



Universidade de Aveiro

2020

**ANA SOFIA  
ANTUNES RIBEIRO**

**METODOLOGIAS LABORATORIAIS DE AUXÍLIO  
AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE INFEÇÕES  
MICROBIANAS**



Universidade de Aveiro  
2020

**ANA SOFIA  
ANTUNES RIBEIRO**

**METODOLOGIAS LABORATORIAIS DE AUXÍLIO  
AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE INFEÇÕES  
MICROBIANAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Catedrática da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho a toda a minha família pela motivação e apoio que me prestaram de forma incansável durante todo o meu percurso académico.

## **o júri**

Presidente

Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves  
Professora Associada, Universidade de Aveiro

Arguente

Professora Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte  
Professora Auxiliar, Universidade Católica Portuguesa

Orientadora

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida  
Professora Catedrática, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

É com imenso orgulho que expresso o meu agradecimento ao Grupo Beatriz Godinho Saúde S.A., em especial à Dr.<sup>a</sup> Maria Beatriz Tomaz, pela oportunidade a mim concedida, para poder realizar o meu estágio no Laboratório José Manuel Chau S.A., membro do grupo acima mencionado.

Eu sou grata à Professora Doutora Adelaide Almeida pelos valiosos conselhos e conhecimentos transmitidos ao longo de todo o mestrado, que me incentivaram a querer saber mais sobre o mundo fascinante da Microbiologia.

Gostaria de expressar o meu profundo agradecimento à Dr.<sup>a</sup> Ana Filipa Paredes, diretora clínica do laboratório onde realizei estágio, por todo o acompanhamento a mim prestado, durante o decorrer do estágio, os conselhos, a motivação e novos conhecimentos que transmitiu. Queria agradecer também à Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Estácio, diretora clínica adjunta do laboratório José Manuel Chau S.A., por todo o apoio prestado durante o decorrer do meu estágio, que juntamente com a Dr.<sup>a</sup> Ana Filipa Paredes me mostraram como o trabalho realizado no laboratório de microbiologia é de extrema relevância e um auxílio importante para o diagnóstico clínico, tendo de ser realizado com elevado rigor.

Devo os meus entusiásticos agradecimentos a todos os trabalhadores do laboratório onde realizei estágio, que me acolheram e ajudaram a integrar a equipa de trabalho.

Agradeço ainda à Dr.<sup>a</sup> Ana Tavares pela prontidão em explicar e fornecer informações sobre o trabalho realizado no setor de biologia molecular.

Por último, quero prestar um agradecimento especial à minha família pelo apoio, força e motivação, a mim prestados e por estarem sempre presentes nos momentos em que preciso.

**palavras-chave**

SARS-CoV-2, Infecções microbianas, Microrganismos, Metodologias laboratoriais, COVID-19

**resumo**

As metodologias laboratoriais apresentam um papel relevante no auxílio do diagnóstico clínico de infecções microbianas, uma vez que permitem identificar o agente etiológico da infecção, orientar a terapêutica a ser escolhida e ainda são uma importante ferramenta na monitorização e prevenção de patologias infecciosas. No presente trabalho são descritas metodologias laboratoriais realizadas durante o decorrer do estágio efetuado no Laboratório José Manuel Chau S.A., que permitem auxiliar o diagnóstico clínico de infecções microbianas. Devido à pandemia existente desencadeada pelo vírus Síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2), os laboratórios do Grupo Beatriz Godinho Saúde S.A. passaram a realizar testes para a sua deteção, o qual me possibilitou realizar uma análise que teve como objetivo avaliar até que ponto os dados existentes na literatura acerca da sintomatologia mais frequente e as comorbilidades associadas à Doença do Coronavírus-2019 (COVID-19), as idades e o sexo mais suscetível ao SARS-CoV-2 se verificam. Os dados a analisar foram recolhidos no Laboratório José Manuel Chau S.A. de 17 de março a 24 de junho de 2020. A análise englobou 1222 indivíduos que realizaram os testes para a deteção do SARS-CoV-2 no laboratório indicado. Dos 1222 em estudo, 93,54% obtiveram teste negativo para a COVID-19, sendo 5,32% positivos e 1,15% inconclusivos. As idades com mais casos COVID-19 verificaram-se ser entre os 31-60 anos. Dos indivíduos em estudo com COVID-19, 64,62% são do sexo feminino e 35,38% do sexo masculino. Na avaliação da sintomatologia dos casos COVID-19 positivos, 21,54% tiveram febre, 33,85% tosse seca, 10,77% dificuldade em respirar, 13,85% perda de olfato/paladar e 12,31% dores musculares. As comorbilidades mais referenciadas pelos casos positivos foram a diabetes com 4,62% e as doenças cardíacas com 6,15%. Estes resultados estão em concordância com o descrito na literatura.

Da comparação estatística realizada entre os testes negativos e positivos, apenas se encontrou correlação entre as variáveis “Resultado do teste” e “Esteve em contacto com casos confirmados”, com o valor de 0,102 pelo teste V de Cramér.

**keywords**

SARS-CoV-2, Microbial infections, Microorganisms, Laboratory methodologies, COVID-19

**abstract**

Laboratory methodologies play an important role in helping the clinical diagnosis of microbial infections, since they make it possible to identify the etiological agent of the infection, guide the therapy to be chosen and are still an important tool in monitoring and preventing infectious pathologies. This work describes laboratory methodologies carried out during the course of the internship at the José Manuel Chau S.A. Laboratory, which allow aiding the clinical diagnosis of microbial infections. Due to the existing pandemic triggered by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the laboratories of the Beatriz Godinho Saúde S.A. Group started to carry out tests for its detection, which enabled me to perform an analysis aimed at assessing the extent to which the data in the literature on the most frequent symptoms and comorbidities associated with Coronavirus Disease-2019 (COVID-19), the ages and sex most susceptible to SARS-CoV-2 are verified. The data to be analysed were collected at the José Manuel Chau S.A. Laboratory from 17 March to 24 June 2020. The analysis included 1222 individuals who performed the tests for the detection of SARS-CoV-2 in the indicated laboratory. Of the 1222 under study, 93.54% were negative for COVID-19, 5.32% positive and 1.15% inconclusive. The ages with more positive COVID-19 cases were found to be between 31-60 years. Of the individuals studied with COVID-19, 64.62% were female and 35.38% were male. In the evaluation of symptomatology of positive COVID-19 cases, 21.54% had fever, 33.85% had a dry cough, 10.77% had difficulty in breathing, 13.85% had loss of olfaction/taste and 12.31% had muscle pain. The comorbidities most reported for positive cases were diabetes with 4.62% and heart disease with 6.15%. These results are in line with those described in the literature.

From the statistical comparison between the negative and positive tests, only the variables "Test result" and "Been in contact with confirmed cases" were correlated, with the value of 0.102 by the Cramér's V Test.

## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas.....  | I   |
| Índice de Figuras.....  | III |
| Índice Tabelas.....   | VII |
| PARTE I - Introdução Geral.....   | 1   |
| 1. Introdução Geral.....  | 2   |
| 1.1. Caracterização do Laboratório José Manuel Chau S.A. e sua dinâmica de trabalho.....              | 3   |
| PARTE II - Procedimentos laboratoriais de auxílio ao diagnóstico clínico de infeções microbianas..... | 5   |
| 2.1. Setor de Microbiologia.....  | 6   |
| 2.1.1. Exame microscópico .....   | 7   |
| 2.1.1.1. Exame a fresco.....  | 8   |
| 2.1.1.2. Exame após coloração.....  | 8   |
| 2.1.1.2.1. Coloração de Gram .....  | 8   |
| 2.1.1.2.2. Coloração Ziehl-Neelsen.....   | 10  |
| 2.1.1.2.3. Coloração azul de metileno .....   | 10  |
| 2.1.2. Exame cultural .....   | 11  |
| 2.1.3. Testes de identificação presuntiva.....  | 16  |
| 2.1.3.1. Teste da oxidase .....   | 16  |
| 2.1.3.2. Teste da catalase.....   | 17  |
| 2.1.3.3. Teste de detecção da produção de indol e da enzima <i>triptofano desaminase</i> .....        | 18  |
| 2.1.3.4. Teste rápido para a detecção de <i>Streptococcus</i> do grupo B.....                         | 19  |
| 2.1.3.5. Teste da coagulase.....  | 20  |
| 2.1.4. Identificação de microrganismos - VITEK <sup>®</sup> 2 Compact.....                            | 21  |
| 2.1.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos .....   | 22  |
| 2.1.5.1. Método de difusão em disco.....  | 22  |
| 2.1.5.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos - VITEK <sup>®</sup> 2 Compact....                | 23  |
| 2.1.6. Colheita e processamento de produtos biológicos.....   | 24  |
| 2.1.6.1. Urina.....   | 25  |
| 2.1.6.1.1. Colheita.....  | 25  |



|   |    |
|---|----|
| 2.1.6.1.2. Análise Sumária de Urina.....  | 26 |
| 2.1.6.1.3. Urocultura.....  | 27 |
| 2.1.6.2. Sangue – Hemocultura.....  | 31 |
| 2.1.6.2.1. Colheita.....  | 31 |
| 2.1.6.2.2. Processamento laboratorial.....  | 32 |
| 2.1.6.3. LCR .....  | 33 |
| 2.1.6.3.1. Colheita.....  | 33 |
| 2.1.6.3.2. Processamento laboratorial.....  | 34 |
| 2.1.6.4. Trato respiratório superior – Exsudado nasal e exsudado orofaríngeo..... | 34 |
| 2.1.6.4.1. Colheita.....  | 34 |
| 2.1.6.4.2. Processamento laboratorial.....  | 35 |
| 2.1.6.4.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente.....    | 36 |
| 2.1.6.5. Exsudado auricular.....  | 38 |
| 2.1.6.5.1. Colheita.....  | 38 |
| 2.1.6.5.2. Processamento laboratorial.....  | 38 |
| 2.1.6.6. Expetoração.....   | 40 |
| 2.1.6.6.1. Colheita.....  | 40 |
| 2.1.6.6.2. Exame bacteriológico e micológico da amostra de expetoração.....       | 40 |
| 2.1.6.6.3. Pesquisa de BAAR.....  | 43 |
| 2.1.6.7. Exsudados purulentos.....  | 44 |
| 2.1.6.7.1. Colheita.....  | 44 |
| 2.1.6.7.2. Processamento laboratorial.....  | 44 |
| 2.1.6.8. Fezes.....   | 46 |
| 2.1.6.8.1. Exame macroscópico – fezes.....  | 46 |
| 2.1.6.8.2. Coprocultura.....  | 47 |
| 2.1.6.8.3. Pesquisa de <i>Campylobacter jejuni</i> .....                          | 48 |
| 2.1.6.8.4. Exame parasitológico.....  | 48 |
| 2.1.6.8.5. Pesquisa de <i>Helicobacter pylori</i> em amostras fecais.....         | 49 |
| 2.1.6.9. Exsudado retal .....   | 51 |
| 2.1.6.9.1. Colheita.....  | 51 |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.6.9.2. Processamento laboratorial.....  | 51 |
| 2.1.6.10. Exsudado uretral.....   | 52 |
| 2.1.6.10.1 Colheita.....  | 52 |
| 2.1.6.10.2. Processamento laboratorial.....   | 53 |
| 2.1.6.11. Exsudado vaginal .....  | 55 |
| 2.1.6.11.1. Colheita.....   | 55 |
| 2.1.6.11.2. Processamento laboratorial.....   | 56 |
| 2.1.6.12. Exsudado vaginal / retal – Pesquisa de <i>Streptococcus</i> do grupo B<br>..... | 58 |
| 2.1.6.12.1. Colheita.....   | 58 |
| 2.1.6.12.2. Processamento laboratorial.....   | 58 |
| 2.1.6.13. Fragmentos de unhas, cabelo e pele.....   | 59 |
| 2.1.6.13.1. Colheita .....  | 60 |
| 2.1.6.13.2. Processamento laboratorial.....   | 60 |
| 2.1.7. Controlo de qualidade.....   | 61 |
| 2.1.8. Conclusão.....   | 62 |
| 2.1.9. Referências Bibliográficas.....  | 63 |
| PARTE III - Detecção SARS-CoV-2.....  | 68 |
| 3.1. Introdução.....  | 69 |
| 3.1.1. COVID-19: Do surto à expansão global.....  | 71 |
| 3.1.2. COVID-19 em Portugal.....  | 74 |
| 3.1.3. Coronavírus.....   | 77 |
| 3.1.4. Origem do SARS-CoV-2.....  | 78 |
| 3.1.5. Estrutura do SARS-CoV-2.....   | 78 |
| 3.1.6. Patogenicidade.....  | 80 |
| 3.1.7. Infeciosidade .....  | 81 |
| 3.1.8. Transmissão.....   | 84 |
| 3.1.9. Sintomas .....   | 88 |
| 3.1.10. Suscetibilidade à infeção pelo SARS-CoV-2.....                                    | 88 |
| 3.1.11. Doença COVID-19.....  | 89 |
| 3.1.12. Detecção do SARS-CoV-2.....   | 90 |
| 3.1.13. Prevenção da propagação da COVID-19.....  | 92 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.1.14. Impacto da COVID-19 no mundo.....  | 94  |
| 3.2. Material e Métodos.....   | 97  |
| 3.2.1. População em estudo.....  | 97  |
| 3.2.2. Colheita de Exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo .....                             | 97  |
| 3.2.3. Recolha de dados.....   | 98  |
| 3.2.4. Extração do ácido ribonucleico do vírus SARS-CoV-2.....                           | 98  |
| 3.2.5. Pesquisa do SARS-CoV-2: <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> .....          | 98  |
| 3.2.6. Teste confirmatório para resultados SARS-CoV-2 positivos.....                     | 99  |
| 3.2.7. Análise estatística.....  | 100 |
| 3.3. Resultados e Discussão.....   | 101 |
| 3.3.1. Caracterização geral da população em estudo.....                                  | 101 |
| 3.3.2. Casos positivos versus casos negativos.....                                       | 103 |
| 3.4. Conclusão.....  | 113 |
| 3.5. Referências Bibliográficas.....   | 114 |
| PARTE IV - Conclusão geral .....   | 122 |
| 4. Conclusão geral.....  | 123 |
| Anexo.....   | 124 |
| Método difusão em disco: antibióticos e seus valores de referência para veterinária..... | 125 |

## **Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas**

ATCC - *American Type Culture Collection*

BAAR - Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

CARB - chromID<sup>®</sup> CARBA agar

CAN2 - chromID<sup>®</sup> Candida agar

CI - Controlo de amplificação

CI-ARN - Controlo de extração e controlo de inibição da RT-PCR

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

COS - Columbia agar com 5% sangue de ovelha

CoV - Coronavírus

COVID-19 - Doença do Coronavírus-2019

CPSE - chromID<sup>™</sup> CPS<sup>®</sup> Elite

CQE - Controlo de qualidade externo

CQI - Controlo qualidade interno

E - Proteína do envelope

ECA2 - Enzima conversora da angiotensina 2

EPC - *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HAE2 - Haemophilus Chocolate 2 agar

HEKT - Hektoen agar

ID - Identificação

IgM - Imunoglobulina M

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ITU - Infecção do trato urinário

ITUs - Infecções do trato urinário

KESC - Grupo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LJ - Lowenstein-Jensen

M - Proteína da membrana

MCK - MacConkey agar

MERS-CoV - Síndrome respiratória do Médio Oriente

MO - Microscópio ótico

MRSA - Meio cultura chromID™ *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* agar

MSA2 - Manitol Salt 2 agar

N - Proteína do nucleocapsídeo

NaCl - Cloreto de sódio

NSP - Proteínas não estruturais

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open reading frame*

pH - potencial hidrogeniónico

pp - poliproteínas

PSEC-AEFA - Programa de *Supervision Externa de la Calidad - Asociacion Española del Laboratorio Clínico*

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RNA - Ácido ribonucleico

RTC - *Replication - transcription complex*

RT-PCR - *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

S - Glicoproteína *Spike*

SAB B-T - Caldo Sabouraud

SAB CHL ACTI-T - Sabouraud Cloranfenicol actidiona agar

SARS-CoV - Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 - Síndrome respiratória aguda grave coronavirus – 2

