao serviço com um código de barras que é lido pelo equipamento Olympus Laboratory Automation (OLA) (Olympus Corporation, Shinjuku, Japão) que separa as amostras segundo o setor e análises a efetuar.

A análise feita a estes produtos biológicos tem como principal objetivo a deteção de anticorpos, através da utilização de metodologias manuais e automatizadas. No Laboratório de Serologia são avaliados os anticorpos específicos IgM, IgG e IgA, e ainda a interação anticorpo-antígeno, como é o caso da avidéz das IgG. As várias metodologias para a deteção e monitorização dos anticorpos podem ser ainda classificadas em testes qualitativos, semi-quantitativos e quantitativos.

8.1. Metodologias Manuais

As metodologias manuais utilizadas no Laboratório de Serologia do CHUC são a aglutinação em cartão, aglutinação em placa, aglutinação em tubo e imunofluorescência indireta. Os testes utilizados são o Rapid Plasma Reagin (RPR) (BioSystems S.A., Barcelona, Espanha), Treponema Passive Particle Agglutination (TPPA) (Fujirebio Inc., Gotemburgo, Suécia), Fluorescent treponemal antibody absorption test (FTA-abs) (Alphadia S.A., Wavre, Bélgica), Rosa de Bengala (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França), Reação de Wright (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) e *Legionella pneumophila* (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha).

8.1.1. Rapid Plasma Reagin

Para o diagnóstico e controlo da doença sífilis, doença sistémica causada por *Treponema pallidum*, são realizados testes que são classificados em treponémicos e não treponémicos. Os testes que têm como objetivo a pesquisa de anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum*, denominam-se de Treponémicos. Os testes que têm como objetivo a pesquisa de anticorpos não específicos, reaginas, denominam-se de não Treponémicos (Ratnam, 2005).

Os testes não treponémicos, como o RPR, servem principalmente como monitorização de doentes durante o seu tratamento, reinfeções ou reativações, com o intuito de extrapolar quanto à evolução da infeção. O RPR é um teste utilizado para deteção de reaginas, indicadoras de infeção ativa, em amostras de soro e LCR (Alhabbab, 2018). As reaginas atuam contra antígenos lipoidais libertados por células hospedeiras danificadas ou pelo próprio *T. pallidum* (Smith and Holman, 2004).

O princípio do teste baseia-se na interação anticorpo-antígeno. À interação que ocorre entre as partículas de carvão ativado revestidas com cardiolipina, lecitina e colesterol e as reaginas, anticorpos não específicos, denomina-se de aglutinação (Lee *et al.*, 2014). Tal reação ocorre com detritos celulares e outros que contenham os mesmos três constituintes no sangue, o que pode levar a reações cruzadas e consequentemente a falsos positivos (Figura 50).

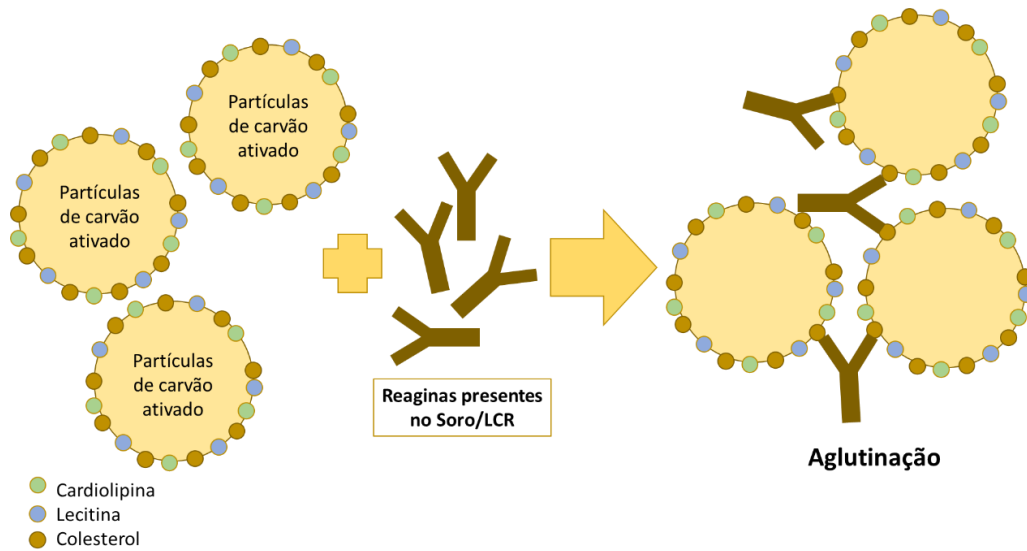


Figura 49: Princípio do teste RPR. Adaptado de Bula informativa do kit.

Inicialmente é realizada uma diluição sucessiva em cartão até à diluição de 1:2 das amostras de soro e LCR, para evitar a formação do fenómeno de zona. O fenómeno de zona é a existência de competição entre o possível excesso de anticorpos que impede a aglutinação, podendo assim resultar em falsos negativos (Figura 52) (Sidana *et al.*, 2011). O resultado positivo resulta numa aglutinação das partículas de carvão ativado, observada macroscopicamente (Figura 51). Um resultado negativo apresenta-se como uma mistura homogénea. O que limita o fim do teste é a negatividade do próprio teste, isto é, as diluições da amostra devem realizar-se até deixar de se observar aglutinação a olho nu. Este teste é semi-quantitativo uma vez que o resultado é dado sob forma de título, correspondente à última diluição positiva.

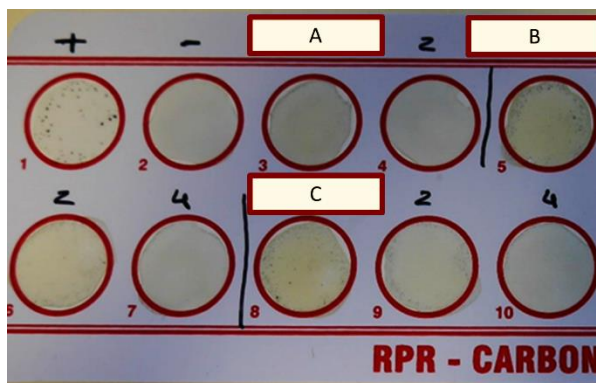


Figura 50: RPR: Controlo positivo (+), controlo negativo (-) e amostras positivas (A, B e C).

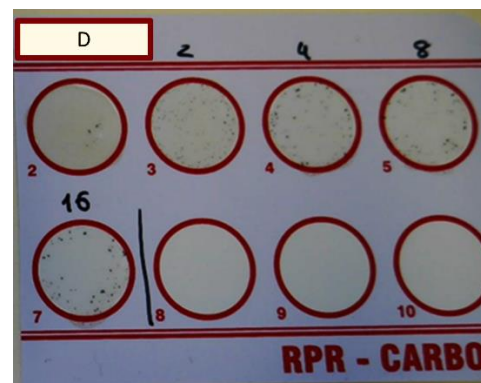


Figura 51: RPR: A amostra D apresenta o fenómeno de zona no primeiro poço, uma vez que a quantidade de aglutinação é menor que as seguintes diluições.

8.1.2. Treponema Passive Particle Agglutination

No Laboratório de Serologia, o TPPA é utilizado como segundo teste treponémico para confirmação de Sífilis.

Esta metodologia consiste na aglutinação em placa de partículas de gelatina sensibilizadas com o *T. pallidum* da estirpe Nicols, com os anticorpos totais (IgM, IgG e IgA) presentes na amostra (Hagedorn, 2011).