SGB - *Streptococcus* do Grupo B

STRB - chromID® Strepto B agar

TSA - Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

UFC/ml - Unidades Formadoras de Colónias por mililitro

UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

VCA3 - Chocolate agar PolyViteX™ VCAT3

## Índice de Figuras

### PARTE II

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Imagem microscópica de bactérias Gram positivas, numa ampliação de 100x-bactérias com coloração roxa.....                              | 9  |
| <b>Figura 2:</b> Imagem microscópica de bactérias Gram negativas, numa ampliação de 100x-bactérias com coloração vermelha.....                          | 9  |
| <b>Figura 3:</b> Imagem microscópica de um esfregaço após coloração com azul de metileno, numa ampliação de 100x.....                                   | 11 |
| <b>Figura 4:</b> Teste oxidase negativo (lado esquerdo) e teste oxidase positivo (lado direito)..   | 17 |
| <b>Figura 5:</b> Ilustração dos resultados do teste da catalase - teste catalase negativo (lado esquerdo) e teste catalase positivo (lado direito)..... | 17 |
| <b>Figura 6:</b> Teste produção de indol positivo.....  | 18 |
| <b>Figura 7:</b> Teste deteção da enzima <i>triptofano desaminase</i> positivo.....   | 19 |
| <b>Figura 8:</b> Teste rápido para deteção de <i>Streptococcus</i> grupo B positivo.....  | 19 |
| <b>Figura 9:</b> Teste coagulase positivo, suspeita de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 20 |
| <b>Figura 10:</b> Equipamentos Aution Max AX- 4030 <sup>TM</sup> (lado direito) e sediMax (lado esquerdo).....  | 26 |
| <b>Figura 11:</b> Cultura de <i>Escherichia coli</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....                    | 29 |
| <b>Figura 12:</b> Cultura de <i>Proteus mirabilis</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....                   | 29 |
| <b>Figura 13:</b> Cultura de <i>Klebsiella pneumoniae</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....               | 30 |
| <b>Figura 14:</b> Cultura de <i>Enterococcus faecalis</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....               | 30 |
| <b>Figura 15:</b> Cultura de <i>Streptococcus agalactiae</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....            | 30 |
| <b>Figura 16:</b> Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.....              | 31 |
| <b>Figura 17:</b> SIGNAL <sup>TM</sup> Blood Culture System.....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 18:</b> Colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas em meio COS a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado nasal. Parte superior do meio referente à narina esquerda, e parte inferior à narina direita..... | 36 |
| <b>Figura 19:</b> Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio MSA2, a partir de uma amostra de exsudado nasal. Parte superior do meio referente à narina esquerda, e parte inferior à narina direita.....                             | 36 |
| <b>Figura 20:</b> Procedimento a adotar para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente em amostras de exsudados nasais.....  | 37 |
| <b>Figura 21:</b> Colónias suspeitas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente - colónias com coloração esverdeada no meio MRSA.....  | 37 |
| <b>Figura 22:</b> Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio COS a partir de uma amostra de exsudado auricular.....   | 39 |
| <b>Figura 23:</b> Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio MCK a partir de uma amostra de exsudado auricular.....   | 39 |
| <b>Figura 24:</b> Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio COS (lado esquerdo) e meio MSA2 (lado direito) a partir de uma amostra de exsudado auricular.....   | 39 |
| <b>Figura 25:</b> Procedimento de exame cultural para exame bacteriológico e micológico de amostras de expetoração.....   | 41 |
| <b>Figura 26:</b> Cultura de <i>Candida tropicalis</i> em meio CAN2, a partir do exame micológico de uma amostra de expetoração.....  | 42 |
| <b>Figura 27:</b> Colónias de <i>Serratia marcescens</i> isoladas em meio COS, a partir do exame bacteriológico de uma amostra de expetoração.....  | 42 |
| <b>Figura 28:</b> Colónias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas em meio COS, a partir do exame bacteriológico de uma amostra de expetoração.....   | 42 |
| <b>Figura 29:</b> Cultura de <i>Candida albicans</i> em meio CAN2, a partir do exame micológico de uma amostra de expetoração.....  | 42 |
| <b>Figura 30:</b> Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio COS a partir de uma amostra de exsudado de ferida facial.....   | 45 |
| <b>Figura 31:</b> Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio MSA2, a partir de uma amostra de exsudado de ferida facial.....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 32:</b> Colónias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (parte superior do meio) e <i>Staphylococcus haemolyticus</i> em meio COS (parte inferior do meio) isoladas a partir do exame cultural de um exsudado purulento de uma fístula..... | 46 |
| <b>Figura 33:</b> Cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio MCK a partir de uma amostra de uma fístula.....  | 46 |
| <b>Figura 34:</b> Procedimento para exame cultural das fezes.....   | 47 |
| <b>Figura 35:</b> Teste rápido <i>Campylobacter</i> <i>Balea</i> positivo.....  | 48 |
| <b>Figura 36:</b> Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> numa ampliação de 40x.....   | 49 |
| <b>Figura 37:</b> Cistos de <i>Giardia lamblia</i> numa ampliação de 40x.....   | 49 |
| <b>Figura 38:</b> Teste rápido Dedicio <sup>®</sup> <i>H. pylori</i> Ag (fezes), positivo e válido.....   | 50 |
| <b>Figura 39:</b> Colónias suspeitas do grupo KESC em meio CARB- colónias com coloração esverdeada.....   | 52 |
| <b>Figura 40:</b> Cultura de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> em meio VCA3, a partir o exame cultural de uma amostra de exsudado uretral.....   | 54 |
| <b>Figura 41:</b> Exame direto para coloração de Gram, numa ampliação de 100X de uma amostra de exsudado uretral - células epiteliais e bactérias Gram negativas.....   | 54 |
| <b>Figura 42:</b> Exame direto para coloração de azul de metileno de uma amostra de exsudado uretral, numa ampliação de 100x - presença de neutrófilos, linfócitos e diplococos intracelulares e extracelulares.....                            | 55 |
| <b>Figura 43:</b> Colónias de <i>Escherichia coli</i> isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.....  | 57 |
| <b>Figura 44:</b> Colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i> isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.....  | 57 |
| <b>Figura 45:</b> Colónias de <i>Enterococcus faecalis</i> isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.....   | 57 |
| <b>Figura 46:</b> Colónias sugestivas de <i>Streptococcus agalactiae</i> em meio STRB.....  | 59 |

### PARTE III

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Número de casos COVID-19 relatados pela OMS semanalmente e número de óbitos no mundo, no período de 30 de dezembro de 2019 e 4 de outubro 2020..... | 73 |
| <b>Figura 2:</b> Evolução diária de novos casos COVID-19 notificados em Portugal de 2 de março a 27 de abril de 2020.....  | 75 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 3:</b> Evolução diária de óbitos por COVID-19 em Portugal de 18 de março a 29 de abril de 2020.....                                      | 75  |
| <b>Figura 4:</b> Novos casos diários COVID-19 em Portugal.....   | 76  |
| <b>Figura 5:</b> Organização do genoma do SARS-CoV-2.....  | 79  |
| <b>Figura 6:</b> Indivíduos em estudo por classes de idades.....   | 101 |
| <b>Figura 7:</b> Percentagem de indivíduos do sexo masculino e feminino que realizaram o teste para pesquisa do SARS-CoV-2.....                    | 102 |
| <b>Figura 8:</b> Resultados do teste RT-PCR para a pesquisa do SARS-CoV-2.....   | 102 |
| <b>Figura 9:</b> Classes de idades em função do resultado do teste RT-PCR.....   | 103 |
| <b>Figura 10:</b> Sexo em função do resultado do teste RT-PCR.....   | 104 |
| <b>Figura 11:</b> Contacto com casos COVID-19 confirmados em função do resultado do teste RT-PCR.....  | 106 |
| <b>Figura 12:</b> Existência ou ausência de sintomas em função do resultado do teste RT-PCR.....   | 107 |
| <b>Figura 13:</b> Existência ou ausência de febre em função do resultado do teste RT-PCR...108   | 108 |
| <b>Figura 14:</b> Existência ou ausência de tosse seca em função do resultado do teste RT-PCR.....   | 108 |
| <b>Figura 15:</b> Existência ou ausência de dificuldade em respirar em função do resultado do teste RT-PCR.....                                    | 109 |
| <b>Figura 16:</b> Existência ou ausência de perda de olfato/paladar em função do resultado do teste RT-PCR.....                                    | 109 |
| <b>Figura 17:</b> Existência ou ausência de outros sintomas em função do resultado do teste RT-PCR.....  | 109 |
| <b>Figura 18:</b> Existência ou ausência de viagem ao estrangeiro em função do resultado do teste RT-PCR.....                                      | 110 |
| <b>Figura 19:</b> Patologias referidas pelos indivíduos com teste SARS-CoV-2 positivo e negativo.....  | 111 |
| <b>Figura 20:</b> Motivos de realização do teste para deteção do novo CoV referidas pelos indivíduos com teste SARS-CoV-2 positivo e negativo..... | 112 |

## **Índice Tabelas**

### **PARTE II**

**Tabela 1:** Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia.....12

**Tabela 2:** Microrganismos identificados de modo direto e presuntivo no meio CPSE e sua respectiva coloração.....29

**Tabela 3:** Classificação de amostras de expetoração para avaliação da sua qualidade para execução do exame bacteriológico, segundo critérios de Murray e Washington.....41

### **PARTE III**

**Tabela 1:** Correlações pelo teste V de Cramér entre a variável “Resultados positivos/negativos” e as restantes variáveis indicadas.....106

# **PARTE I**

## **Introdução geral**

# **1. Introdução Geral**

No âmbito da unidade curricular Dissertação/Projeto/Estágio, do Mestrado de Microbiologia, lecionado no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, o documento, por mim apresentado, foi elaborado com base no estágio curricular realizado no Laboratório José Manuel Chau S.A., pertencente ao grupo Beatriz Godinho Saúde, tendo início a 9 de setembro de 2019 e término a 24 de junho de 2020.

No decorrer do estágio curricular foi-me permitido a integração da rotina laboratorial inerente ao Setor de Microbiologia, bem como o acompanhamento e execução de atividades realizadas no Setor de Urinálise/Parasitologia, que auxiliam o diagnóstico microbiológico. Deste modo, no decorrer da rotina laboratorial, desempenhei diversas atividades, entre elas a colheita, receção e triagem de diversos produtos biológicos, para além do seu processamento com recurso a diversas técnicas e ainda efetuei a análise e interpretação dos resultados obtidos.

Os objetivos deste estágio curricular focaram-se, principalmente, na aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado e na aquisição de novas experiências e competências na área da microbiologia clínico-laboratorial.

No documento que apresento, serão apresentadas metodologias aplicadas no processamento de diversos produtos biológicos, bem como a sua finalidade, descrição das tarefas por mim executadas e ainda serão apresentados alguns resultados obtidos no decorrer do estágio curricular.

Por meio deste documento, apresento ainda um pequeno estudo com a finalidade de verificar até que ponto os dados sobre a sintomatologia mais frequente, as idades e o sexo de maior risco para o vírus Síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2) e as comorbilidades associadas à Doença do coronavírus-2019 (COVID-19) se verificam, perante os resultados emitidos por outras pesquisas.

## **1.1. Caracterização do Laboratório José Manuel Chau S.A. e sua dinâmica de trabalho**

O estágio curricular, integrado no Mestrado de Microbiologia, foi realizado no Laboratório José Manuel Chau S.A., que se encontra atualmente sob a direção técnica da Dr.<sup>a</sup> Ana Filipa Paredes, tendo como diretora técnica-adjunta a Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Estácio.

No ano de 2002, o laboratório no qual realizei estágio tornou-se membro do Grupo Beatriz Godinho Saúde, estando situado na Avenida Elísio de Moura em Coimbra. O Grupo Beatriz Godinho Saúde foi fundado em 1974, sob direção do Dr. Amado Elias Tomaz e da Dr.<sup>a</sup> Beatriz Godinho, incluindo 153 postos de colheita, com atividades em diversas áreas, nas quais se destacam as análises clínicas, clínicas médicas e uma vasta rede de farmácias. Dos 153 postos de colheita, 45 destes pertencem ao Laboratório José Manuel Chau S.A., encontrando-se dividido nos seguintes setores: Receção/Atendimento, Área de colheitas, Microbiologia, Urianálise/Parasitologia, Bioquímica/Imunologia, Hematologia/Coagulação e Faturação/ Conferência.

Diariamente, no laboratório são processadas, em média, entre 350 a 400 amostras provenientes dos postos de colheita que o laboratório possui, como também de clínicas e lares com os quais tem acordo. A rotina de trabalho diária inicia-se, em todos aos postos de colheita, com o registo dos dados e informações clínicas do utente, as análises prescritas pelo clínico no sistema informático *Edeia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>* e posterior colheita das amostras biológicas necessárias para execução das análises pedidas pelo médico.

O sistema informático *Edeia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>*, para identificação do utente e das suas respetivas amostras, utiliza um sistema código de barras, impresso em etiquetas, englobando o número interno atribuído ao utente e um sufixo (U0-urina; ZH-exsudados, entre outros) relativo à análise a ser realizada e ao tipo de produto biológico, permitindo assim facilitar o rastreamento das amostras. Este programa informático encontra-se em todos os postos de colheitas e secções do laboratório, possibilitando o acesso a todos os procedimentos efetuados, desde o registo dos dados do utente e análises a efetuar até à validação biopatológica dos resultados.

Após a realização das colheitas, as amostras são enviadas ao laboratório em malas térmicas devidamente acondicionadas. Aquando da chegada das amostras ao laboratório, estas são separadas e distribuídas para a secção do laboratório onde irão ser processadas, sendo

posteriormente registado no sistema informático a sua entrada no setor, através da leitura do respetivo código de barras.

As requisições que acompanham as amostras são enviadas para a secção de faturação/conferência, na qual é verificada a concordância entre: as análises e dados do utente presentes nas requisições médicas, com o que foi registado no programa informático *Edeia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>*. Caso seja detetada alguma discrepância (como por exemplo, troca ou falta de análises), a secção faturação/conferência comunica as alterações efetuadas para a respetiva secção laboratorial, de forma atempada, para que possam ser avaliados os parâmetros requisitados pelo clínico.

Em todas as secções, previamente ao processamento laboratorial das amostras, é executada a triagem das mesmas para verificar a existência de não conformidades que possam inviabilizar o seu processamento. Quando cumpridos todos os pressupostos segue-se a fase analítica, na qual é executada a análise solicitada pelo clínico, podendo ser realizada através de técnicas manuais ou em equipamentos de modo automatizado.

Terminada a fase analítica, em cada setor efetua-se a validação analítica dos resultados pelos técnicos responsáveis de cada setor, culminando todo o processo com a validação biopatológica pela diretora técnica e impressão dos boletins de resultados.

O trabalho realizado no Laboratório José Manuel Chau S.A., como em todos os membros do Grupo Beatriz Godinho Saúde, apresenta como missão a prestação de serviços de diagnóstico laboratorial de excelência e qualidade e a satisfação dos utentes pelos serviços prestados.

## **PARTE II**

### **Procedimentos laboratoriais de auxílio ao diagnóstico clínico de infecções microbianas**

## 2.1. Setor de Microbiologia

O Setor de Microbiologia apresenta como principal função a identificação de agentes etiológicos de infecções, tendo também um papel de extrema relevância no auxílio do diagnóstico clínico, monitorização e tratamento de doenças infecciosas.

Diariamente, neste setor, são analisados diversos produtos biológicos. Ao longo do estágio efetuei o processamento dos produtos biológicos a seguir indicados:

- Urina;
- Sangue;
- Líquido cefalorraquidiano (LCR);
- Exsudado nasal;
- Exsudado orofaríngeo;
- Exsudado auricular;
- Expetoração;
- Exsudado purulento;
- Fezes;
- Exsudado retal;
- Exsudado uretral;
- Exsudado vaginal;
- Fragmentos unhas, cabelo e pele

Os produtos biológicos destinados ao Setor de Microbiologia são rececionados e integrados no programa informático *Edeia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>*, sendo triados no setor Urinálise/Parasitologia. Quando cumpridos todos os pressupostos, as amostras são transportadas para o Setor de Microbiologia, acompanhadas da respetiva lista de trabalho, na qual consta o número de identificação da amostra, informação sobre o utente (idade, terapêutica, patologias, entre outros) e a análise a ser efetuada. Na lista de trabalho são registados todos os procedimentos efetuados, como também os resultados obtidos do processamento dos produtos biológicos, sendo posteriormente registados no programa informático *Edeia Lab<sup>®</sup> da Slice<sup>™</sup>*.

No Setor de Microbiologia executam-se diversas análises com recurso a várias metodologias microbiológicas, entre as quais o exame microscópico, exame cultural, testes



de identificação presuntiva, identificação de microrganismos no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux S.A., França) e teste de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA).

As análises a executar, bem como a valorização dos resultados, dependem de diversos fatores, como por exemplo o tipo de produto biológico a processar, os microrganismos a serem pesquisados e os microrganismos patogénicos capazes de causarem um processo infeccioso no local anatómico, no qual o produto biológico é colhido. Na valorização dos resultados as informações sobre o utente, como a idade, tratamentos, sintomatologia, tipo de utente (grávida, incontinente, etc.), entre outras informações, são relevantes para a sua valorização.<sup>(1)</sup>

A validação dos resultados é efetuada pelo responsável pelo setor, a Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Estácio ou, na sua ausência, pela Diretora Técnica Ana Filipa Paredes.

É de ressaltar que todos os procedimentos efetuados aos produtos biológicos, desde a fase da colheita, transporte da amostra ao laboratório, processamento laboratorial até à validação dos resultados, devem ser efetuados corretamente para alcançar um diagnóstico fiável e clinicamente relevante.<sup>(1)</sup>

Em suma, todas as atividades realizadas no Setor de Microbiologia têm como finalidade a obtenção de um diagnóstico exato, fiável e de fácil interpretação.

### **2.1.1. Exame microscópico**

O exame microscópico é referenciado como um dos métodos rápidos no diagnóstico microbiológico, representando uma das etapas iniciais no processo de caracterização e identificação de microrganismos.<sup>(2, 3)</sup> Este exame engloba o exame a fresco (o qual permite detetar a presença de elementos celulares e microrganismos diretamente do produto biológico) e o exame após coloração (permite realizar a caracterização e identificação presuntiva dos microrganismos, diretamente do produto biológico e dos microrganismos que crescem nos meios de cultura).<sup>(4)</sup>

Através da informação obtida do exame microscópico é possível realizar a identificação presuntiva do agente infeccioso presente no produto biológico a analisar, como também avaliar a qualidade das amostras, permitindo ainda determinar os testes de identificação posteriores a aplicar.<sup>(4)</sup>

### **2.1.1.1. Exame a fresco**

O exame a fresco consiste na realização de um esfregaço, diretamente a partir do produto biológico, numa lâmina sobre o qual se coloca uma lamela sendo posteriormente observado ao microscópio ótico (MO).<sup>(4)</sup>

Este exame permite detetar a presença e avaliar de forma semi-quantitativa elementos celulares e microrganismos (bactérias, parasitas, fungos) no produto biológico a processar.<sup>(4)</sup>

No Setor de Microbiologia o exame a fresco é aplicado no processamento de exsudados vaginais, exsudados uretrais e em amostras de fragmentos de unha, cabelo e pele.

### **2.1.1.2. Exame após coloração**

O exame microscópico de esfregaços de produtos biológicos após coloração permite avaliar características morfológicas dos microrganismos (a sua forma e afinidade para os corantes).<sup>(3,4)</sup> Os esfregaços podem ser executados a partir de colónias existentes nos meios de cultura ou efetuados diretamente a partir do produto biológico.

Quando os esfregaços se encontram secos, deve-se efetuar a sua fixação através do aquecimento moderado numa chama de bico *bunsen* e de seguida procede-se à execução da coloração.<sup>(3)</sup>

No Setor de Microbiologia realizam-se as seguintes colorações: Gram, Ziehl-Neelsen e azul de metileno.

#### **2.1.1.2.1. Coloração de Gram**

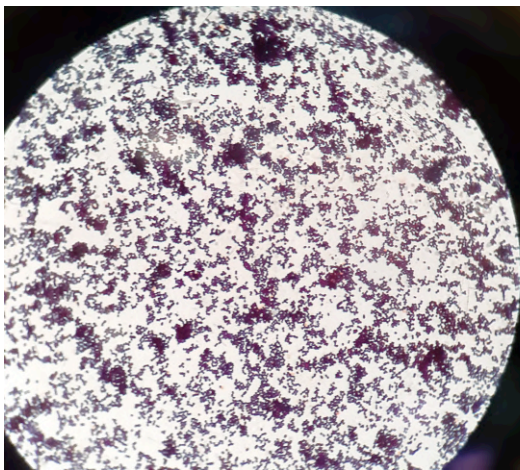
A coloração de Gram é uma ferramenta primária na caracterização e identificação de microrganismos, permitindo a divisão das bactérias em dois grupos, sendo eles bactérias Gram negativas (coloração vermelha) e Gram positivas (coloração roxa), segundo a permeabilidade da membrana e parede celular das bactérias aos corantes aplicados.<sup>(3,5)</sup>

Inicialmente procede-se à execução do esfregaço e fixação das bactérias à lâmina através de calor.<sup>(3-5)</sup> Quando terminada a fixação aplica-se o primeiro corante violeta de cristal (QCA, Espanha), durante um minuto, seguindo a colocação sobre o esfregaço da solução Lugol (QCA, Espanha), durante um minuto, que atua como fixador, aumentando a ligação do corante violeta de cristal à parede celular bacteriana.<sup>(3-5)</sup> Posteriormente aplica-se o diferenciador álcool-acetona (QCA, Espanha), até que não se verifique mais saída do

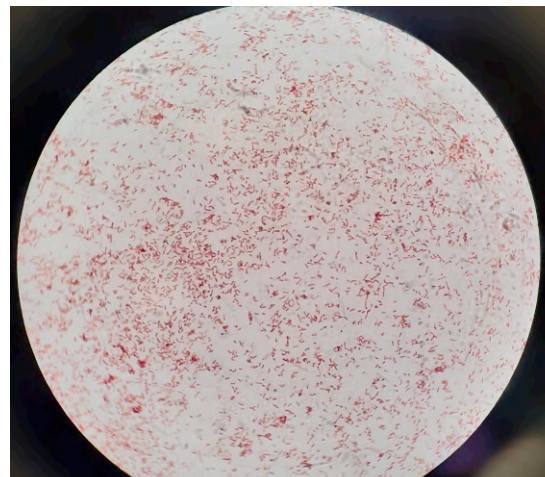
corante violeta de cristal e por fim é adicionado o segundo corante, fucsina básica (QCA, Espanha) durante um minuto. Entre a adição de cada reagente mencionado deve-se lavar a lâmina com água destilada de modo a retirar o excesso dos mesmos.<sup>(3-5)</sup>

As bactérias Gram positivas (representadas na Figura 1) possuem uma parede rica em peptidoglicanos, tornando estas bactérias impermeáveis à ação do diferenciador permanecendo com a cor do corante violeta de cristal, roxo.

No caso das bactérias Gram negativas (representadas na Figura 2), estas apresentam uma parede fina em peptidoglicanos, com maior teor em fosfolípidos, tornando a parede da bactéria mais permeável à ação do diferenciador, que irá criar porosidades na parede celular através da degradação dos fosfolípidos permitindo a remoção do corante violeta de cristal, sendo assim coradas pela fucsina básica, conduzindo a uma coloração vermelha.<sup>(3,5)</sup>



**Figura 1:** Imagem microscópica de bactérias Gram positivas, numa ampliação de 100x-bactérias com coloração roxa.



**Figura 2:** Imagem microscópica de bactérias Gram negativas, numa ampliação de 100x-bactérias com coloração vermelha.

#### **2.1.1.2.2. Coloração Ziehl-Neelsen**

A coloração de Ziehl-Neelsen é realizada na pesquisa de Bacilos Ácido-Álcool Resistentes (BAAR), designadamente de bactérias do género *Mycobacterium*, como por exemplo a *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>(3, 6)</sup>

Posteriormente à realização do esfregaço e sua fixação, procede-se à aplicação do primeiro corante, fucsina básica (durante cinco minutos) que apresenta afinidade pelas estruturas ácidas dos BAAR, corando-os de vermelho.<sup>(3, 4, 6)</sup>

De seguida, após a remoção do excesso do primeiro corante com água destilada, aplica-se o diferenciador, reagente ácido-álcool (durante um minuto) para remoção do corante fucsina básica de microrganismos (que não os BAAR) e outras estruturas que possam estar presentes nas amostras.<sup>(3, 4, 6)</sup>

Por fim, adiciona-se o segundo corante, o corante de contraste verde malaquita que cora as células e outros microrganismos que possam estar presentes na amostra de verde que, após a aplicação do diferenciador, perdem a coloração pela fucsina básica.<sup>(3, 4, 6)</sup>

Os BAAR devido à sua parede rica em ácidos micólicos e lípidos, torna estas bactérias resistentes ao diferenciador e à penetração do segundo corante, permanecendo com a coloração vermelha do primeiro corante, mesmo após aplicação do diferenciador.<sup>(3, 6)</sup>

Desta forma, os BAAR apresentam coloração vermelha, ao invés dos restantes elementos observados no esfregaço que surgem corados de verde.<sup>(3, 6)</sup>

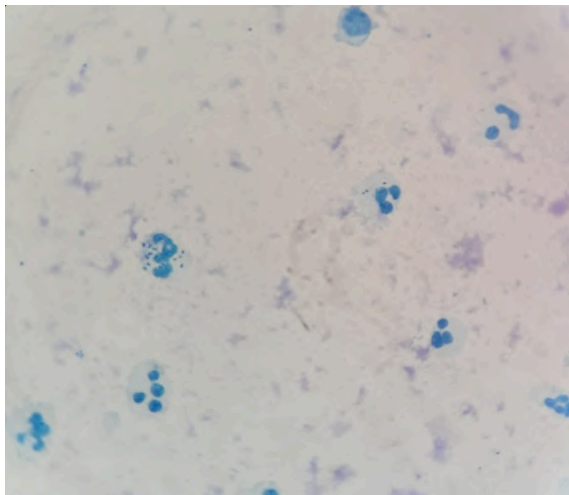
#### **2.1.1.2.3. Coloração azul de metileno**

A coloração azul de metileno é um método de coloração simples, que permite avaliar as características morfológicas das bactérias, sendo aplicada no processamento de exsudados vaginais e uretrais, auxiliando a coloração de Gram na deteção de *gonococci* que possam estar presentes nos produtos biológicos referidos.<sup>(4, 7)</sup>

Após a execução do esfregaço e sua fixação, coloca-se sobre o mesmo, durante cinco minutos, o corante azul de metileno, seguindo-se a remoção do excesso de corante com água destilada e deixando secar. Por fim observa-se o esfregaço ao MO.<sup>(4, 7)</sup>

O corante azul de metileno é catiónico, tendo afinidade para estruturas celulares com carga negativa, corando-as de azul. Nesta coloração, o núcleo das células apresenta uma coloração azul-escura, enquanto que o citoplasma das células e a microflora bacteriana coram de azul de diferentes intensidades.<sup>(4, 7)</sup>

Na Figura 3 pode observar-se a visualização microscópica de um esfregaço após coloração com azul de metileno.



**Figura 3:** Imagem microscópica de um esfregaço após coloração com azul de metileno, numa ampliação de 100x.

### **2.1.2. Exame cultural**

O exame cultural é considerado o principal exame convencional no diagnóstico microbiológico, pois permite a deteção de microrganismos que possam estar presentes nos produtos biológicos, causadores de processos infecciosos, por meio do seu crescimento em meios de cultura.<sup>(8)</sup>

Para a realização do exame cultural são utilizados meios de cultura, cuja seleção dependerá da natureza do produto biológico em estudo e do tipo de análise pedida. Na Tabela 1, encontram-se os meios de cultura utilizados no laboratório onde efetuei estágio.

**Tabela 1:** Meios de cultura utilizados no Setor de Microbiologia. (Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004<sup>(4)</sup> e bioMérieux SA., 2011<sup>(9)</sup>)

| Meios de cultura sólidos                        | Características  |
|---|--|
| <b>Columbia agar com 5% sangue ovelha (COS)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio não seletivo, permite o crescimento e isolamento da maioria dos microrganismos, tanto fastidiosos como não fastidiosos, com relevância para a microbiologia clínica;<sup>(9)</sup></li> <li>- O meio enriquecido com 5% sangue de ovelha possibilita a detecção de microrganismos capazes de gerar hemólise, como também identificar o tipo de hemólise gerada;<sup>(9)</sup></li> </ul>   |
| <b>chromID™ CPS® Elite (CPSE)</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio cromogénico que permite isolar e enumerar os microrganismos patogénicos que causam com maior frequência infeções do trato urinário (ITUs);<sup>(9)</sup></li> <li>- Possibilita a identificação de colónias tendo em conta as diferentes colorações que apresentam neste meio, resultado da atividade enzimática do microrganismo presente;<sup>(9)</sup></li> <li>- Permite a identificação direta de <i>Escherichia coli</i>, e presuntiva de <i>Enterococcus</i>, <i>Proteaeae</i> (<i>Proteus</i>, <i>Providencia</i>, <i>Morganella</i>), <i>Grupo Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i> (<i>KESC</i>) e ainda a identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i>.<sup>(9)</sup></li> </ul> |
| <b>Chocolate agar PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio seletivo para o isolamento das bactérias <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i>;<sup>(9)</sup></li> </ul>  |
| <b>Haemophilus Chocolate 2 agar (HAE2)</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio seletivo para o isolamento de diferentes espécies de <i>Haemophilus</i>;</li> </ul>  |
| <b>MacConkey agar (MCK)</b>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio de cultura seletivo para o isolamento de microrganismos Gram negativos;<sup>(9)</sup></li> <li>- Permite diferenciar bactérias fermentadoras de lactose de não fermentadoras de lactose. Microrganismos fermentadores apresentam colónias rosa/vermelho, não fermentadores colónias incolores;<sup>(9)</sup></li> </ul>  |

|   |  |
|---|--|
| <b>Hektoen agar (HEKT)</b>  | <p>- Meio seletivo e diferencial aplicado para o isolamento de espécies de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>;<sup>(9)</sup></p> <p>- Neste meio, colónias de <i>Salmonella spp.</i> apresentam uma tonalidade verde, podendo ter um centro preto devido à sua capacidade em produzir sulfureto de hidrogénio. Já as colónias de <i>Shigella spp.</i> apresentam uma coloração verde;<sup>(9)</sup></p> |
| <b>chromID<sup>®</sup> Strepto B agar (STRB)</b>  | - Meio de cultura cromogénico e seletivo utilizado no rastreio pré-natal de <i>Streptococcus</i> do Grupo B (SGB); <sup>(9)</sup>  |
| <b>chromID<sup>®</sup> Candida agar (CAN2)</b>  | <p>- Meio de cultura aplicado no isolamento seletivo de leveduras;<sup>(9)</sup></p> <p>- Meio cromogénico para <i>Candida albicans</i> permitindo a sua identificação direta;<sup>(9)</sup></p>   |
| <b>Manitol Salt 2 agar (MSA2)</b>   | <p>- Meio de cultura utilizado para o isolamento seletivo de <i>Staphylococcus spp.</i> e para a diferenciação de <i>Staphylococcus</i> fermentadores de manitol, de não fermentadores deste açúcar.<sup>(9)</sup></p> <p>- O aparecimento de colónias amarelas indica a fermentação do manitol, critério para identificação presuntiva de <i>Staphylococcus aureus</i>.<sup>(9)</sup></p>                         |
| <b>Meio cultura chromID<sup>™</sup> Methicillin-resistant Staphylococcus aureus agar (MRSA)</b> | - Meio de cultura cromogénico aplicado no <i>screening</i> direto de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente, cuja identificação é fundamentada pelo aparecimento de colónias verdes. <sup>(9)</sup>  |
| <b>chromID<sup>®</sup> CARBA agar (CARB)</b>  | - Meio cromogénico seletivo utilizado para a identificação seletiva e presuntiva de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases (EPC); <sup>(9)</sup>   |
| <b>Lowenstein-Jensen (LJ)</b>   | - Meio de cultura seletivo aplicado para o isolamento de <i>Mycobacterium spp.</i> . A existência de verde malaquita na sua composição inibe o crescimento de outros microrganismos; <sup>(9)</sup>  |
| <b>Sabouraud Cloranfenicol actidiona agar (SAB CHL ACTI-T)</b>                                  | <p>- Meio para o isolamento de Dermatófitos e outros fungos patogénicos;<sup>(9)</sup></p> <p>- Possui na sua composição cloranfenicol, cuja finalidade, consiste na inibição do crescimento da maioria das espécies bacterianas. A actidiona promove a inibição do crescimento de fungos saprófitas e de certas leveduras.<sup>(9)</sup></p>  |

| <b>Meios de cultura líquidos</b> | <b>Características</b>   |
|----------------------------------|--|
| <b>Caldo Todd-Hewitt</b>         | - Meio líquido de enriquecimento de utilização geral, sendo aplicado principalmente para cultura de <i>Streptococcus beta-hemolíticos</i> ; <sup>(9)</sup>   |
| <b>Caldo Selenito F</b>          | - Meio líquido de enriquecimento para o isolamento de <i>Salmonella spp. e Shigella spp.</i> a partir de amostras de fezes; <sup>(4)</sup>   |
| <b>Caldo Sabouraud (SAB B-T)</b> | - Meio líquido destinado para o crescimento de fungos; <sup>(9)</sup><br>- Possui peptonas e caseína de carne como fontes de compostos nitrogenados, potencial hidrogeniônico (pH) baixo e dextroses em concentrações elevadas, o que favorece o crescimento fúngico. <sup>(9)</sup> |