Para este teste são realizadas diluições sucessivas com o objetivo de permitir dar a resposta em forma de título, tornando-o semi-quantitativo. No teste TPPA as partículas não sensibilizadas são utilizadas como controlo negativo no poço correspondente à diluição de 1:40 da amostra. As partículas sensibilizadas devem-se adicionar nos restantes poços, a partir desta diluição. (Tabela 1)

Tabela 1: Desenho de placa com as diferentes diluições e soluções para o teste TPPA. Adaptado de Bula informativa do kit.

	Diluições		Controlo Negativo (com partículas não sensibilizadas)	Teste (com partículas sensibilizadas)					
	1:5	1:10		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Controlo ou amostra									

Quando se verifica uma aglutinação suspensa o poço é dado como positivo. Por outro lado, é dado como negativo quando todos os componentes depositam no fundo do poço. (Figura 53)

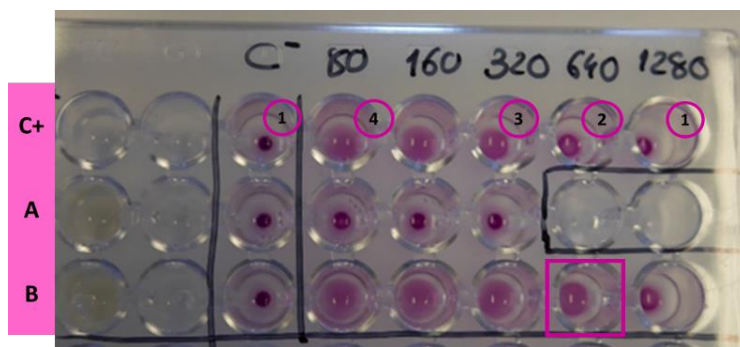


Figura 52: Placa de TPPA e interpretação de resultados: Amostra A – Negativo; Amostra B – Positivo: Título de 640. Adaptado de Bula informativa do kit.

(-): Partículas concentradas no centro.	1
(+/-): Partículas concentradas no centro em forma de anel definido.	2
(+): Partículas concentradas no centro em forma de anel desfocado.	3
(++): Partículas aglutinadas dispersas no fundo.	4

8.1.3. Fluorescent Treponema Antibody Absorption Test

O FTA-abs é utilizado para detetar IgG contra *T. pallidum* em amostras de LCR e soro através da utilização de uma lâmina revestida com *T. pallidum*. Este teste tem como princípio a Imunofluorescência indireta.

A IgG da amostra liga-se ao antígeno do *T. pallidum* presente na lâmina. Após esta reação adiciona-se o conjugado, anti-imunoglobulina humana marcada com fluoresceína, que se liga à IgG (Figura 54). Durante a observação ao microscópio de fluorescência, os raios UV excitam a fluoresceína e esta liberta fluorescência num comprimento de onda visível (Figura 55). O resultado é dado em função da intensidade de fluorescência observada, numa escala de 0 (ausência de fluorescência) a 4+ (intensidade máxima de fluorescência), sendo que apenas a partir de 2+ a amostra poderá ser considerada positiva (Backhouse and Nesteroff, 2001).

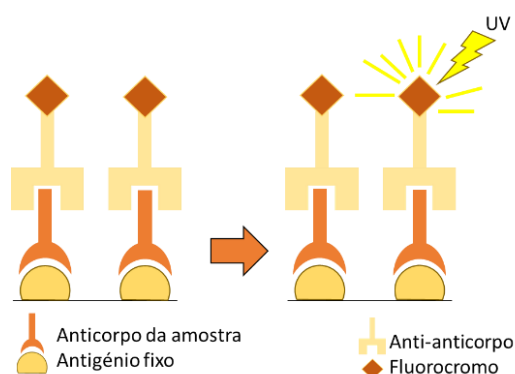


Figura 53: Princípio da metodologia de Imunofluorescência Indireta. Adaptado de Bula informativa do kit.

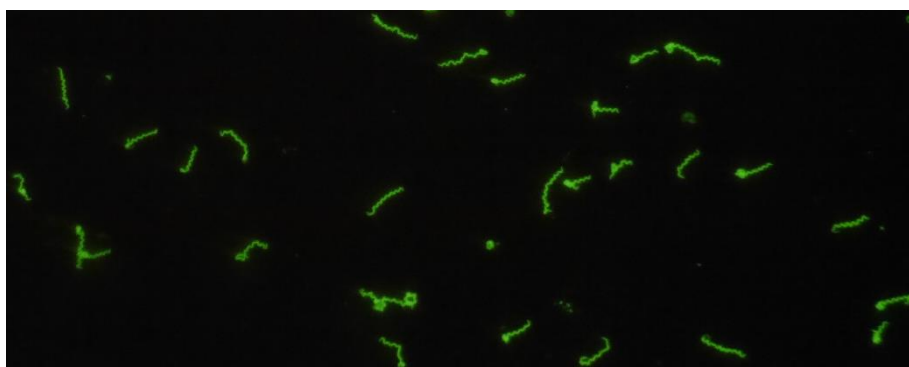


Figura 54: FTA-abs de uma amostra positiva. Ampliação 10x100=1000X.

Neste teste é utilizado um sorbente que tem como função a absorção de todos os anticorpos não específicos para o *T. pallidum* (Hagedorn, 2011, Wilkinson and Wiseman, 1971). Este teste é qualitativo uma vez que apenas nos informa acerca da positividade ou negatividade do resultado. A diluição de 1:5 da amostra foi definida como protocolo com o objetivo de prevenir o fenómeno de zona, no entanto apenas se aplica no soro e não no LCR, devido à menor concentração de anticorpos presentes nesta amostra (Bula informativa do kit).

8.1.4. Rosa de Bengala

O teste de Rosa de Bengala é utilizado para a deteção de anticorpos anti-*Brucella spp.* apenas em soro e LCR, dado ao elevado número de falsos positivos no plasma. Este teste consiste na aglutinação em cartão dos antígenos de *Brucella spp.* inativados e marcados com sais de Rosa de Bengala, com os anticorpos contra a *Brucella spp.* presentes nas amostras (Gómez *et al.*, 2008). Uma vez que apenas se avalia a positividade ou negatividade da amostra, este teste é qualitativo. Na Figura 56 observa-se o controlo positivo, caracterizado pela aglutinação dos sais de Rosa de Bengala. No lado direito está representada uma amostra negativa, caracterizada pela solução homogénea.

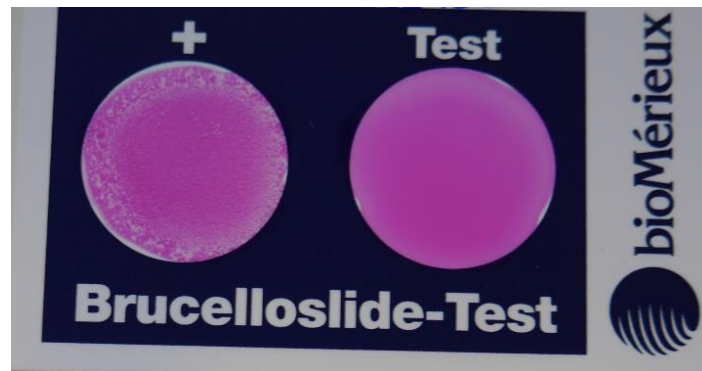


Figura 55: Teste de Rosa de Bengala.