A inoculação dos produtos biológicos a serem analisados nos respectivos meios de cultura, pode ser efetuada com recursos a diversas técnicas. A maioria dos meios de cultura sólidos foram inoculados pela técnica de sementeira por esgotamento, com exceção do meio CPSE, utilizado para cultura de urina, para o qual a inoculação é realizada de forma a quantificar o número de colónias. Para tal executa-se que uma estria vertical central no meio da placa e de seguida estrias perpendiculares à estria central ao longo do meio.<sup>(4)</sup>

O meio sólido em tubo, SAB CHL ACTI-T, é inoculado em profundidade, por picada, e em superfície executando-se estrias na superfície do meio.<sup>(4)</sup>

Nos meios líquidos, a sua inoculação é realizada com o auxílio de uma seringa ou pipeta, se o produto for líquido. Caso o produto biológico seja sólido, este é mergulhado diretamente no meio líquido. No que se refere à realização de TSA, o meio de cultura é inoculado por inundação.<sup>(4)</sup>

Após a inoculação dos meios de cultura é importante definir as condições da fase de incubação (tempo, temperatura e atmosfera) a aplicar de modo a promover o crescimento de microrganismos que possam estar presentes no produto biológico a analisar.<sup>(4)</sup>

No Setor de Microbiologia são aplicadas duas atmosferas: a atmosfera de aerobiose e a atmosfera de 5 a 10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As atmosferas mencionadas são aplicadas tendo em consideração os microrganismos que podem causar infeção no local anatómico do qual o produto biológico a ser processado é nativo.



O tempo de incubação a aplicar pode variar de 18 horas a 60 dias, consoante os microrganismos que podem causar infeções no local anatómico onde a amostra a analisar foi colhida.

Posteriormente ao período de incubação, procede-se à observação e apreciação macroscópica das culturas, onde são avaliados diversos fatores, sendo estes:<sup>(4)</sup>

- Aspeto macroscópico das colónias (forma, dimensão, produção de pigmento, margem, superfície)
- Perante crescimento microbiano, avaliar a existência de um só tipo de colónias ou mais que um tipo de colónias;
- Avaliar a presença ou ausência de hemólise e caso esteja presente identificar qual o tipo de hemólise;
- Avaliar a existência ou ausência de halos de inibição (por exemplo quando se realiza TSA pelo método Kirby-Bauer);
- Verificar alteração da coloração dos meios de cultura;

Posteriormente à inoculação e incubação dos meios de cultura, no momento da sua observação e análise, com base no crescimento microbiano existente, podem obter-se os seguintes resultados:

- Cultura com ausência de crescimento microbiano;
- Cultura com ausência de crescimento microbiano predominante ou significativo;
- Cultura com crescimento microbiano predominante ou significativo;
- Cultura polimicrobiana (existência de três ou mais estirpes microbianas diferentes);

Ao longo do trabalho laboratorial, no Setor de Microbiologia são analisados diariamente dois tipos de culturas, sendo elas as culturas primárias e as repicagens. No que se refere às culturas primárias, estas consistem na execução de culturas a partir da amostra do produto biológico colhido. Relativamente às repicagens, estas englobam a realização de culturas a partir de colónias existentes nas culturas primárias, com a finalidade de isolar o microrganismo de interesse, obtendo-se assim culturas puras que são fulcrais para identificação e TSA, dos microrganismos em estudo.

Os resultados obtidos do exame cultural permitem definir os passos seguintes a aplicar para caracterização e estudo dos microrganismos de interesse, sendo valorizados tendo em conta diversos fatores, entre os quais o tipo de produto biológico, o método de colheita utilizado e informação clínica do utente.<sup>(4)</sup>

### **2.1.3. Testes de identificação presuntiva**

Os testes de identificação presuntiva são utilizados para ajudar na orientação da escolha das cartas de identificação (ID) e TSA a aplicar para o agente etiológico da infecção em questão.

No Setor de Microbiologia, são utilizados testes que se baseiam nas características metabólicas dos microrganismos e em reações antigénio/anticorpo (designados testes de aglutinação) que permitem a obtenção de informações relevantes para os procedimentos a adotar.

Contudo, é de ressaltar que estes testes não substituem a identificação e TSA efetuados no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux, França).

Ao longo deste ponto, são descritos os testes de identificação presuntiva efetuados ao longo do estágio.

#### **2.1.3.1. Teste da oxidase**

O teste da oxidase permite a deteção da enzima *citocromo oxidase* sintetizada por algumas bactérias.<sup>(4, 10)</sup> Através deste teste é possível distinguir *Enterobacteriaceae spp.* (oxidase negativas) de não *Enterobacteriaceae spp.* (oxidase positivas).<sup>(4, 10)</sup>

Para a execução deste teste é utilizado o Reagente Oxidase (bioMérieux S.A., França), do qual se deve aplicar uma gota sobre a tira teste e em seguida efetuar a inoculação de uma colónia sobre o reagente. No caso da enzima *citocromo oxidase* estar presente, esta irá reagir com o composto fenilenodiamina (constituente do reagente oxidase) oxidando-o, ocorrendo a formação de um composto com cor violeta, sendo considerado teste positivo.<sup>(4, 10)</sup>

A ausência da formação da cor violeta na tira teste, indica que a bactéria não possui a enzima *citocromo oxidase* e o teste é considerado negativo.<sup>(4, 10)</sup>

A Figura 4 a seguir representada, reflete o resultado de um teste oxidase negativo e um teste oxidase positivo.



**Figura 4:** Teste oxidase negativo (lado esquerdo) e teste oxidase positivo (lado direito).

### 2.1.3.2. Teste da catalase

O teste da catalase tem por base demonstrar a presença da enzima *catalase*, permitindo distinguir bactérias produtoras desta enzima, como *Staphylococcus spp.* (catalase positivos) de bactérias não produtoras da enzima *catalase*, como os *Streptococcus spp.* (catalase negativos).<sup>(4, 11)</sup> A *catalase* é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água.<sup>(12)</sup>

Para a realização deste teste coloca-se uma gota do reagente teste (contém água oxigenada) do *Kit ID Color Catalase* (bioMérieux S.A., França) numa lâmina na qual se inocula uma colónia do microrganismo em estudo. Quando se observa a formação de bolhas (Figura 5), o teste é considerado positivo evidenciando a presença da enzima *catalase*. A formação de bolhas resulta da libertação de água e oxigénio, resultado da hidrólise do peróxido de hidrogénio pela enzima.<sup>(4, 12)</sup>

Na ausência da formação de bolhas, o teste é considerado negativo, ou seja, o microrganismo presente não possui a enzima *catalase*.<sup>(4, 12)</sup>



**Figura 5:** Ilustração dos resultados do teste da catalase - teste catalase negativo (lado esquerdo) e teste catalase positivo (lado direito).

### 2.1.3.3. Teste detecção da produção de indol e da enzima *triptofano desaminase*

Este teste é aplicado para evidenciar a capacidade de certas bactérias em produzir indol, como também para detetar a presença da enzima *triptofano desaminase*, possibilitando a diferenciação presuntiva dos membros da família *Enterobacteriaceae* que possuem estas características.<sup>(13, 14)</sup>

Para a execução deste teste é utilizado o *Kit ID indol TDA* (bioMérieux S.A., França). A produção de indol é evidenciada quando numa tira teste se coloca uma gota de reagente de *Kovacs* e inocula-se nesta uma colónia do microrganismo em estudo, observando-se uma cor azul, indicando a presença de uma bactéria que sintetiza a enzima *triptofanase* que degrada o triptofano em indol, que por sua vez reage com o reagente *Kovacs* do *kit* levando ao aparecimento da cor mencionada, considerando-se assim o teste positivo (Figura 6).<sup>(13, 14)</sup>



**Figura 6:** Teste produção de indol positivo.

Na detecção da enzima *triptofano desaminase*, a partir de culturas em meios que contenham na sua composição triptofano, ao aplicar o reagente 2 do *kit* (que possui perclorato de ferro) sobre as colónias, verifica-se a formação de uma coloração acastanhada, resultado da presença da enzima *triptofano desaminase* que degrada o triptofano, libertando ácido indol-pirúvico, o qual reage com os sais de ferro originando a coloração mencionada, considerando-se assim o teste positivo (Figura 7).<sup>(13)</sup>

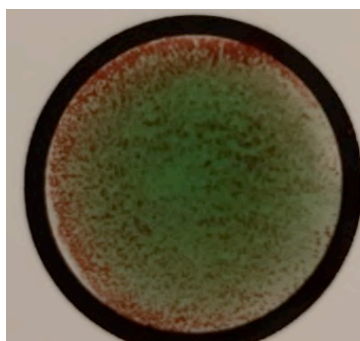


**Figura 7:** Teste deteção da enzima *triptofano desaminase* positivo.

#### **2.1.3.4. Teste rápido para a deteção de *Streptococcus* do grupo B**

O teste rápido para a deteção de *Streptococcus* do grupo B é efetuado com o recurso ao *Kit* Pastorex™ Strep B Latex (Bio-Rad Laboratories, França) que consiste numa prova de aglutinação rápida para deteção qualitativa de antígenos específicos do *Streptococcus* do grupo B.<sup>(15)</sup>

A execução deste teste inicia-se com uma extração enzimática simples dos antígenos bacterianos. Posteriormente à extração dos antígenos, a deteção dos mesmos é realizada com recurso a partículas de látex que estão sensibilizadas com anticorpos homólogos específicos para os antígenos das bactérias SGB. Aquando da presença de antígenos homólogos SGB, as partículas de látex reagem com os antígenos, aglutinando, observando-se a formação de grumos, o que representa a existência de um teste positivo (Figura 8) para a identificação presuntiva de SGB.<sup>(15, 16)</sup>



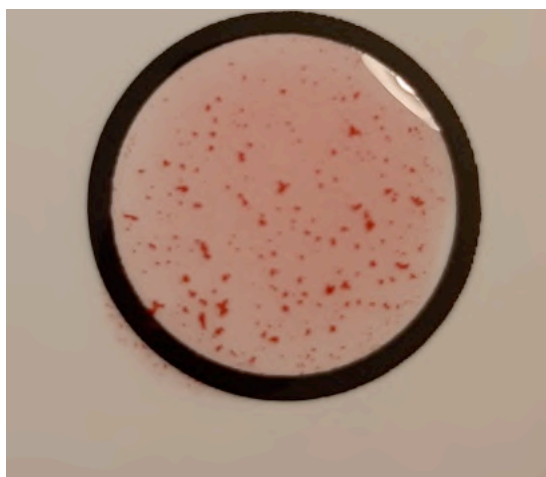
**Figura 8:** Teste rápido para deteção de *Streptococcus* grupo B positivo.

### 2.1.3.5. Teste da coagulase

O teste da coagulase tem por base evidenciar a presença da enzima *coagulase*, permitindo distinguir *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo) de outros *Staphylococcus spp.* (coagulase negativos).<sup>(4, 17)</sup>

Este teste consiste numa prova rápida de aglutinação, executada a microrganismos cujo teste catalase revelou-se positivo, com a finalidade de detetar em simultâneo três componentes: o fator afinidade para o fibrinogénio, proteína A e polissacarídeos capsulares de *Staphylococcus aureus*, com recurso ao *Kit PASTOREX™ STAPH-PLUS* (Bio-Rad Laboratories, França).<sup>(4, 17)</sup>

Aquando da realização do teste, caso se observe aglutinações macroscópicas, significa que o teste é positivo (Figura 9), permitindo realizar a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*.<sup>(4, 17)</sup>



**Figura 9:** Teste coagulase positivo, suspeita de *Staphylococcus aureus*.

#### **2.1.4. Identificação de microrganismos - VITEK<sup>®</sup> 2 Compact**

A identificação de agentes etiológicos em estudo, ao nível da espécie, suspeitos de estarem na génese de uma infeção, é efetuada através do sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux S.A., França).

O sistema automatizado mencionado utiliza cartas de ID que possuem micropoços constituídos por diferentes substratos que possibilitam monitorizar o crescimento microbiano e a atividade metabólica associada, através da alteração da cor e /ou turvação que são medidas por colorimetria e turbidimetria, pelo leitor do equipamento, permitindo assim identificar de forma rápida e precisa dos microrganismos em estudo.<sup>(18-20)</sup>

As cartas de ID são selecionadas tendo em consideração os resultados obtidos do exame cultural (características macroscópicas das colónias), dos resultados do exame microscópico e de testes de identificação presuntiva que tenham sido efetuados.<sup>(18-20)</sup>

Aquando da escolha das cartas de ID, estas são utilizadas após se efetuar uma suspensão microbiana, a partir de culturas puras, em solução salina [0,45% de cloreto de sódio (NaCl)], com uma densidade ótica específica para o microrganismo em estudo, de acordo com a escala de *McFarland*.<sup>(18-20)</sup>

Após a obtenção da suspensão bacteriana, as cartas de ID selecionadas são colocadas num suporte específico, sendo que cada uma tem um tubo associado com a correspondente suspensão microbiana de densidade ótica conhecida, seguindo-se a sua inserção no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact que irá aspirar a suspensão para o interior dos micropoços e proceder à incubação. O equipamento mencionado realiza leituras periódicas, analisando automaticamente as alterações de cor e/ou turvação, emitindo o resultado obtido para um computador anexado ao equipamento, através do qual nos permite saber a identificação do microrganismo em estudo.<sup>(18-20)</sup>

No Setor de Microbiologia as cartas de ID utilizadas são:

- Carta de VITEK<sup>®</sup> 2 ID de bactérias Gram negativas;
- Carta de VITEK<sup>®</sup> 2 ID de bactérias Gram positivas;
- Carta de VITEK<sup>®</sup> 2 ID de *Haemophilus*, *Neisseria* e outras bactérias Gram negativas fastidiosas;

A identificação de microrganismos fastidiosos é realizada pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para o qual é enviado a placa com o microrganismo a

identificar, com exceção do *Campylobacter spp.* cuja amostra é enviada para o Laboratório Joaquim Chaves, com o qual o Laboratório José Manuel Chau S.A. tem acordo.

No que diz respeito às leveduras, quando ocorre crescimento no meio CAN2 é realizada uma repicagem das colónias da cultura primária para novo meio de CAN2 que é posteriormente enviada para o laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas S.A., pertencente ao grupo Beatriz Godinho Saúde, que executa a sua identificação.

### **2.1.5. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos**

A resistência microbiana a antibióticos representa uma ameaça a nível mundial, gerando uma crescente preocupação para a saúde humana, animal e ambiental, como também para a economia global.<sup>(21, 22)</sup>

Uma vez que a etiologia da resistência a antimicrobianos é multifacetada, não demonstrando estas resistências sinais de declínio, causando consequências com impacto mundial, o papel dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos torna-se crucial para a redução do desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos por microrganismos patogénicos e ainda para a diminuição do tempo de tratamento e garantir a sua eficácia.<sup>(21, 22)</sup>

Para avaliar a suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, no local onde realizei estágio são executados TSA automatizados e pelo método difusão em disco, auxiliando o clínico na tomada de decisão da terapêutica a aplicar.