8.1.5. Reação de Wright

O teste de reação de Wright é utilizado como teste de confirmação da Rosa de Bengala positiva. A Reação de Wright consiste na aglutinação em tubo de anticorpos anti-*Brucella* spp. presentes no soro e antígenos de *Brucella* spp., formando assim um sedimento no fundo do tubo (Galińska and Zagórski, 2013). O procedimento consiste numa diluição sucessiva da amostra de modo a alcançar uma concentração cujo resultado seja negativo, isto é, sem aglutinação (Figuras 57 e 58). A concentração imediatamente anterior a esse dará o resultado em título, no entanto apenas a partir da diluição de 1:80 se considera positivo.

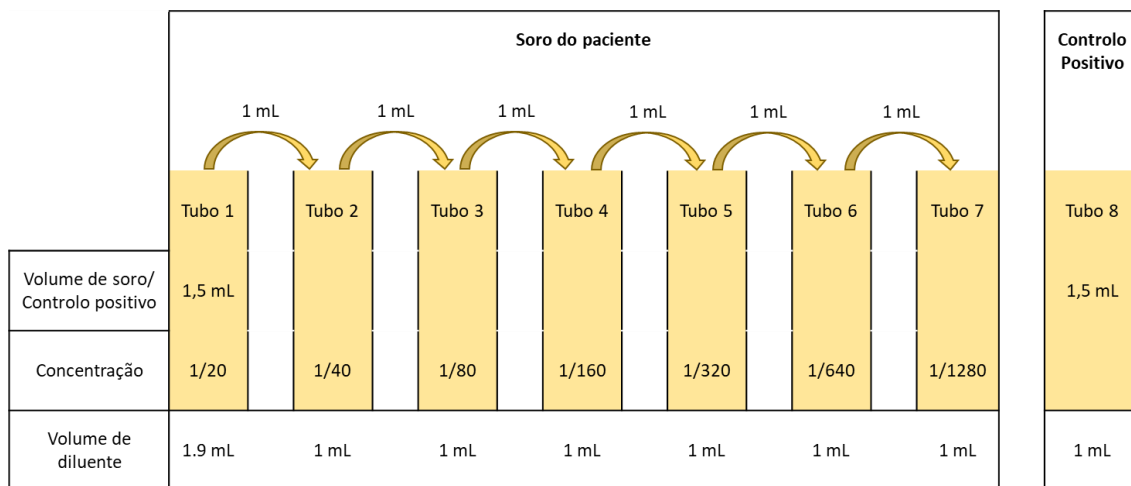


Figura 56: Metodologia de Reação de Wright. Adaptado de Bula informativa do kit.

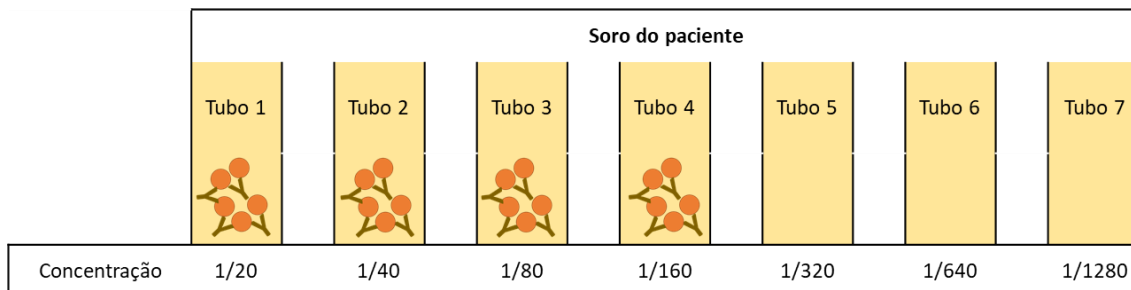


Figura 57: Resultados da Reação de Wright: O título corresponde à concentração do último tubo a demonstrar aglutinação. Neste exemplo o título corresponde a 1/160. Adaptado de Bula informativa do kit.

8.1.6. Pesquisa de anticorpos anti- *Legionella pneumophila*

Os anticorpos anti-*Legionella pneumophila* são detetados por um teste de Imunofluorescência indireta que deteta os anticorpos totais (IgA, IgM e as IgG) do serótipo 1-8.

Após a adição da amostra, os anticorpos ligam-se aos antígenos fixos na superfície da lâmina. (Figura 59) Por fim, os anticorpos anti-imunoglobulinas humanas marcados com um fluorocromo, fluoresceína, ligam-se aos anticorpos da amostra. Durante a observação ao microscópio de fluorescência, os raios UV excitam a fluoresceína, fazendo-a libertar energia sob a forma de luz visível (Hagedorn, 2011). O resultado é dado em títulos segundo a fluorescência observada, sendo que numa diluição de rastreio de 1:100 apenas se considera a amostra positiva com título igual ou superior a 1:320 (Tabela 2). Quando a fluorescência é forte (4+), a amostra deve ser diluída.

Tabela 2: Quadro de intensidades de fluorescência para obtenção de resultados em forma de Título. Adaptado de Bula informativa do kit.

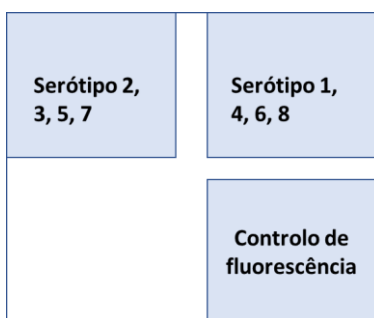


Figura 58: Representação de um poço da lâmina do teste *Legionella pneumophila*. Adaptado de Bula informativa do kit.

Fluorescência à concentração: 1:100	Título	Interpretação qualitativa
Negativo (0,1+)	\leq 1:32	Negativo
Fraco (2+)	1:100	Inconclusivo
Moderado (3+)	1:320	Positivo
Forte (4+)	1:1000	Positivo (Diluir a amostra)

8.2. Metodologias Automatizadas

Os testes automatizados utilizados contêm diferentes metodologias como Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA), Chemiluminescence Immuno Assay (CLIA) e Indirect Immunofluorescence.

8.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

O fundamento do método ELISA consiste na ligação entre os antígenos e as imunoglobulinas específicas presentes no sangue, com posterior ligação de anticorpos anti-imunoglobulina humana (Figura 60).

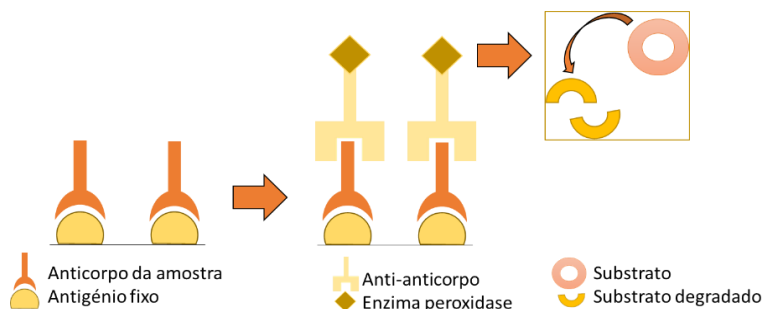


Figura 59: Princípio de ELISA. Adaptado de Bulas informativas dos kit's a utilizar no equipamento Analyser.

No Laboratório de Serologia, o equipamento Analyser I (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha) (Figura 61) baseia-se no método de ELISA.

Nos kit's utilizados para este equipamento, quando todas as moléculas estiverem ligadas, a enzima peroxidase é ativada e degrada o substrato que dá uma tonalidade amarelada à solução (Figura 62). A tonalidade amarelada é quantificada através de um leitor de densidade ótica e convertida, pelo equipamento, para unidades relativas de luz por mililitro (URL/mL) e resultado índice para as IgG e IgM, respetivamente (Bula informativa dos kit's).

Este equipamento é utilizado para estudar apenas as IgG e IgM contra o *Mycoplasma pneumoniae* e *C. pneumoniae*.



Figura 60: Equipamento Analyser I.

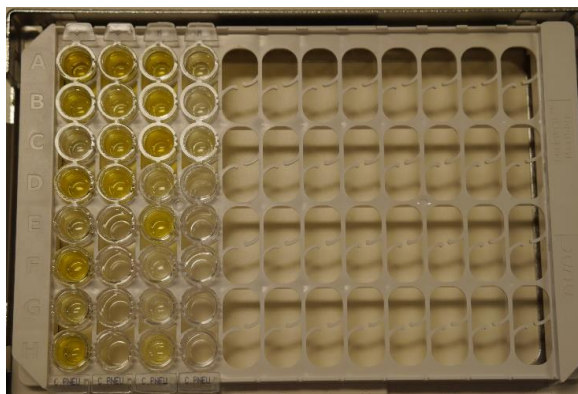


Figura 61: Tiras de ELISA utilizadas no aparelho Analyser I.

8.2.2. Enzyme Linked Fluorescent Assay

Este princípio baseia-se na ELISA conjugada com a fluorescência. A fluorescência é a emissão de luz pela amostra após a sua fotoexcitação. A metodologia consiste na ligação de um conjugado de anticorpo anti-imunoglobulina com fosfatase ao anticorpo humano, permitindo assim a ativação da enzima que degrada o substrato (Figura 63). O substrato cria então fluorescência no comprimento de onda de 370 nm quando excitado com luz UV (Gharavi *et al.*, 2011).

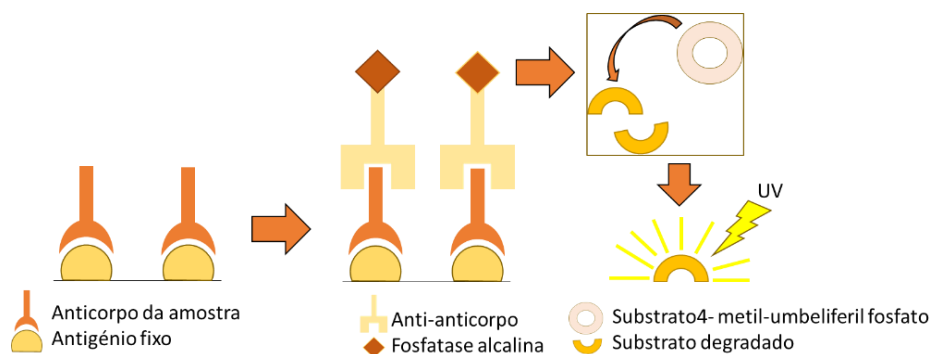


Figura 62: Princípio do método ELFA no equipamento VIDAS. Adaptado de Manual informativo do equipamento.

O funcionamento do equipamento VIDAS (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França) (Figura 64) baseia-se nesta metodologia para análises serológicas, através da utilização de monostestes, isto é, um cone e uma barrete, que contém todos os reagentes necessários ao teste, para cada amostra (Figura 65). O cone serve como fase sólida para a reação imunológica através da pipetagem dos reagentes na barrete. Após a reação de ELISA a amostra é transferida para a cuvete ótica correspondente ao último poço da barrete para que a fluorescência do substrato seja medido pelo leitor ótico fluorimétrico do aparelho (Manual informativo do equipamento).

Neste equipamento realizam-se testes de confirmação de IgG e de IgM e executa-se o teste da avidéz das IgG dos microrganismos *Toxoplasma gondii* (TOXO), Citomegalovirus e vírus da Rubéola.

A avidéz consiste nas forças existentes entre as Ig's e os antígenios. Este teste tem como objetivo determinar se a avidéz é forte ou fraca através da indução da quebra de ligações com ureia. Para calcular um índice de avidéz (IA) da IgG's é necessário determinar a quantidade de IgG detetada sem a presença de ureia e de IgG com a presença de ureia (Equação 1). Na Tabela 3 está representada a interpretação de resultados segundo avidéz de IgG, contra os três tipos de microrganismos a analisar (Prince and Lapé-Nixon, 2014).

Equação 1: Índice de Avidéz de IgG.

$$IA = \frac{IgG \text{ com ureia}}{IgG \text{ sem ureia}} \times 100$$

Tabela 3: Interpretação de resultados segundo avidéz de IgG. Adaptado de Bobić, 2009 e Prince and Lapé-Nixon, 2014.

	Avidéz	Infeção	CMV	Rubéola	TOXO
AI <	Fraca	Recente	<3 meses	<3 meses	<4 meses
AI	Intermediária	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusiva
AI >	Forte	Infeção Prévia	>3 meses	>3 meses	>4 meses

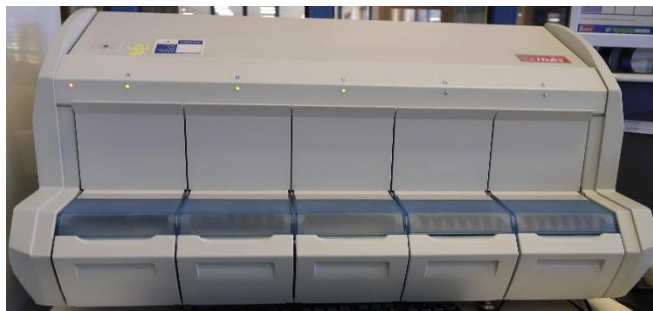


Figura 63: Equipamento VIDAS.



Figura 64: Barretes a utilizar no equipamento VIDAS.

8.2.3. Chemiluminescence Immuno Assay

CLIA é um método que consiste na emissão de luz a partir de uma reação química, isto é a adição de soluções quimicamente ativadoras que permitem a libertação de energia sob a forma de luz (Firouz *et al.*, 2014). Estes testes são semi-quantitativos e quantitativos uma vez que a quantidade de energia, medida pelo fotosensibilizador, é convertida tanto em resultado índice como outras unidades. Os aparelhos que utilizam a Quimiluminescência são o VirClia® (Vircell S.L., Granada, Espanha), o Liason® XL (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Itália) e o Architect (Abbott, Illinois, EUA).

VirClia®

A principal diferença entre o VirClia® (Figura 67) e os outros dois equipamentos é o facto de este realizar monotestes (Figura 66). Estes monotestes contém a vantagem de incorporar os calibradores e os testes de controlo, uma vez que nos permite realizar análises a microrganismos raros, dispensando custos adicionais com controlos e calibrações.



Figura 65: Monotestes do VirClia®.

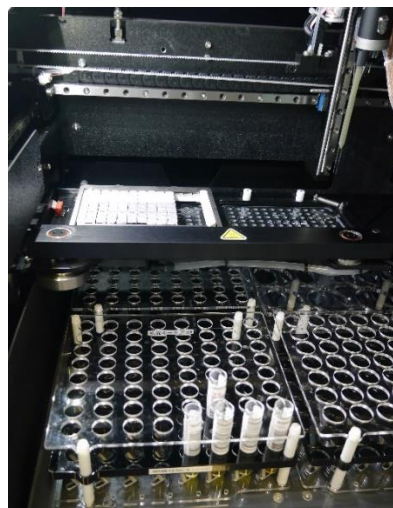


Figura 66: Equipamento VirClia®.

Quando o anticorpo anti-imunoglobulina se liga ao complexo anticorpo-antigénio fixo à superfície de poliestireno, são adicionados substratos, que ativam quimicamente a peroxidase acoplada ao anticorpo anti-imunoglobulina para degradar o substrato, exibindo luminescência (Figura 68). A luminescência é lida pelo luminómetro integrado no próprio equipamento e convertida num resultado sob a forma de índice (Bula informativa do kit).