#### **2.1.5.1. Método difusão em disco**

O método de difusão em disco, também designado como método de Kirby-Bauer, é aplicado, no Setor de Microbiologia, a microrganismos existentes em produtos biológicos provindos de veterinárias, com as quais o laboratório José Manuel Chau S.A. tem acordo.

Inicialmente efetua-se uma suspensão em solução salina estéril (0,45% NaCl), com uma densidade ótica de 0,5 na escala *de McFarland*, a partir de uma cultura pura, seguindo-se a inoculação da suspensão no meio COS, pela técnica de sementeira por inundação.<sup>(4)</sup>

Após a inoculação do meio de cultura, procede-se à aplicação dos discos impregnados com os antibióticos a testar, incubando o meio numa atmosfera de aerobiose, durante 18 a 24 horas, a 37 °C.<sup>(4)</sup>



Posteriormente ao tempo de incubação são medidos os halos de inibição (o seu diâmetro), comparando os mesmos com os valores tabelados de TSA para veterinária, segundo as normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), reportando os resultados como sensível, intermédio ou resistente (Anexo - Método de difusão em disco: antibióticos e seus valores de referência para veterinária).<sup>(4)</sup>

#### **2.1.5.2. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos- VITEK<sup>®</sup> 2 Compact**

O TSA automatizado, realizado no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, é efetuado com recurso a cartas de TSA que contêm micropoços, constituídos por antibióticos, com diferentes concentrações de micropoço para micropoço.<sup>(18, 19)</sup>

As cartas de TSA são selecionadas tendo em consideração o microrganismo que fora identificado.<sup>(18, 19)</sup>

Previamente à utilização das cartas de TSA é preparada uma suspensão em meio salino, a partir da suspensão realizada para identificação do microrganismo em questão.<sup>(18, 19)</sup>

Após a preparação da suspensão, coloca-se a mesma com a respetiva carta de TSA no suporte apropriado, transferindo-o para o equipamento que irá aspirar a suspensão, inoculando cada micropoço, incubando e efetuando leituras periódicas do crescimento microbiano em cada micropoço.<sup>(18, 19)</sup>

O equipamento mede o crescimento microbiano por turbidimetria, sendo os resultados obtidos transmitidos para um computador anexado ao equipamento, o que permite analisar as informações fornecidas. A suscetibilidade a cada antimicrobiano testado é fornecida em valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI), segundo as normas de EUCAST.<sup>(18, 19)</sup>

As cartas de TSA utilizadas durante o estágio, existentes no Setor de Microbiologia são:

- Carta AST - N359: aplicado para *Enterobacteriaceae spp.*;
- Carta AST - P586: aplicado a microrganismos Gram positivos, em específico para *Enterococcus spp. e Streptococcus agalactiae*;
- Carta AST - P648: aplicado para *Staphylococcus spp.*;
- Carta AST - ST03: aplicado para *Streptococcus spp.*, em específico para *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus viridans e Streptococcus beta-hemolíticos*;
- Carta AST - N373: aplicado a microrganismos Gram negativos, não fermentadores, principalmente a *Pseudomonas spp. e Acinetobacter spp.*;

O TSA de microrganismos fastidiosos é realizado em laboratórios externos com os quais o laboratório José Manuel Chau S.A. tem acordo. Relativamente aos fungos, o TSA é realizado no laboratório Labeto-Centro de Análises Bioquímicas S.A., pertencente ao Grupo Beatriz Godinho Saúde.

### **2.1.6. Colheita e processamento de produtos biológicos**

Nos vários postos de colheita que o Laboratório José Manuel Chau S.A. possui, encontram-se técnicos especializados que efetuam colheitas de vários produtos biológicos (com exceção dos produtos para os quais a sua colheita requer intervenção médica) aplicando de forma correta as condições de assepsia e os procedimentos adequados para a colheita, de acordo com o produto biológico a obter.

O técnico é também responsável pelo transporte adequado dos produtos ao laboratório, sendo crucial que esta etapa, como também a etapa da colheita, seja efetuada corretamente para se obter um diagnóstico microbiológico fiável.

No laboratório, as amostras de produtos biológicos destinadas a análises microbiológicas são encaminhadas do setor de Urinálise/Parasitologia, após a sua receção, para o Setor de Microbiologia para prosseguir com o seu processamento e, se assim protocolado, será efetuado:

- Exame macroscópico;
- Exame microscópico (a fresco e/ou após coloração de Gram, Ziehl-Neelsen e/ou azul de metileno);
- Exame cultural;
- Testes imunocromatográficos;
- Identificação e TSA (realizados em equipamento automatizado, das culturas onde o crescimento microbiano é valorizável);

As amostras que apresentem prescrição médica para exame parasitológico, permanecem e são processadas no setor Urinálise/Parasitologia.

### **2.1.6.1. Urina**

Em indivíduos saudáveis, a urina quando produzida e presente na bexiga é estéril, não existindo contaminação microbiana. Contudo, durante o processo de micção ocorre contaminação da urina aquando da sua passagem através da região terminal da uretra, pela flora normal da uretra.<sup>(23)</sup> A presença de microrganismos na urina nem sempre é indicativa de infeção do trato urinário (ITU), uma vez que pode ocorrer a sua contaminação pela flora comensal da uretra, dificultando o diagnóstico de uma possível ITU.<sup>(24)</sup>

As infeções de trato urinário são um problema grave de saúde pública, sendo uma das infeções mais frequentes no ser humano e um dos tipos de infeção nosocomial mais comum.<sup>(25)</sup>

De acordo com o local do aparelho urinário onde a infeção ocorre, as ITUs podem ser classificadas de ITU superior (afetando rins, designada de pielonefrite) e ITU inferior (afetando uretra e bexiga, sendo designadas respetivamente de uretrite e cistite).<sup>(26, 27)</sup>

As infeções urinárias são desencadeadas por uma ampla gama de microrganismos, sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico que causa com maior frequência este tipo de infeções. A nível populacional a prevalência e incidência de ITUs apresentam valores mais elevados no sexo feminino.<sup>(25)</sup>

Perante a suspeita de ITU, o Setor de Microbiologia apresenta um papel relevante no auxílio do diagnóstico clínico, uma vez que deteta e estuda o agente causador da infeção em questão, através do processamento laboratorial de amostras de urina, sendo a análise deste produto maioritariamente bacteriológica (urocultura). No Setor de Microbiologia em conjunto com a execução da urocultura é sempre realizada a análise sumária de urina. Para uma deteção correta do agente infeccioso é crucial que todos os procedimentos sejam efetuados de forma adequada, entre eles a fase da colheita de urina.

#### **2.1.6.1.1. Colheita**

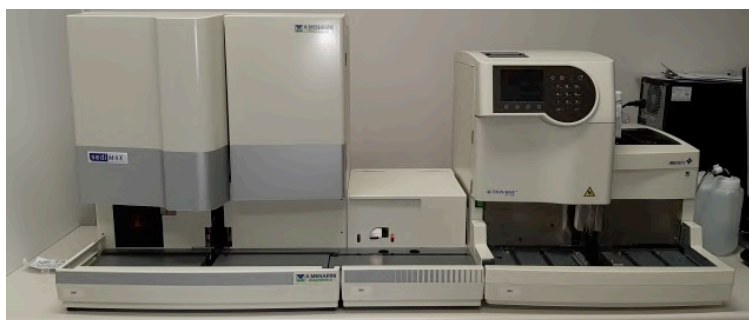
No decorrer do estágio pode constatar que a maioria das amostras de urina processadas, são colhidas pelo próprio utente, através do método de micção “jato médio”. O utente é aconselhado a colher a primeira urina da manhã, recolhendo o jato intermédio diretamente para um frasco esterilizado próprio, após desprezar o primeiro jato. Previamente à colheita o utente deverá limpar a região genital com água e sabão.<sup>(4, 28)</sup>

A urina também pode ser colhida através de outros métodos, como por exemplo saco coletor, punção supra-púbica e sonda vesical.<sup>(4, 28)</sup>

As amostras de urina são enviadas ao laboratório em malas térmicas refrigeradas a 4-10°C.<sup>(4)</sup>

#### 2.1.6.1.2. Análise Sumária de Urina

A análise sumária de urina, também designada de urina tipo II, é a urianálise realizada com maior frequência na rotina laboratorial do Setor de Urianálise/Parasitologia, através da qual é possível avaliar diversos parâmetros na urina que nos permitem auxiliar o diagnóstico de ITU, como também no auxílio de diversas patologias, tais como a diabetes e problemas hepáticos.<sup>(24, 29)</sup> Esta análise engloba duas determinações: a análise qualitativa e semi-quantitativa dos parâmetros físicos e químicos da urina e a análise semi-quantitativa do sedimento urinário, sendo realizadas respectivamente, de forma sequencial e automatizada, nos equipamentos Aution Max AX- 4030<sup>TM</sup> e sediMax (A. MENARINI *diagnostics*, Itália) representados na Figura 10.<sup>(24)</sup>



**Figura 10:** Equipamentos Aution Max AX- 4030<sup>TM</sup> (lado direito) e sediMax (lado esquerdo).

Os parâmetros físicos da urina analisados, englobam a densidade (determinada pelo índice de refração), a cor (determinada por refletância) e a turvação (medida através da dispersão da luz). A análise dos parâmetros químicos da urina é executada com recurso a tiras teste [URIFLET S 9UB (ARKRAY EUROPE, B.V., Países Baixos)], que contêm áreas impregnadas com reagentes que detetam a presença ou ausência dos analitos quando em contacto com a urina, conduzindo ao aparecimento de diferentes cores, sendo a refletância lida pelo equipamento.<sup>(24, 30)</sup>

Os parâmetros químicos analisados englobam o pH, glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, sangue, corpos cetónicos, nitritos e leucócitos.<sup>(24)</sup>

Após a avaliação dos parâmetros físicos e químicos da urina, as amostras seguem para o segundo equipamento (sediMax) para análise automatizada do sedimento urinário onde são avaliados os elementos figurados da urina: células (leucócitos, eritrócitos e células epiteliais), microrganismos, cilindros, cristais, entre outros elementos.<sup>(24, 31)</sup>

O equipamento sediMax permite a obtenção de imagens do sedimento urinário (de 15 campos), enviadas para um computador anexado ao equipamento, através das quais os técnicos presentes no setor de Urianálise/Parasitologia efetuam a validação e correções dos resultados da análise do sedimento urinário obtidos pelo equipamento.<sup>(31)</sup>

No decorrer da interpretação dos resultados obtidos da análise urina tipo II, decorrente da avaliação dos parâmetros químicos da urina na existência de nitritos e leucócitos poderemos estar perante uma possível infecção urinária.<sup>(29)</sup> Em conjunto com os resultados da avaliação dos parâmetros químicos, se na avaliação do sedimento urinário se verificar a presença de um valor igual ou superior a 10 leucócitos por campo, como também a existência de microrganismos, pode indicar-nos a presença de uma possível infecção urinária.<sup>(29)</sup>

Perante uma ITU é comum também verificar-se a presença de eritrócitos, no sedimento urinário. Estes resultados auxiliam o diagnóstico de ITU.<sup>(29)</sup>

### **2.1.6.1.3. Urocultura**

A urocultura é considerada o exame laboratorial padrão para auxiliar o diagnóstico clínico de ITU, tendo como finalidade a identificação do agente causador da infecção em questão. Esta análise consiste na execução de um exame cultural das amostras de urina.<sup>(32)</sup>

Neste exame, as amostras são semeadas no meio de cultura CPSE e incubadas em aerobiose, a 37 °C durante 18-24 horas. Quando terminado o tempo de incubação, procede-se à leitura do meio de cultura, efetuando-se a contagem de Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/ml).

O meio CPSE permite uma contagem otimizada e facilitada de UFC/ml, realizada de modo presuntivo mediante o método de sementeira padronizada para este meio.<sup>(9)</sup>

Os resultados da contagem de UFC/ml podem variar entre valores iguais ou inferiores a  $10^3$  UFC/ml a valores iguais ou superiores a  $10^5$  UFC/ml.<sup>(4, 32)</sup> Uma urocultura é normalmente considerada positiva perante um crescimento microbiano igual ou superior a  $10^5$  UFC/ml, com um ou dois microrganismos isolados, sendo indicativo de uma provável

infecção urinária.<sup>(4, 32)</sup> Perante um crescimento  $10^4$  a  $10^5$ , o resultado é reportado como sendo duvidoso, carecendo da avaliação manual do sedimento urinário.<sup>(32)</sup> Na ausência de qualquer crescimento microbiano a urocultura é considerada negativa.<sup>(4, 32)</sup> Durante a contagem UFC/ml perante um crescimento igual ou inferior a  $10^3$  UFC/ml, o resultado é reportado como provável contaminação, não existindo um desenvolvimento valorizável.<sup>(4, 32)</sup> Em uroculturas com um crescimento de três ou mais microrganismos, estas são consideradas polimicrobianas, sendo o resultado emitido como contaminação pela microbiota comensal da uretra.<sup>(4, 32)</sup>

É de salientar que na valorização da contagem de UFC/ml deverá ter-se em consideração diversos parâmetros, tais como o tipo de utente (idoso, grávida, entre outros), os resultados da avaliação do sedimento urinário, o método da colheita e a sintomatologia.<sup>(28)</sup>

No Setor de Microbiologia, quando o crescimento em placa é considerado duvidoso e não se encontrando em concordância com os resultados da avaliação do sedimento urinário no equipamento sediMAX, relativamente à presença de uma possível infecção urinária, é realizado um esfregaço do sedimento urinário das amostras para execução da coloração de Gram (quando o número de leucócitos é superior a 15 células por campo) e/ou a coloração de Ziehl-Neelsen (quando o número de leucócitos for superior a 30 células por campo), tendo como finalidade confirmar a existência de microrganismos em número significativo para que se possa considerar a existência de uma possível ITU e valorizar o crescimento em placa.

Nas culturas positivas procede-se à identificação e TSA do agente etiológico da infecção. Quando o agente etiológico presente é *Escherichia coli* (colónias com coloração rosa no meio CPSE) apenas se efetua o TSA.

O meio CPSE, para além da contagem UFC/ml otimizada, permite também realizar a identificação direta de *Escherichia coli* e presuntiva do grupo *Proteaeae*, *Enterococcus*, grupo *KESC* e *Streptococcus agalactiae*, de acordo com a coloração que estas bactérias apresentam no meio de cultura, sendo revelador da sua atividade enzimática específica.<sup>(9, 33)</sup>

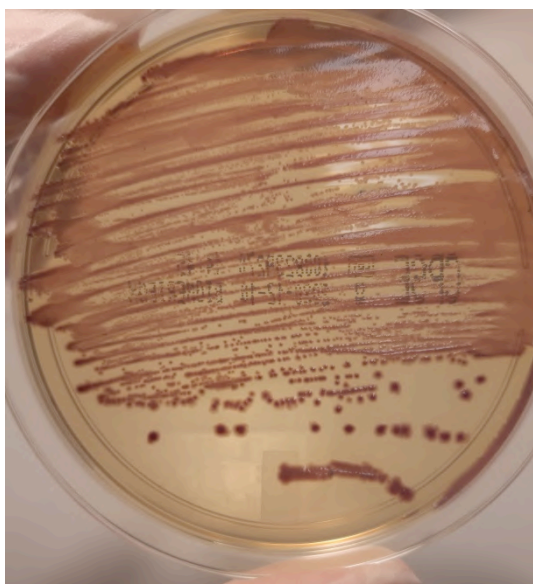
Na Tabela 2 encontram-se representados os microrganismos, indicados anteriormente, para os quais o meio CPSE é cromogénico e sua respetiva coloração.