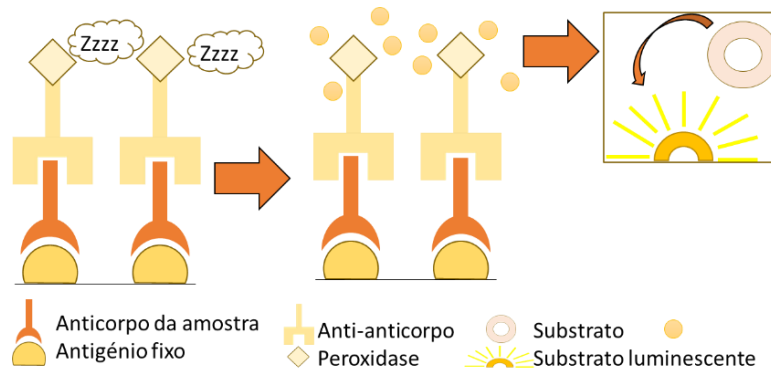


Figura 67: Princípio da metodologia usada pelo equipamento VirClia®. Adaptado de Bula informativa do kit.

No Laboratório de Serologia este equipamento é utilizado para análises de anticorpos contra: vírus Zika (IgG e IgM), vírus Dengue (IgG e IgM), *T. pallidum* (IgM), vírus Chikungunya (IgG e IgM), *Bartonella* spp. (IgG e IgM), vírus da Parotidite (IgG e IgM), *Rickettsia conorii* (IgG e IgM) e *Coxiella burnetii* (IgG e IgM).

Liason® XL

O equipamento Liason® XL (Figura 69), utiliza a quimioluminescência segundo dois procedimentos diferentes.



Figura 68: Equipamento Liason® XL.

Um procedimento contém como fase sólida as partículas magnéticas revestidas com anticorpo anti-imunoglobulina humana. Ao anticorpo humano da amostra ligar-se-á o antígeno acoplado com um derivado de isoluminol (Figura 70).

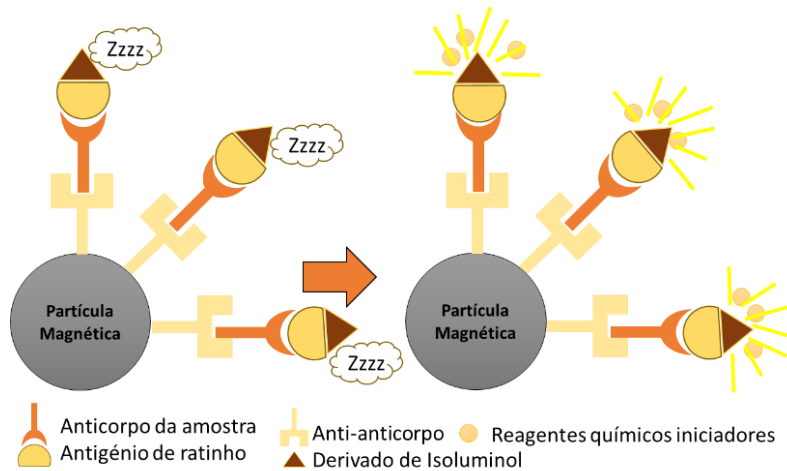


Figura 69: Princípio de uma das metodologias utilizada no Liason® XL. Adaptado de Bula informativa do kit.

O outro procedimento contém também a fase sólida de partículas magnéticas, no entanto a posição de ligação entre as moléculas é invertida, isto é, contém acopladas à superfície das partículas os antígenos, a que se ligam as Ig das amostras e seguidamente os anticorpos anti-imunoglobulinas (Figura 71).

Para ambas as metodologias, o sinal luminoso gerado é medido em URL pelo fotomultiplicador e convertido num resultado (Bula informativa do kit).

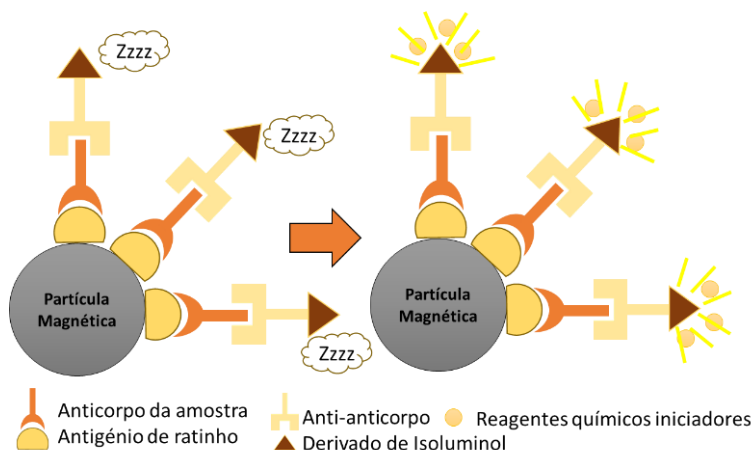


Figura 70: Princípio de uma das reações da metodologia utilizada no Liason® XL. Adaptado de Bula informativa do kit.

Este equipamento é utilizado para a pesquisa de IgG e IgM contra Herpes Simplex Vírus type 1 (HSV-1), Herpes Simplex Vírus type 2 (HSV-2), Vírus Varicela-Zoster, Measles morbillivirus, Parvovírus e *Borrelia burgdorferi* e de anticorpos IgG e IgA para a *C. trachomatis*.

Architect

O Architect (Figura 72) utiliza o método CMIA, que é uma variante do CLIA. O CMIA utiliza micropartículas paramagnéticas revestidas por antígenos (Brischetto *et al.*, 2018). Este equipamento utiliza a acridina em vez do derivado de isoluminol utilizado no Liason® XL e à semelhança desse, a quimiluminescência é medida em URL e convertida nas respetivas unidades (Manual informativo do equipamento). Neste setor este equipamento é utilizado para a determinação de imunoglobulinas (IgG e IgM) contra o TOXO, CMV, Rubella virus, EBV e *T. pallidum*.



Figura 71: Equipamento ARCHITECT plus.

8.2.4. Indirect Immunofluorescence

O Mago Plus® (Delta Diagnostics Ltd., Roma, Itália) (Figura 74) é um equipamento que prepara as lâminas de imunofluorescência indireta, com o objetivo de detetar IgG de *Coxiella burnetii* e *Rickettsia conorii*. Dado ao elevado número de amostras para que é necessário realizar este teste, este equipamento é uma mais valia, uma vez que apenas necessita de operador no início da operação. O fundamento da metodologia está demonstrado na Página 45.

O equipamento prepara as lâminas para posterior observação (Figura 73). Os resultados são observados ao microscópio de fluorescência que excita o fluorocromo com raios UV, levando-o a libertar energia sob a forma de luz visível. O resultado do teste é dado em título, sendo este a diluição mais elevada onde se observou fluorescência (Bula informativa do kit).



Figura 72: Lâminas para corar no equipamento MAGO Plus®.



Figura 73: Equipamento MAGO Plus®.

8.3. Dados estatísticos relativos ao Setor de Serologia

O teste Sífilis screening foi o teste mais realizado no Setor de Serologia, seguindo-se os testes de pesquisa de IgG e IgM contra o *Toxoplasma gondii*.

Abaixo na Tabela 4 é possível observar o número de alguns testes realizados no Setor de Serologia ao longo do ano de 2018.

Tabela 4: Quantidade de alguns testes realizados no Setor de Serologia, no ano de 2018.