**Tabela 2:** Microrganismos identificados de modo direto e presuntivo no meio CPSE e sua respectiva coloração. (Adaptado de bioMérieux S.A., 2018<sup>(33)</sup>)

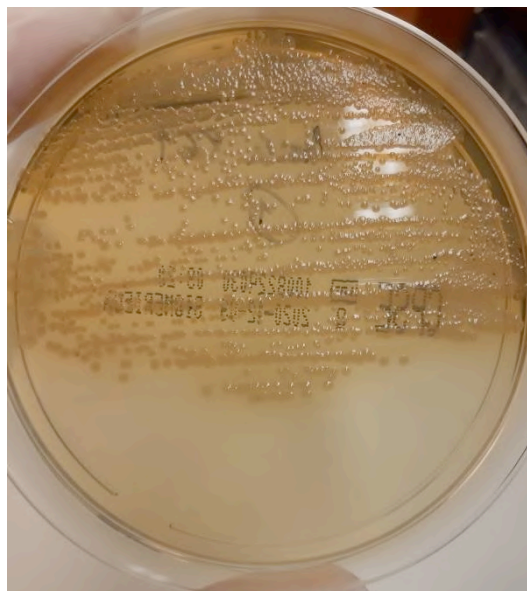
| Microrganismos                  | Coloração meio CPSE   |
|---------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i>         | Rosa a vermelho ( <i>beta</i> -glucuronidase +; <i>beta</i> -galactosidase -)       |
| <i>Proteae</i>                  | Castanho claro a castanho escuro ( <i>triptofano desaminase</i> +)                  |
| <b>KESC</b>                     | Verde a azul-esverdeado ( <i>beta</i> -galactosidase +; <i>beta</i> -glucosidase +) |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Branças ( <i>beta</i> -glucosidase -) a azul-violeta ( <i>beta</i> -glucosidase +)  |
| <i>Enterococcus</i>             | Azul-turquesa ( <i>beta</i> -glucosidase +)   |

-: ausência da atividade da enzima;  
 +: presença da atividade da enzima.

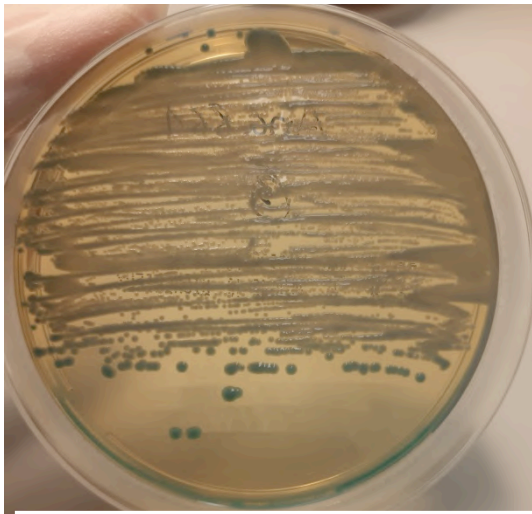
Nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15 abaixo representadas pode observar-se algumas das bactérias que são identificadas de forma direta e presuntiva no meio CPSE, obtidas a partir do exame cultural de amostras de urina.



**Figura 11:** Cultura de *Escherichia coli* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.



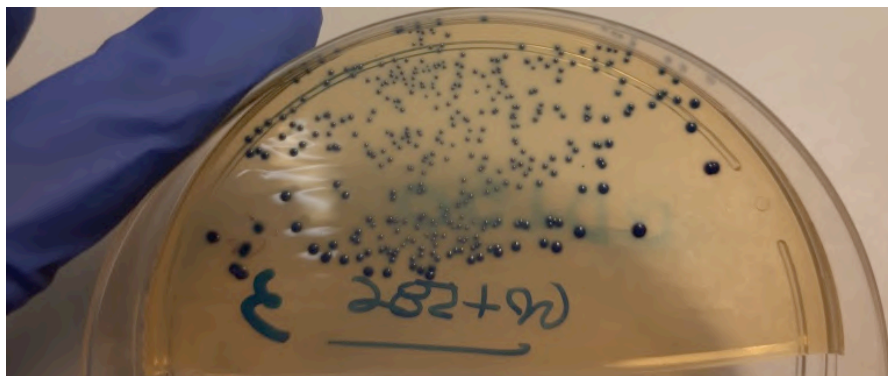
**Figura 12:** Cultura de *Proteus mirabilis* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.



**Figura 13:** Cultura de *Klebsiella pneumoniae* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.



**Figura 14:** Cultura de *Enterococcus faecalis* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.



**Figura 15:** Cultura de *Streptococcus agalactiae* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.



Para além dos microrganismos para os quais o meio CPSE é cromogénico, no decorrer do estágio a partir do processamento de amostras de urina foi possível observar a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, representada na Figura 16.



**Figura 16:** Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* no meio CPSE, obtida a partir de um exame cultural de uma amostra de urina.

### **2.1.6.2. Sangue – Hemocultura**

O sangue é um líquido corporal estéril pelo que, por conseguinte, a deteção e pesquisa de microrganismos neste produto biológico possui uma elevada relevância clínica, uma vez que as infeções da corrente sanguínea, provocadas por microrganismos viáveis presentes no sangue, encontram-se associadas a doenças graves que apresentam elevada mortalidade.<sup>(4, 34)</sup>

A deteção e identificação de microrganismos na corrente sanguínea são efetuadas através da realização do método padrão de referência para o diagnóstico de infeções sanguíneas, a hemocultura. O isolamento de agentes microbianos a partir de uma hemocultura, visto que o sangue é um produto biológico estéril, é normalmente considerado o agente etiológico da infeção.<sup>(4, 34)</sup>

#### **2.1.6.2.1. Colheita**

A colheita de sangue é realizada para frascos de hemocultura, por punção venosa de veias periféricas. Para eliminar possíveis contaminações, deve-se proceder à desinfeção do local onde se efetua a punção com álcool a 70%, deixando atuar durante 30 segundos, aplicando-

-se de seguida uma solução de iodo de 1 a 2%, previamente à realização da colheita. Para a colheita sanguínea é recomendado que seja efetuada antes do início da antibioterapia, e evitar a mesma perante um episódio febril. A amostra deverá ser enviada o mais rápido possível ao laboratório à temperatura ambiente.<sup>(4)</sup>

#### 2.1.6.2.2. Processamento laboratorial

Para a deteção de microrganismos na corrente sanguínea, o Setor de Microbiologia, utiliza o sistema *SIGNAL™ Blood Culture System* (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd, Reino Unido), representado na Figura 17. Este sistema consiste num frasco de hemocultura, ao qual é conectado, após colheita e receção da amostra no Setor de Microbiologia, um sistema indicador de crescimento microbiano. Após a conexão dos dois elementos referidos, a amostra é incubada em aerobiose, a 37 °C durante sete dias.<sup>(35)</sup>

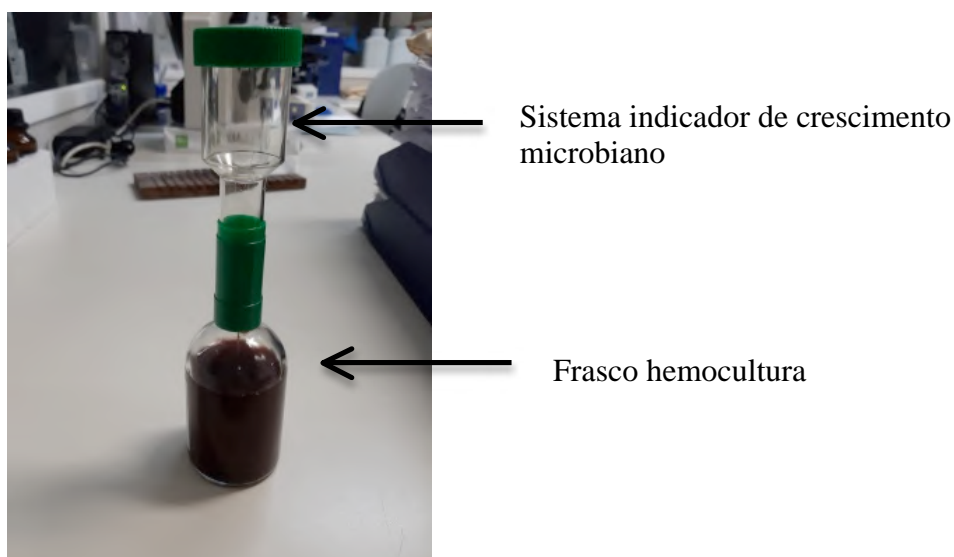


Figura 17: *SIGNAL™ Blood Culture System*.

Na presença de microrganismos é gerada uma pressão positiva no frasco de hemocultura, ocorrendo a ascensão da amostra para o sistema indicador de crescimento, consequência da produção de gases pelo agente microbiano, sendo indicativo da existência de atividade microbiana, considerando-se a hemocultura positiva.<sup>(35)</sup> Em conjunto com a utilização do *SIGNAL® Blood Culture System* (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd, Reino Unido), durante o período de incubação deverá realizar-se, diariamente, uma avaliação macroscópica da amostra, tendo como finalidade a deteção de indicadores da presença microbiana como, por exemplo, o surgimento de turvação.

Perante uma hemocultura positiva efetua-se um exame direto, que consiste na execução de um esfregaço para coloração de Gram, sendo posteriormente visualizado ao MO. Em paralelo com o exame direto efetuam-se subculturas para os meios COS, HAE2, MCK, MSA2 e CAN2. Os meios COS e HAE2 são incubados numa atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, durante 24-48 horas e os restantes meios em aerobiose, a 37 °C, durante 24 horas.

Após o tempo de incubação, qualquer crescimento microbiano deverá ser valorizado, partindo para identificação e TSA do microrganismo. Contudo deve-se ter em consideração que a presença de contaminantes da pele podem dificultar a interpretação dos resultados, devendo os mesmos ser valorizados de acordo com a clínica.

No final dos sete dias de incubação, caso não se verifique a ascensão da amostra para o sistema indicador de crescimento, a mesma deverá ser processada como se se tratasse de uma hemocultura positiva, ou seja, realizando-se um exame direto e subculturas (de acordo com o procedimento acima referido para hemoculturas positivas). Após avaliação dos resultados do exame direto e das subculturas, perante a inexistência de crescimento microbiano, a hemocultura é considerada negativa sendo o resultado reportado como tal.

### **2.1.6.3. LCR**

O LCR é um líquido corporal estéril, sendo a sua análise urgente aquando da suspeita de infeção das meninges, uma vez que é uma situação clínica grave, apresentando uma taxa de mortalidade elevada quando a identificação do agente causador da infeção e aplicação do tratamento não são atempadamente executados.<sup>(4, 36)</sup> Deste modo, o diagnóstico laboratorial é de carácter urgente, requerendo o processamento imediato da amostra de LCR para identificar o agente patogénico. As bactérias aeróbias são normalmente os microrganismos que causam infeção das meninges.<sup>(4, 36)</sup>

#### **2.1.6.3.1. Colheita**

Em todos os doentes com suspeita de infeção das meninges, a colheita de LCR é realizada por punção lombar, sendo um ato exclusivamente médico. Após a colheita, o produto biológico deverá ser transportado de imediato ao laboratório à temperatura ambiente ou a 37 °C.<sup>(4)</sup>

#### **2.1.6.3.2. Processamento laboratorial**

Quando ao Setor de Microbiologia é entregue uma amostra de LCR, esta é imediatamente processada. Às amostras de LCR é efetuada, maioritariamente, uma análise bacteriológica, sendo executada em conjunto com esta análise uma avaliação macroscópica e citológica deste produto biológico.

Na avaliação macroscópica, a primeira etapa a realizar no processamento de amostras de LCR, é avaliar o aspeto da amostra (cor e turvação) e o seu volume. Em conjunto com esta avaliação, efetua-se a avaliação citológica, a qual é executada numa câmara de *Neubauer*, para contagem de células.<sup>(4)</sup>

A análise bacteriológica engloba a realização de dois exames, sendo eles o exame microscópico e o exame cultural. O exame microscópico, consiste na realização de um esfregaço do produto biológico para coloração de Gram.

No exame cultural, a amostra é semeada nos meios COS, MSA2, MCK, VCA3 e HAE2. Todos os meios são incubados a 37 °C durante 72 horas, numa atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, para os meios COS, HAE2 e VCA3, em atmosfera de aerobiose para os meios MSA2 e MCK. A cada 24 horas procede-se à observação das placas.

Posteriormente ao tempo de incubação, todo o crescimento microbiano observado deverá ser valorizado, uma vez que o LCR é um produto biológico estéril.<sup>(4)</sup> Caso se verifique crescimento microbiano nos meios de cultura, procede-se para identificação e TSA, no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, do(s) agente(s) patogénico(s) causador(es) da infeção.

#### **2.1.6.4. Trato respiratório superior – Exsudado nasal e exsudado orofaríngeo**

As infeções do trato respiratório superior podem ser causadas por uma variedade de microrganismos, sendo a maior parte de etiologia viral.<sup>(4)</sup> No trato respiratório superior existe uma flora mista abundante, formada por microrganismos aeróbios e anaeróbios.<sup>(4)</sup> No Setor de Microbiologia amostras de exsudados nasais e orofaríngeos são processados com alguma frequência, tendo como finalidade a identificação do agente etiológico da infeção.

##### **2.1.6.4.1. Colheita**

Na colheita de exsudado nasal é necessário informar o utente que deverá evitar utilizar desinfetantes e aplicação de pomadas na região da colheita, como também não se encontrar

a fazer antibioterapia aquando da realização da mesma. Para recolha deste tipo de produto biológico são utilizadas 2 zaragatoas estéreis com meio transporte (*Amies*), uma para cada narina.<sup>(4)</sup>

Relativamente ao exsudado orofaríngeo, o utente terá que ter alguns cuidados aquando da realização da recolha do produto biológico, sendo eles: não utilizar desinfetantes orais e não comer no dia da colheita. O utente deverá ainda não estar a efetuar antibioterapia. Para a colheita de exsudado orofaríngeo é utilizado uma zaragatoa estéril com meio de transporte (*Amies*), a qual deve passar ao nível da porção posterior da faringe e amígdalas, evitando tocar na língua e paredes da cavidade oral, privilegiando superfícies com aspeto vermelho e onde se verifique pus.<sup>(4)</sup>

#### **2.1.6.4.2. Processamento laboratorial**

O diagnóstico bacteriológico e micológico de infeções do trato respiratório superior, retrata uma tentativa de identificar o(s) microrganismo(s) causador(es) da infeção, entre a abundante microbiota existente neste trato respiratório.<sup>(4)</sup>

Para a pesquisa do agente etiológico implicado na infeção das vias respiratórias superiores, o processamento de amostras de exsudado nasal e orofaríngeo inclui um exame microscópico e um exame cultural.

O exame microscópico engloba a realização de um exame direto, que consiste na realização de um esfregaço do produto biológico para a coloração de Gram, sendo posteriormente visualizado ao MO para avaliar o conteúdo em espécies Gram positivas e negativas e elementos celulares indicativos de infeção.

Nas amostras de exsudado nasal e exsudado orofaríngeo para execução do exame cultural, as amostras são semeadas nos meios COS, CAN2 e MSA2. Após a inoculação dos meios com o produto biológico procede-se à incubação dos mesmos numa atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C durante 24/48 horas no caso do meio COS e, para os restantes meios, a incubação deverá ser realizada em aerobiose, a 37° C durante 24 horas.

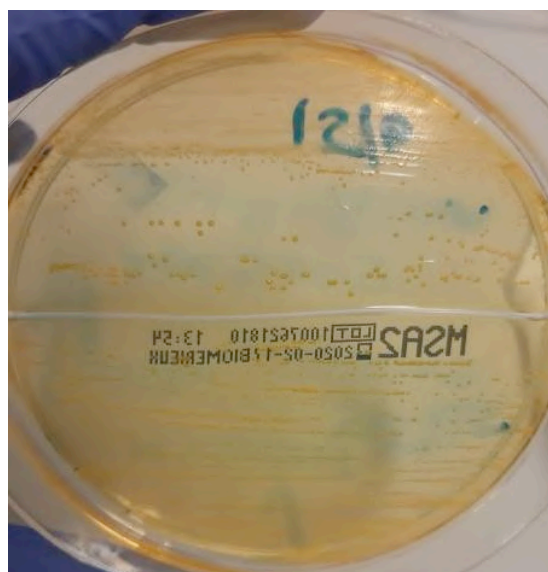
Após o período de incubação, efetua-se a leitura macroscópica dos meios de cultura. Na presença de crescimento microbiano relevante, ou seja, a nível do exsudado nasal o aparecimento de colónias pequenas com beta-hemólise no meio COS e com a existência de alteração da coloração do meio MSA2 para amarelo (indicativo de *Staphylococcus aureus*) e no exsudado orofaríngeo a existência de colónias pequenas com beta-hemólise no meio

COS (sugestivo de *Streptococcus pyogenes*), procede-se à identificação e TSA das colónias, no equipamento Vitek<sup>®</sup> 2 Compact.<sup>(4)</sup> Contudo, é de salientar que outros microrganismos podem causar infeções a nível nasal e da orofaringe.<sup>(4)</sup> Os processamentos destes dois exsudados são dirigidos principalmente para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* (exsudado nasal) e *Streptococcus pyogenes* (exsudado orofaríngeo).<sup>(4)</sup>

No decorrer do processamento destes produtos biológicos foi possível observar, com alguma frequência, o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, no decorrer do processamento laboratorial de exsudados nasais, estando representado nas Figuras 18 e 19.



**Figura 18:** Colónias de *Staphylococcus aureus*, isoladas em meio COS a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado nasal. Parte superior do meio referente à narina esquerda e parte inferior à narina direita.



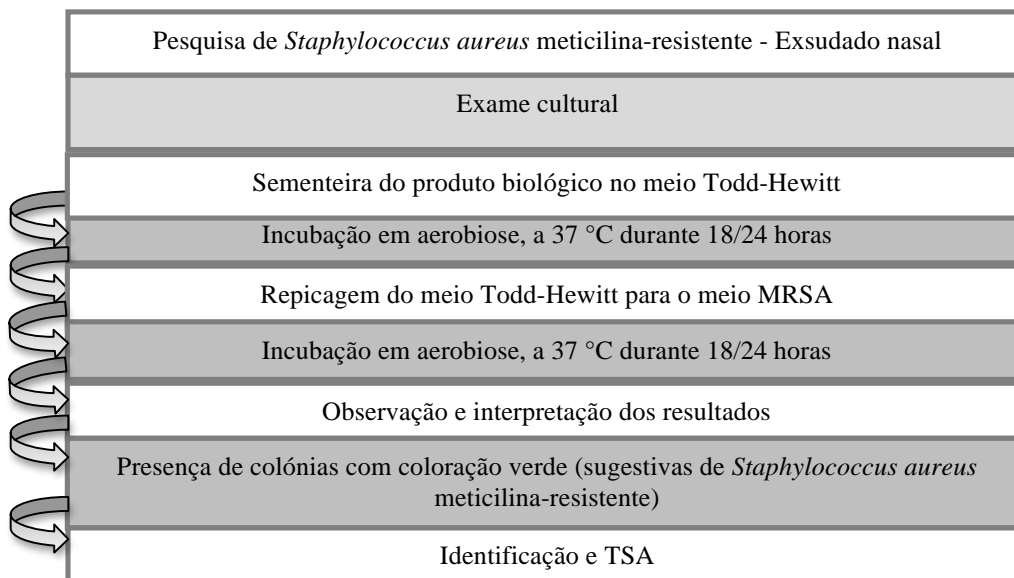
**Figura 19:** Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio MSA2, a partir de uma amostra de exsudado nasal. Parte superior do meio referente à narina esquerda e parte inferior à narina direita.

#### 2.1.6.4.3. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente

A nível mundial, a infeção por *Staphylococcus aureus* metilina-resistente representa um grave problema de saúde pública, causando um número significativo de morbidade e custos elevados na assistência à saúde.<sup>(37, 38)</sup> Embora esta bactéria seja uma das causas mais comuns de infeções nosocomiais, também pode ser adquirida na comunidade, desenvolvendo infeções de difícil tratamento. A sua deteção é essencial para que se possa

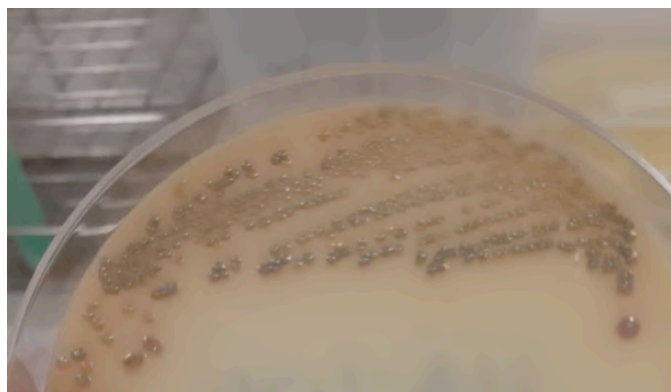
prevenir e/ou controlar infecções provocadas por este agente patogénico e ajudar no tratamento a aplicar.<sup>(37, 38)</sup>

No setor da microbiologia, a pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente é frequentemente solicitada em amostras de exsudados nasais, estando os procedimentos a adotar para a sua pesquisa na Figura 20.



**Figura 20:** Procedimento a adotar para pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente em amostras de exsudados nasais. (Adaptado de Micheel V et al., 2015<sup>(37)</sup>)

Na Figura 21, abaixo representada pode observar-se colónias suspeitas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, colónias com coloração verde.



**Figura 21:** Colónias suspeitas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente - colónias com coloração esverdeada no meio MRSA.

### **2.1.6.5. Exsudado auricular**

As infecções auriculares podem ser causadas por diversos microrganismos, ao nível do ouvido externo, médio ou interno, ocorrendo com maior frequência em crianças.<sup>(39)</sup>

Ao nível do ouvido externo, as infecções bacterianas são causadas com frequência por *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*. No que diz respeito ao ouvido médio, as bactérias que normalmente causam infecções são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus spp.* e *Streptococcus pyogenes*.<sup>(4, 39)</sup>

#### **2.1.6.5.1. Colheita**

No laboratório, onde realizei estágio, apenas se realiza colheita de exsudados auriculares do ouvido externo. Para a sua execução são utilizadas duas zaragatoas com meio de transporte *Amies* (uma para cada ouvido), as quais devem ser introduzidas no canal auditivo externo. O utente deverá ser instruído para não lavar a região auricular, nem aplicar gotas, pomadas ou anestésicos na véspera da colheita e ainda não se encontrar a aplicar/tomar antibioterapia ou antimicóticos até 5 dias antes da colheita. Após a colheita, a amostra deverá ser transportada à temperatura ambiente até ao laboratório.<sup>(4)</sup>

#### **2.1.6.5.2. Processamento laboratorial**

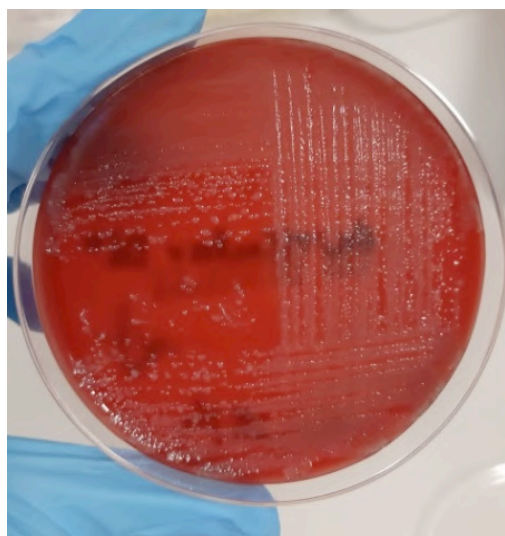
A análise microbiológica de exsudados auriculares aquando de um processo infeccioso no aparelho auditivo, permite investigar quais as causas microbiológicas responsáveis do surgimento da infeção em questão.<sup>(4)</sup> Para a pesquisa do agente etiológico da infeção auricular é realizado um exame direto, para o qual se efetua um esfregaço do produto biológico para posterior coloração de Gram, sendo de seguida observado ao MO para avaliação do conteúdo em espécies Gram negativas e positivas e elementos celulares que indicam a presença de infeção. Em conjunto com o exame direto, procede-se também à execução do exame cultural deste produto biológico, que engloba a inoculação do mesmo nos meios COS, HAE2 (incubando numa atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C durante 24/48 horas) e CAN2, MSA2 e MCK (incubando numa atmosfera de aerobiose, a 37 °C durante 24 horas).

Caso se verifique crescimento microbiano relevante após o tempo de incubação e observação dos meios de cultura, e tendo em conta as informações obtidas do exame direto



e informação clínica do utente, parte-se para a identificação e TSA no equipamento VITEK® 2 Compact.

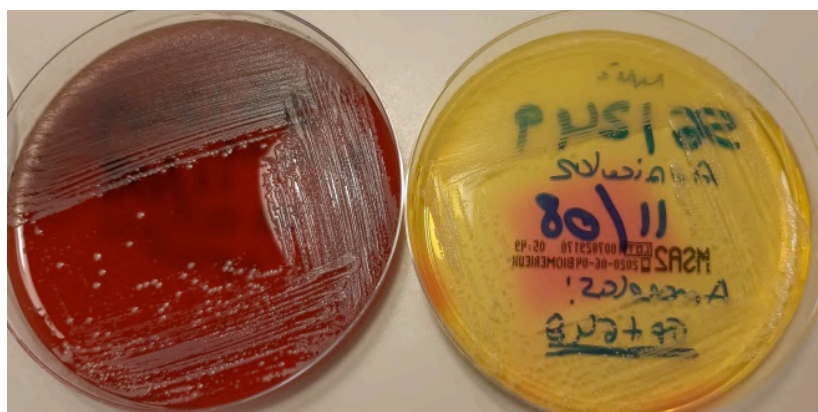
No processamento de amostras de exsudados auriculares foi possível observar um caso positivo com relevância clínica, onde se verificou a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, estando representado o resultado nas Figuras 22, 23 e a presença de *Staphylococcus aureus*, representado na Figura 24.



**Figura 22:** Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* em meio COS a partir de uma amostra de exsudado auricular.



**Figura 23:** Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* em meio MCK a partir de uma amostra de exsudado auricular.



**Figura 24:** Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio COS (lado esquerdo) e meio MSA2 (lado direito) a partir de uma amostra de exsudado auricular.

#### **2.1.6.6. Expetoração**

A análise microbiológica de produtos biológicos do trato respiratório inferior, entre eles a expetoração, colhidos perante a suspeita de infeção é relevante, uma vez que permite investigar qual(quais) o(s) agente(s) etiológico(s), responsável(eis) pelo processo infeccioso em questão. À escala global, as infeções do trato respiratório inferior são uma das doenças infecciosas mais comuns.<sup>(40)</sup> No decorrer do estágio, dos vários produtos biológicos que podem ser obtidos perante a suspeita de infeção do trato respiratório inferior, apenas foram processadas amostras de expetoração.

Nas amostras de expetoração, a sua análise microbiológica, engloba a execução de um exame bacteriológico e micológico. Quando prescrito pelo clínico executa-se também a pesquisa de BAAR.<sup>(40)</sup>

##### **2.1.6.6.1. Colheita**

Para a colheita de amostras de expetoração, o utente deverá ser instruído a efetuar uma lavagem da cavidade oral e gargarejar apenas com água, previamente à colheita. Posteriormente, se possível, deverá ser colhida a primeira expetoração da manhã, após tosse profunda para um frasco estéril, seco de boca larga, desprezando amostras de saliva. A amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais breve possível á temperatura ambiente.<sup>(4)</sup>

##### **2.1.6.6.2. Exame bacteriológico e micológico da amostra de expetoração**

O diagnóstico de infeções do trato respiratório inferior é dificultado pela contaminação do produto biológico a processar, no decorrer da colheita, pela flora comensal da orofaringe.<sup>(4)</sup> Deste modo, perante uma amostra de expetoração, no decorrer do seu processamento deverá ser avaliada a sua qualidade, efetuando o seu processamento caso esta seja considerada uma amostra de boa qualidade.<sup>(4)</sup>

Para a avaliação da qualidade da amostra é efetuado um exame direto, que consiste na execução de um esfregaço para coloração de Gram, sendo posteriormente observado ao MO. Na observação microscópica do esfregaço é avaliada a quantidade de leucócitos e células epiteliais existentes que irá definir se a amostra é de boa qualidade.<sup>(4)</sup> Tendo em conta a quantidade de leucócitos e células epiteliais, as amostras são classificadas em 5 grupos distintos, com base nos critérios de Murray e Washington (representados na Tabela 3).<sup>(4)</sup>

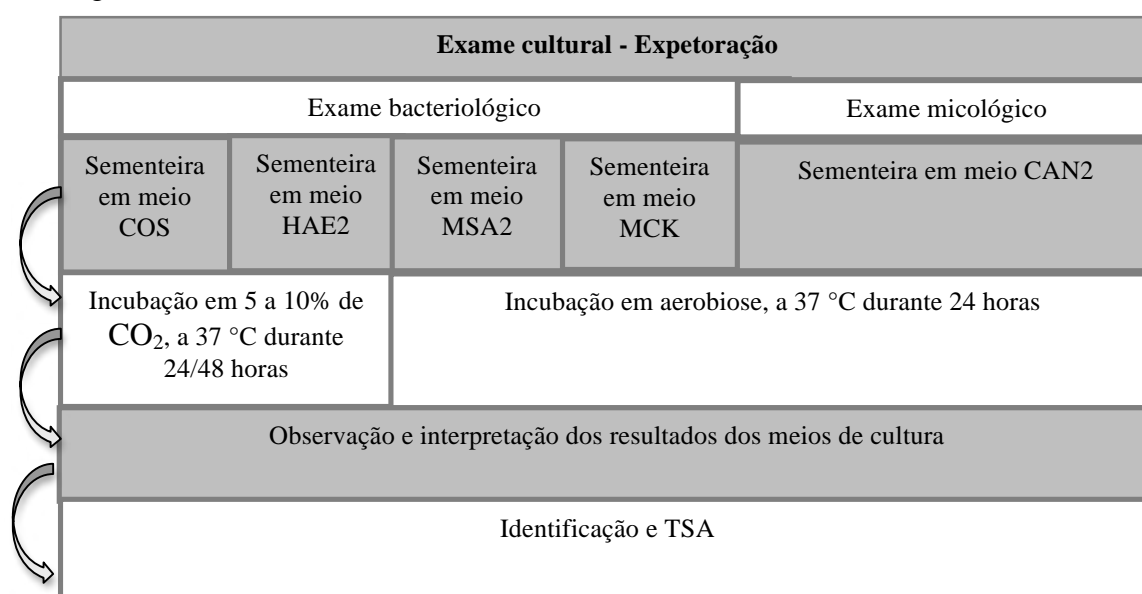
**Tabela 3:** Classificação de amostras de expetoração para avaliação da sua qualidade para execução do exame bacteriológico, segundo critérios de Murray e Washington. (Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004<sup>(4)</sup>)

| <b>Tabela Murray e Washington</b> |   |   |
|-----------------------------------|---|---|
|                                   | Células epiteliais<br>(visualização na ampliação 10x) | Leucócitos<br>(visualização na ampliação 10x) |
| <b>Grupo 1</b>                    | 25  | 10  |
| <b>Grupo 2</b>                    | 25  | 10-25   |
| <b>Grupo 3</b>                    | 25  | 25  |
| <b>Grupo 4</b>                    | 10-25   | 25  |
| <b>Grupo 5</b>                    | <10   | 25  |

Com base nos critérios de Murray e Washington as amostras que sejam inseridas no grupo 4 e 5 serão aquelas que apresentam a qualidade desejável para dar continuidade ao seu processamento, partindo para o exame cultural.<sup>(4)</sup>

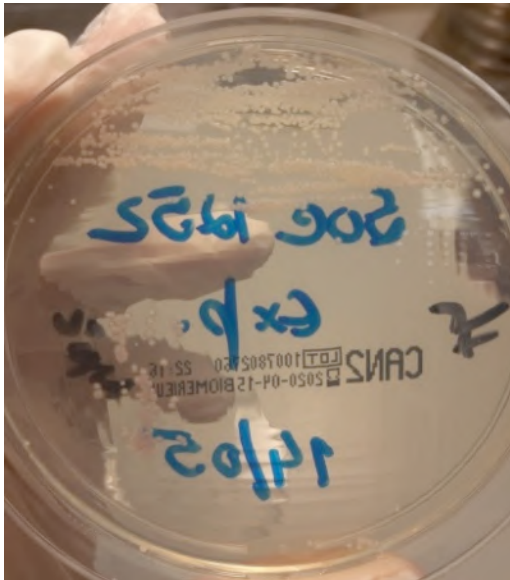
No Setor de Microbiologia, para além do esfregaço do produto biológico para coloração de Gram, é sempre efetuado em paralelo um outro esfregaço do produto biológico para coloração de Ziehl-Neelsen com o objetivo de verificar a existência de BAAR, mesmo que não tenha sido prescrita a sua pesquisa pelo clínico.