Teste de pesquisa de anticorpos	Quantidade
Sífilis screening	13532
Toxoplasma (IgG)	6454
Toxoplasma (IgM)	6183
Citomegalovírus (IgG)	5582
Citomegalovírus (IgM)	5331
Epstein-Barr (IgG)	3364
Epstein-Barr virus Nuclear Antigen (EBNA)	3307
Epstein-Barr (IgM)	3292
Herpes simplex vírus type 1 (IgG)	2757
Herpes simplex vírus type 1 (IgG)	2693
Herpes simplex vírus type 1 e 2 (IgM)	2622
Rubéola (IgG)	2593
Rubéola (IgM)	2549
<i>Brucella</i> spp. (Rosa de Bengala)	1340
<i>Chlamydia trachomatis</i> (IgG)	1282
<i>Borrelia burgdorferi</i> (IgG)	1260
<i>Chlamydia trachomatis</i> (IgA)	1251
RPR com titulação	1250
<i>Chlamydia trachomatis</i> (IgG)	1222
<i>Coxiella burnetti</i>	1003

9. Conclusão

O CHUC mostrou-se a instituição mais adequada para consolidar e adquirir novos conhecimentos devido à sua vasta quantidade e qualidade de laboratórios. Por ser um grande conjunto de hospitais, requer tecnologias de ponta e procedimentos que rentabilizem e facilitem os diagnósticos dos doentes.

Considero que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, tendo este estágio facultado ferramentas essenciais para atingir os meus objetivos aquando da minha ingressão no mercado de trabalho.

Este estágio permitiu-me obter conhecimentos relativos à gestão e funcionamento dos laboratórios, mas principalmente conhecimentos das metodologias e equipamentos de ponta.

Acho importante conhecer os principais desafios nos laboratórios para que se possa estudar não só as soluções, mas também a sua implementação.

10. Referências Bibliográficas

- Alhabbab, R.Y. 2018, “*Basic Serological Testing*”. Cham, Suíça: Springer. pp.31-34. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77694-1_4 [Consult. 18 Julho 2019].
- Altshuler, E.P. Serebryanaya, D.V. Katrukha, A.G. 2010. “Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity”. *Biochemistry (Mosc)*, 75(13).
- Backhouse, J.L. Nesteroff, S.I. 2001. “Treponema pallidum western blot: Comparison with the FTA-Abs test as a confirmatory test for syphilis”. *Diagnostic Microbiology and Infection Diseases*, 39(1).
- Becton, Dickinson and Company. 2009, “*Difco & BBL Manual*”. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company. pp.48-165. Disponível em: <https://www.trios.cz/wp-content/uploads/sites/149/2016/08/DIFCO-A-BBL-MANUAL-2.pdf>, [Consult. 1 Agosto 2019].
- Becton, Dickinson and Company. 2013. “*BD™ Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar with 5% Sheep Blood (Schaedler-KV Agar)*”. Nova Jersey: Becton, Dickinson and Company. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8977> [Consult. 27 Julho 2019].
- Becton, Dickinson and Company. 2019a. “*BD BACTEC™ FX Instruments - Impacting Patient Care*”. Nova Jersey: Becton, Dickinson and Company. Disponível em: <https://www.bd.com/scripts/europe/ds/productsdrilldown.asp?CatID=186&SubID=521&siteID=20089&d=sepsis&s=europe%2Fds&sTitle=Diagnostic+Systems&metaTitle=Blood+Culture+Systems&dc=europe%2Fds&dcTitle=Diagnostic+Systems> [Consult. 27 Julho 2019].
- Becton, Dickinson and Company. 2019b. “*BD BACTEC™ Media*”. Nova Jersey: Becton, Dickinson and Company. Disponível em: <https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/blood-culture-systems/bactec-media> [Consult. 27 Julho 2019].
- Becton, Dickinson and Company. 2019c. “*BD BACTEC™ MGIT™ 960 e 320*”. Nova Jersey: Becton, Dickinson and Company. Disponível em: <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/microbiology-testing/bactec-mgit-960-and-320> [Consult. 27 Julho 2019].
- BIOGERM S.A. 2019. “*Columbia HK 5%*”. Maia: BIOGERM S.A.. Disponível em: http://maia.biogerm.pt/biogest/certificados/lote_39M.1026.pdf [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2016. “*BACT/ALERT® 3D*”. Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9314960-002-gb-e_bact-alert_3d_instruments_web.pdf [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2018a. “*Meios de cultura BACT/ALERT®*”. Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalertr> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2018b. “*VITEK® 2*”. Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2018c. “*VITEK® MS: Healthcare*”. Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-ms-healthcare> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019a. “*BCSA agar*”. Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/18-bcsa-agar> [Consult. 27 Julho 2019].

- bioMérieux S.A. 2019b. “*Campyloset agar*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/19-campyloset-agar> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019c. “*Chocolate agar PolyViteX*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/27-chocolate-agar-polyvitex> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019d. “*Haemophilus Chocolate 2 agar*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/37-haemophilus-chocolate-2-agar> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019e. “*Mueller Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l β-NAD (MHF)*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/43-mueller-hinton-agar-+-5-percent-horse-blood-+-20-mg-l-%C3%9F-nad--mhf-> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019f. “*Mueller Hinton E agar 90 mm*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/42-mueller-hinton-e-agar-90-mm> [Consult. 27 Julho 2019].
- bioMérieux S.A. 2019g. “*Yersinia CIN agar*”. Marcy-l’Étoile: bioMérieux S.A.. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/51-yersinia-cin-agar> [Consult. 27 Julho 2019].
- Bobić, B. Klun, I. Vujanić, M. Nikolić, A. Ivović, V. Živković, T. Djurković-Djaković, O. 2009. “Comparative evaluation of three commercial Toxoplasma-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings” *Jornal of Medical Microbiology*, 58.
- Brischetto, A. Gassiep, I. Whiley, D. Norton, R. 2018. “Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: Are both tests necessary?”. *Jornal of clinical microbiology*, 56(5).
- Bula informativa do equipamento 7300 Real-Time PCR e 7500 Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). Disponível em: http://ifbg.org.ua/~files/ccu/ABI_Prism_7500_Real_Time_PCR_System_tech_spec.pdf [Consult . 11 Julho 2019].
- Bula informativa do equipamento BioRad CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). Disponível em: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6093.pdf [Consult . 13 Julho 2019].
- Bula informativa do equipamento Cobas® Elecsys 6000 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça). Disponível em: <http://c-e.am/ckfinder/userfiles/files/cobas6000.pdf> [Consult . 11 Julho 2019].
- Bula informativa do equipamento eMAG® (bioMérieux S.A., Marcy-l’Étoile, França). Disponível em: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/emag-extraction-platform-total-nucleic-acid-purification> [Consult . 14 Julho 2019].
- Bula informativa do equipamento Smart Cycler II (Ceipheid Inc., Sunnyvale, EUA). Disponível em: http://www.biovendor.sk/download/14901/Navod_%282%20ze%202%29_900-0330_EN.pdf [Consult . 11 Julho 2019].

- Bula informativa do kit Anti-Chlamydia pneumoniae ELISA (IgG) a utilizar no equipamento Analyser I. (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha). Ref: EI 2192-9601 G.
- Bula informativa do kit Anti-Chlamydia pneumoniae ELISA (IgM) a utilizar no equipamento Analyser I. (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha). Ref: EI 2192-9601 M .
- Bula informativa do kit Anti-Mycoplasma pneumoniae ELISA (IgG) a utilizar no equipamento Analyser I. (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha). Ref: EI 2192-9601 G.
- Bula informativa do kit Anti-Mycoplasma pneumoniae ELISA (IgM) a utilizar no equipamento Analyser I. (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha). Ref: EI 2202-9601 M.
- Bula informativa do kit BIOCHIP Sequences Legionella (EUROIMMUN AG, Luebeck, Alemanha). Ref: FI 215b-1010-1 P.
- Bula informativa do kit BRUCELLA WRIGHT (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). Ref: 63241.
- Bula informativa do kit Coxiella burnetii IgG-IFA A test a utilizar no equipamento MAGO Plus[®]. (Delta Diagnostics Ltd., Roma, Itália). Ref: DBF-030
- Bula do kit FTA ABS TEST SYSTEM (Alphadia S.A., Wavre, Bélgica). Ref: AD FTA 100.
- Bula informativa do kit Hydatidosis VIRCLIA[®] IgG MONOTEST a utilizar no equipamento VirClia[®]. (Vircell S.L., Granada, Espanha). Ref: TB00300-CL.
- Bula informativa do kit Liason[®] Biotrin Parvovirus B19 IgM a utilizar no equipamento Liason[®] XL. (Diasorin S.p.A., Saluggia, Itália). Ref: 317010.
- Bula informativa do kit QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT-Plus) (QIAGEN GmbH., Hilden, Alemanha) a utilizar no equipamento DS2 Automated ELISA. (DYNEX Technologies, Chantilly, EUA). Ref: 622120.
- Bula informativa do kit RPR-CARBON (BioSystem S.A., Barcelona, Espanha). Ref: 36001.
- Bula informativa do kit SERODIA-TP-PA (Fujirebio Inc., Gotemburgo, Suécia). Ref: 201626.
- Bula informativa dos frascos de cultura BACT/ALERT[®] FA Plus a utilizar no equipamento Bact-Alert. (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 410851
- Bula informativa dos frascos de cultura BACT/ALERT[®] FN Plus a utilizar no equipamento Bact-Alert. (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 410852
- Bula informativa dos frascos de cultura BACT/ALERT[®] PF Plus a utilizar no equipamento Bact-Alert. (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 410853
- Cepheid. 2014. “GeneXpert”. Califórnia: Cepheid. Disponível em: <https://pt.werfen.com/productos/microbiologia-molecular/genexpert.aspx> [Consult. 27 Julho 2019].
- Don Whitley Scientific Ltd. 2019. “Whitley DG250 Workstation”. Bingley: Don Whitley Scientific Ltd. Disponível em: <https://www.dwscientific.co.uk/whitley-dg250-workstation/> [Consult. 27 Julho 2019].
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018. “Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union” Stockholm, Suécia. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/TB-handbook-updated-2018.pdf> [Consult. 19 Julho 2019].

- European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) 2019. *European Committee on antimicrobial susceptibility testing-EUCAST*. Basel: EUCAST. Disponível em: <http://www.eucast.org/> [Consult. 20 Julho 2019].
- F. Hoffmann-La Roche Ltd. 2019. “Cobas e 601 module”. Suíça: F. Hoffmann-La Roche Ltd. Disponível em: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-e-601.html#productInfo> [14 Julho 2019].
- Firouz, Z.E. Kaboosi, H. Nasiri, A.F. Tabatabaie, S.S. Golhasani-Keshtan, F. Zaboli, F. 2014. “A comparative serological study of toxoplasmosis in pregnant women by CLIA an ELISA methods in Chalus city Iran”. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(4).
- Fonseca, A. B. Sebastião, C. Martins, F. J. C. Ribeiro, M. G. V. C. Calheiros, I. Lito, L. M. Abecassis, M. B. Pinto, M. I. F. Spencer, M. O. C. Pinheiro, M. P. S. F. M. Costa, M. T. M. P. M. Barros, R. M. Bento, R. F. 2004, “Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia”. Lisboa, Portugal: Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI), Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge. Disponível em: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-de-controlo-da-infeccao/documentos/manuais-de-boas-praticas/orientacoes-para-a-elaboracao-de-um-manual-de-boas-praticas-em-bacteriologia.aspx>, [Consult. 3 Junho 2019].
- Fraher, M.H. O’Toole, P.W. Quigley, E.M.M. 2012. “Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(6).
- Frilabo Lda. 2019. “Tryptic soy agar”. Porto, Frilabo Lda. Disponível em: <http://www.frilabo.pt/pt/product/tryptic-soy-agar-500g> [Consult. 4 Julho 2019].
- Galińska, M.E. and Zagórski, J. 2013. “Brucellosis in humans – etiology , diagnostics , clinical forms”. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 20(2).
- Gharavi, M.J. Jalalis, S. Khademvatan, S. Heydari, S. 2011. “Detetion of IgM and IgG anti-Toxoplasma antibodies in renal transplant recipients using ELFA, ELISA and ISAGA methods: comparison of pre- and post- transplantation status”. *Annals of Tropical and Medicine and Parasitology*, 105(5).
- Gómez, C.M. Nieto, J.A. Rosa, C. Geijo, P. Escribano, M. Muñoz, A. López, C. 2008. “Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic”. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(6).
- Gordon, S. 2016. “Phagocytosis: An immunobiologic process”. *Immunity*, 44(3).
- Gross, G. Tying, S.K. 2011, “Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases”. Cham, Suíça: Springer. pp.143-150. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-14663-3_12, [Consult. 18 Julho 2019].
- Hagedorn, H.-J. 2011. “Laboratory Diagnosis of Syphilis”. *Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases*. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-14663-3_12 [Consult. 17 Julho 2019].
- Hain Lifescience 2014. “GenoType Mycobacterium CM”. Nehren: Hain Lifescience. Disponível em: https://www.hain-lifescience.de/include_datei/kundenmodule/packungsbeilage/download.php?id=776 [Consult. 27 Julho 2019].

- Hain Lifescience 2015. “*GenoType MTBDRplus*”. Nehren: Hain Lifescience. Disponível em: <http://mobiuslife.com.br/teste-suscetibilidade-drogas/genotype-mtbdplus/> [Consult. 27 Julho 2019].
- Hillier, S. Roberts, Z. Dunstan, F. Butler, C. Howard, A. Palmer, S. 2007. “Prior antibiotics and risk of antibiotic-resistant community-acquired urinary tract infection: a case – control study”. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1).
- IUL S.A. 2018. “*PolyStainer-Slide Stainer*”. Barcelona: IUL, S.A. Disponível em: <https://iul-instruments.com/product/polystainer-slide-stainer/> [Consult. 27 Julho 2019].
- Jr. H.W.S., H. Cavacini, L.2010. “Structure and function of immunoglobulins”. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125.
- Kurosaki, T. Kometani, K. Ise, W. 2015. “Memory B cells”. *Nature reviews. Immunology*, 15(3).
- Lee, J-. Lim, C.S. Lee, M-. Kim, H-. 2014. “Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing”. *BMJ Journals*, 4(12).
- Lewis, D.A. Brown, R. Williams J. White, P. Jacobson, S.K. Marchesi, J.R. Drake, M.J. 2013. “The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults”. *Frontiers in cellular and Infection Microbiology*, 3(41).
- LiPum, J.J. 2001. “Burkholderia cepacia complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis?”. *Transplantation Infection Disease*, 3(3).
- Maxdata S.A. 2018. *Clinidata®XXI*. Carregado: Maxdata. Disponível em: <http://www.maxdata.pt/pt/produto/3/clinidataxxi-patologia-clinica/> [Consult. 14 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento 3130 Genetic Analyser (Applied BioSystems, Foster City, EUA). Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477796.pdf>
- Manual informativo do equipamento Architect (Abbot, Illinois, EUA). Disponível em: https://yeec.com/uploadimages1/forum/abbott/ARCHITECT_C4000i1000%E6%93%8D%E4%BD%9C%E6%89%8B%E5%86%8C.pdf [Consult. 13 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento Auto Lipa 48 (Immunogenetics N.V., Gante, Bélgica). Disponível em: http://www.peramed.com/peramed/docs/80628_EN.pdf [Consult. 11 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento BACTEC™ MGIT™ 960 mycobacterial detection system (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA). Disponível em: https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf [Consult. 14 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento BD Bactec™ 9120 Blood Culture System (Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, EUA). Disponível em: <http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-9000bc2.pdf> [Consult. 13 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento Cobas 4800 System (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basiléia, Suíça). Disponível em: <https://www.rijksoverheid.nl/binaries/rijksoverheid/documenten/wob-verzoeken/2016/10/21/besluit-wob-verzoek-over-bevolkingsonderzoek-baarmoederhalskanker/bijlagen+bij+Wob-besluit+over+bevolkingsonderzoek+baarmoederhalskanker+deel+2.pdf> [Consult. 11 Julho 2019].

- Manual informativo do equipamento EZ1® Advanced XL (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha). Ref: 9001874 Disponível em: https://www.dynex.cz/data/machines/hb-0176-002_1108598_r2_um_ez1advancedxl_1117_ww-2.pdf [Consult. 13 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento FilmArray EZ (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Disponível em: <https://www.biofiredx.com/support/documents/#toggle-id-3> [Consult. 13 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento FilmArray System Torch (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Disponível em: <https://www.biofiredx.com/support/documents/#toggle-id-3> [Consult. 11 Julho 2019].
- Manuais informativos dos equipamentos GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied BioSystems, Foster City, EUA). Disponível em: <https://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/GeneAmp%20PCR%20System%209700%20user%20guide.pdf> [Consult . 11 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento QIAcube (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha). Disponível em: <https://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/automation/QIAcube-User-Manual-EN.pdf> [Consult . 13 Julho 2019].
- Manual do equipamento Rotor Gene Q (QIAGEN® GmbH., Hilden, Alemanha). Disponível em: https://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/05_Facilities/01_Technology_Platforms/BF/instruments/Rotorgene_Manual.pdf [Consult . 11 Julho 2019].
- Manual informativo do equipamento VIDAS (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 99762. Disponível em: http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Vidas%20-%20User%20manual.pdf [Consult. 13 Julho 2019].
- Mason, K.L. Huffnagle, G.B. Noverr, M.C. Kao, J.Y. 2008. “Overview of Gut Immunology”. *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-09550-9_1 [Consult.10 Julho 2019].
- McShane, A.J. Bunch, D.R. Wang, S. 2016. “Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants by liquid chromatography-mass spectrometry”. *Clinica Chimica Acta*, 454.
- Merle, N.S. Church, S.E. Fremeaux-Bacchi, V. Roumenina, L.J. 2015. “Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation”. *Frontiers in immunology*, 6(2).
- Murray, P.R. Baron, E.J. Jorgensen J.H. Landry, M.L. Pfaller, M.A. 2007. *Manual of clinical microbiology*, Washinton, DC, American Society for Microbiology Press, pp. 218-361.
- O’Neill, C. 2016, “*Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on*”. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf, [Consult. 24 Julho 2019]
- Orion, D. O. 2019. “*URICULT*” [Em linha]. Espoo: Orion Diagnostica Oy. Disponível em: <https://www.oriondiagnostica.com/microbiology/uricult> [Consult. 27 Julho 2019].
- Owen, J.A. Punt, J. Strandford, S.A. Jones, P.P. 2013. “Kuby Immunology”, Houndmills, Basingstoke, Macmillan Higher. pp. 9-423

- OXOID Ltd. 2009. “*Agar Columbia con Sangre de OvejaPLUS*”. Cheshire: OXOID Ltd. Disponível em: http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/pp/PB5039A.pdf [Consult. 27 Julho 2019].
- OXOID Ltd. 2014. “*Tryptone Soya Agar with Sheep Blood*”. Cheshire: OXOID Ltd. Disponível em: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/MBD/Specification-Sheets/PB5012A.pdf> [Consult. 27 Julho 2019].
- OXOID Ltd. 2019a. “*Brain Heart Infusion Broth*”. Cheshire: OXOID Ltd. Disponível em: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1135&org=133&c=UK&lang=EN [Consult. 27 Julho 2019].
- OXOID Ltd. 2019b. “*Columbia CNA Agar*”. Cheshire: OXOID Ltd. Disponível em: http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0070&org=153&c=uk&lang=EN [Consult. 27 Julho 2019].
- OXOID Ltd. 2019c. “*Sorbitol Macconkey Agar*”. Cheshire: OXOID Ltd. Disponível em: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO0232&sec=2&org=72&c=UK&lang=EN [Consult. 27 Julho 2019].
- PPCIRA-Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistências aos Antimicrobianos 2018, “*Infecções e resistências aos antimicrobianos*”. Lisboa, Portugal: Direção Geral de Saúde e Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistências aos Antimicrobianos. pp. 18-26. Disponível em: <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-1003038-pdf.aspx?v=11736b14-73e6-4b34-a8e8-d22502108547>, [Consult. 27 Julho 2019].
- Prince, H.E. Lapé-Nixon, M. 2014. “Role os Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity Testing in Diagnosing Primary CMV Infection during Pregnancy”. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21.
- Ratnam, S. 2005. “The laboratory diagnosis of syphilis” *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology*, 16(1).
- Rojas-Torres D.S., Bastidas-Yaguana D.K., Sierra-Santos L., Aguilar-Shea A.L. 2014. “Importancia del déficit seletivo de inmunoglobulina A”. *Semergen / Sociedad Española de Medicina Rural y Generalista*, 40.
- Schmiemann, G. Kniehl, E. Gebhardt, K. Matejczyk, M.M. Hummers-Pradier, E. 2010. “The Diagnosis of Urinary Tract Infection”. *Eutsches Ärzteblatt international*, 107(21).
- Sidana, R. Mangala, H.S. Murugesh, S.B. Ravindra, K. 2011. “Prozone phenomenon in secondary syphilis”. *Indian journal of sexually transmitted diseases and AIDS*, 32(1).
- Smith, G. Holman, R.P. 2004. “The prozone phenomenon with syphilis and HIV-1 co-infection”. *Southern medical journal*, 97(4).
- Stinson, K. W. Eisenach, K. Kayes, S. Matsumoto, M. Siddiqi, S. Nakashima, S. Hashizume, H. Timm, J. Morrissey, A. Mendoza, M. Mathai, P. 2014, “Mycobacteriology Laboratory Manual”. [livro eletrónico] Genebra, Suíça: Stop TB Partnership, Global Laboratory Initiative - Advancing TB diagnosis, World Health Organization. pp. 1–154. Disponível em: <https://www.who.int/tb/laboratory/mycobacteriology-laboratory-manual.pdf>, [Consult. 14 Maio 2019].

- Wagner, D. and Young, L. S. 2004. “Nontuberculous Mycobacterial Infections: A Clinical Review”. *Infection*, 32(5).
- WHO-World Health Organization 2018, “*Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Deaths By Cause, Age And Sex, By World Bank Income Group, 2000-2015*”. Genebra, Suíça: World Health Organization. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/, [Consult. 12 Maio 2019].
- Wilkinson, A.E. and Wiseman, C.C. 1971. “The role of sorbent in the absorbed fluorescent treponemal antibody (FTA-ABS) test”. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 64(4).
- Wynn, T.A. Vanella, K.M. 2016. “Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis”. *Immunity*, 44(3).