Em conjunto com os exames diretos mencionados anteriormente, tanto para o exame bacteriológico e micológico, realiza-se um exame cultural, o qual se encontra representado na Figura 25.



**Figura 25:** Procedimento de exame cultural para exame bacteriológico e micológico de amostras de expetoração. (Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004<sup>(4)</sup>)

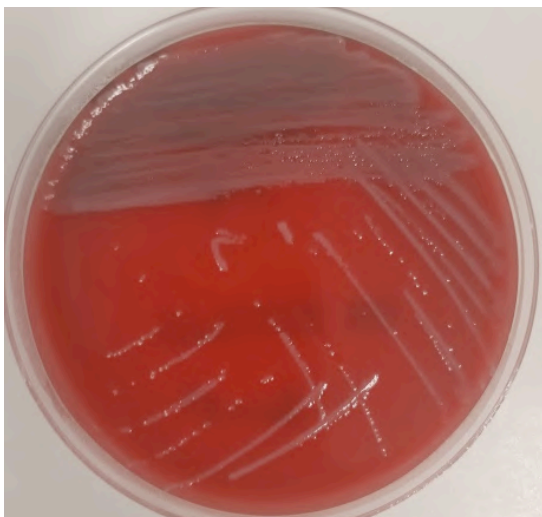
Ao longo do estágio foi possível observar alguns casos positivos, com relevância tanto do exame bacteriológico como do exame micológico, estando abaixo representados nas Figuras 26, 27, 28, 29.



**Figura 26:** Cultura de *Candida tropicalis* em meio CAN2, a partir do exame micológico de uma amostra de expetoração.



**Figura 27:** Colônias de *Serratia marcescens* isoladas em meio COS, a partir do exame bacteriológico de uma amostra de expetoração.



**Figura 28:** Colônias de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em meio COS, a partir do exame bacteriológico de uma amostra de expetoração.



**Figura 29:** Cultura de *Candida albicans* em meio CAN2, a partir do exame micológico de uma amostra de expetoração.

### 2.1.6.6.3. Pesquisa de BAAR

A pesquisa de BAAR em secreções purulentas do trato respiratório, como é o caso da expectoração, é uma análise relevante para o diagnóstico e monitorização da terapêutica de doenças desencadeadas por micobactérias. De entre o género *Mycobacterium spp.*, a espécie *Mycobacterium tuberculosis* é a que apresenta maior preocupação, uma vez que a doença gerada por esta micobactéria (a tuberculose) é uma das doenças infecciosas que mais mata a nível mundial.<sup>(41, 42)</sup>

No Setor de Microbiologia, quando é rececionado uma amostra de expectoração com prescrição médica para pesquisa de BAAR é realizado primeiramente um exame direto, que engloba a execução de um esfregaço do produto biológico para coloração de Ziehl-Neelsen para posterior observação ao MO, tendo como finalidade a visualização da existência de BAAR. De seguida, para eliminação de possíveis microrganismos contaminantes que podem mascarar a deteção de micobactérias, deverá efetuar-se um tratamento às amostras, com o *kit* Tratamento dos produtos de expectoração (bioMérieux S.A., França). O tratamento engloba as etapas de fluidificação, descontaminação e concentração da amostra, sendo realizadas pelo método Kubica, modificado por Kransnow.<sup>(43, 44)</sup>

Este método utiliza em simultâneo L-cisteína e cloreto de benzalcónio que irão, respetivamente, fluidificar e descontaminar (destruição de contaminantes) a amostra. Uma vez que o agente descontaminante é tóxico para BAAR e quando em contacto com a amostra, por tempo excessivo, poderá diminuir o número destes microrganismos e comprometer a sua deteção, é adicionado à amostra o tampão fosfato que irá neutralizar a ação do cloreto de benzalcónio. Após a adição do tampão fosfato, procede-se à etapa de concentração na qual a amostra é centrifugada, tendo como finalidade obter um sedimento com BAAR concentrados, caso existam.<sup>(43-45)</sup>

A partir do sedimento efetua-se um esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen e prossegue-se para o exame cultural.

No exame cultural, executa-se a inoculação no meio LJ, a partir do sedimento obtido, incubando em aerobiose, a 37 °C até 60 dias, com observação periódica do meio de cultura.

Perante a existência de crescimento de colónias no meio LJ é executado novo esfregaço para coloração de Ziehl-Neelsen a partir de uma colónia isolada existente no meio referido, para conformação da presença de micobactérias.

Caso se confirme a presença de micobactérias, o meio onde ocorreu crescimento é enviado para o INSA, para identificação e TSA do microrganismo.

É de ressaltar que a pesquisa de BAAR pode também ser solicitada noutros produtos biológicos, sendo sempre efetuado um exame cultural e microscópico. O tratamento das amostras em produtos biológicos estéreis não é executado. Tendo em conta o produto a processar poderá ser necessária a aplicação de procedimentos adicionais, anteriormente ao seu tratamento. Durante o estágio realizei a pesquisa de BAAR apenas em amostras de expetoração.

#### **2.1.6.7. Exsudados purulentos**

Um exsudado purulento pode ser dividido em dois tipos, superficial ou profundo, sendo provenientes, respetivamente, de feridas abertas ou fechadas, envolvendo a colheita de material purulento (pus) de uma ferida. O processamento deste tipo de produtos biológicos, no Setor de Microbiologia, é aplicado a feridas, fístulas e abscessos, sendo apenas realizada a pesquisa de microrganismos aeróbios que possam estar na génese da infeção.<sup>(4)</sup>

##### **2.1.6.7.1. Colheita**

A colheita de exsudado purulento pode ser realizada com agulha (exsudado profundo) e com zaragatoa com meio de transporte (exsudado superficial). No laboratório José Manuel Chau S.A. executa-se apenas a colheita de exsudados purulentos superficiais com zaragatoa estéril com meio de transporte (*Amies*), procedendo-se a uma lavagem de superfície da lesão com soro fisiológico, previamente à obtenção da amostra. A amostra deverá ser transportada ao laboratório à temperatura ambiente.<sup>(4)</sup>

##### **2.1.6.7.2. Processamento laboratorial**

O exame microbiológico de amostras de exsudados purulentos tem como finalidade a deteção do(s) agente(s) patogénico(s) causador(es) da infeção.<sup>(4)</sup> Para tal efetua-se um exame microscópico, que consiste na execução de um exame direto, no qual se efetua um esfregaço do produto biológico para coloração de Gram.

Em conjunto com o exame direto, efetua-se também o exame cultural, no qual se inocula a amostra de exsudado purulento nos meios COS, MSA2, CAN2 e MCK. Os meios referidos são incubados em aerobiose, a 37 °C durante 24 horas, com exceção do meio COS que apresenta um período de incubação de 24/48 horas, numa atmosfera de 5 a 10 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

Após o período de incubação, observa-se e interpreta-se os resultados dos meios de cultura, cruzando os mesmos com os resultados do exame direto, informações sobre o local e tipo de infecção, o modo de colheita e história clínica do utente, prosseguindo-se para a identificação e TSA das colónias valorizáveis.

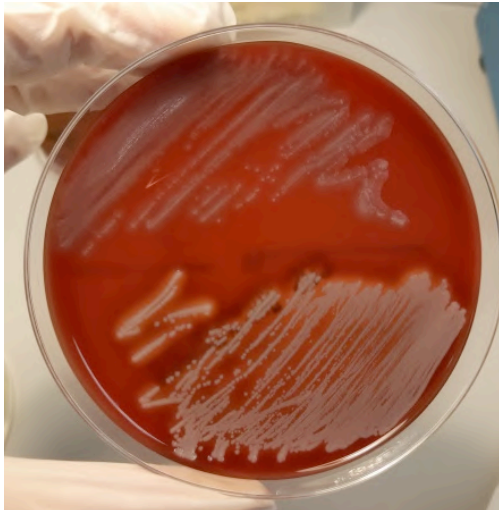
Durante o processamento de amostras de exsudados purulentos foi possível observar casos positivos, com relevância clínica, estando representados na Figura 30, 31, 32 e 33.



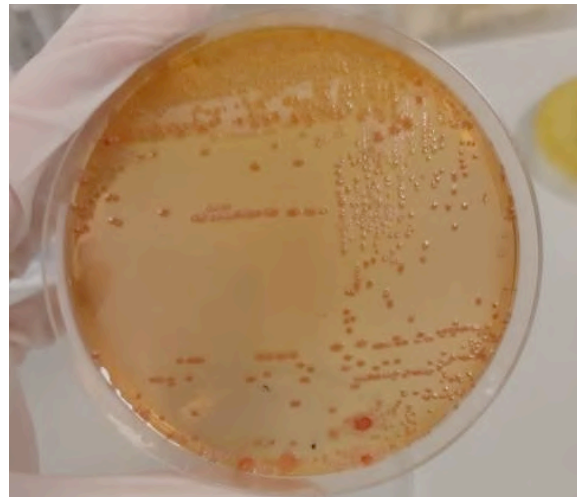
**Figura 30:** Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio COS a partir de uma amostra de exsudado de ferida facial.



**Figura 31:** Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio MSA2, a partir de uma amostra de exsudado de ferida facial.



**Figura 32:** Colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (parte superior do meio) e *Staphylococcus haemolyticus* em meio COS (parte inferior do meio) isoladas a partir do exame cultural de um exsudado purulento de uma fístula.



**Figura 33:** Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* em meio MCK a partir de uma amostra de uma fístula.

### 2.1.6.8. Fezes

A nível mundial, as infeções gastrointestinais são responsáveis por uma elevada morbidade e mortalidade, tendo maior expressão em países com saneamento e cuidados de higiene precários.<sup>(46)</sup>

Para a deteção e estudo dos agentes etiológicos deste tipo de infeções, no Setor de Microbiologia, os exames e análises efetuadas a amostras de fezes podem envolver:

- Exame macroscópico;
- Análise bacteriológica (coprocultura);
- Exame parasitológico (executado no setor de Urinálise/Parasitologia).

Sempre que o clínico prescreve a realização de coprocultura é efetuado em conjunto um teste imunocromatográfico para pesquisa de *Campylobacter jejuni*.

#### 2.1.6.8.1. Exame macroscópico - fezes

Neste exame analise-se, de forma macroscópica, a presença de sangue, parasitas, a cor e consistência (sólida ou diarreica/líquido) das fezes.<sup>(4)</sup>

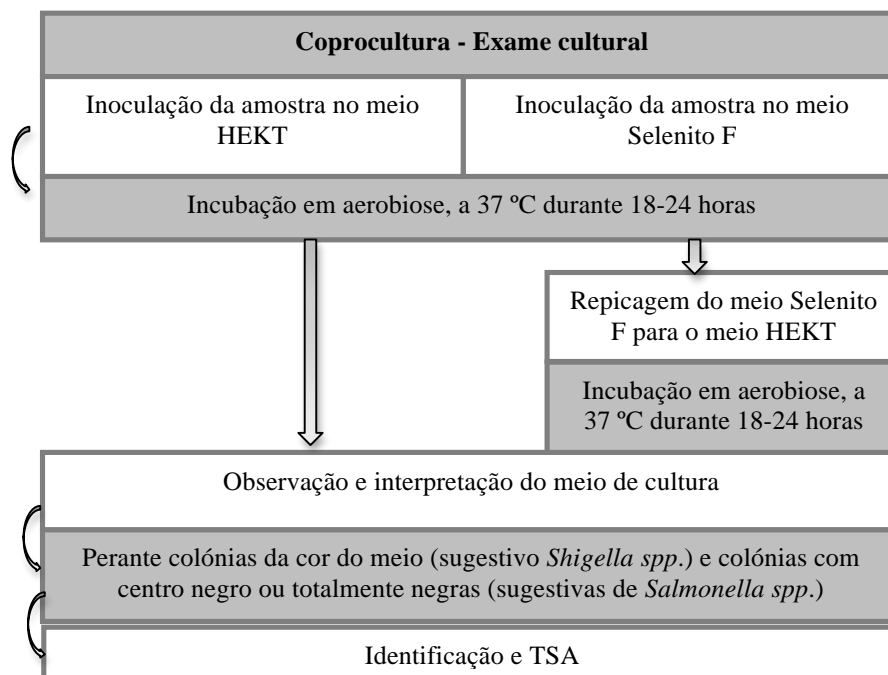


### 2.1.6.8.2. Coprocultura

No Setor de Microbiologia, a coprocultura está orientada para a detecção de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e pesquisa de *Campylobacter jejuni*.

As amostras de fezes, para este tipo de análise, chegam ao laboratório em coletores estéreis próprios, sendo recomendado ao utente, caso possível, colher a porção do produto biológico que possa conter muco, pus, sangue e não estar a tomar antibióticos.<sup>(4)</sup> A quantidade de amostras a serem colhidas é definida pelo médico.

Para a detecção de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, a análise bacteriológica envolve a execução de um exame cultural, encontrando-se os procedimentos a adotar para a sua realização na Figura 34. Este exame envolve a inoculação da amostra fecal num meio de enriquecimento (selenito F) e num meio seletivo para *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* (hektoen).<sup>(4)</sup>



**Figura 34:** Procedimento para exame cultural das fezes. (Adaptado de Fonseca *et al.*, 2004<sup>(4)</sup>)

O procedimento acima referido, deve ser aplicado a cada amostra de fezes que for colhida.

### 2.1.6.8.3. Pesquisa de *Campylobacter jejuni*

*Campylobacter jejuni* é um dos principais agentes etiológicos de gastroenterites em todo o mundo, desencadeando sintomas como diarreia aquosa (podendo conter sangue), febre e dores abdominais.<sup>(47)</sup>

Para a pesquisa desta bactéria é aplicado um teste rápido imunocromatográfico, *Campylobacter Balea* (BEORTEK S.A., Espanha). Este teste consiste na detecção qualitativa de antígenos de *Campylobacter jejuni*. Caso o teste seja positivo, ou seja, ocorra o aparecimento de uma banda na linha teste “T” e uma banda na linha controlo “C” (que valida o teste<sup>(48)</sup>, como representado na Figura 35), indicando a presença de antígenos da bactéria mencionada, a amostra é enviada para o Laboratório Joaquim Chaves, com o qual o Laboratório José Manuel Chau S.A. tem acordo, para a realização de teste confirmatórios e seu TSA.



**Figura 35:** Teste rápido *Campylobacter Balea* positivo.  
(Fonte: Bula informativa do Kit Campylobacter Balea<sup>(48)</sup>)

### 2.1.6.8.4. Exame parasitológico

As infeções gastrointestinais causadas por parasitas, ocorrem em todo o globo, afetando predominantemente indivíduos de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo os microrganismos transmitidos por via fecal-oral, de águas e alimentos contaminados.<sup>(49)</sup>

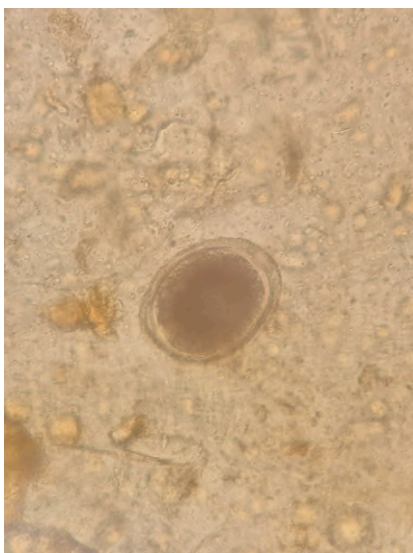
O exame parasitológico apresenta como objetivo a detecção e identificação visual presuntiva de parasitas nas fezes.

Para a realização deste exame são colhidas, habitualmente, três amostras de fezes para coletores estéreis apropriados, de diferentes dejeções em dias distintos, sendo aconselhado ao utente não estar a tomar antibióticos nem antiparasitários.<sup>(4)</sup>

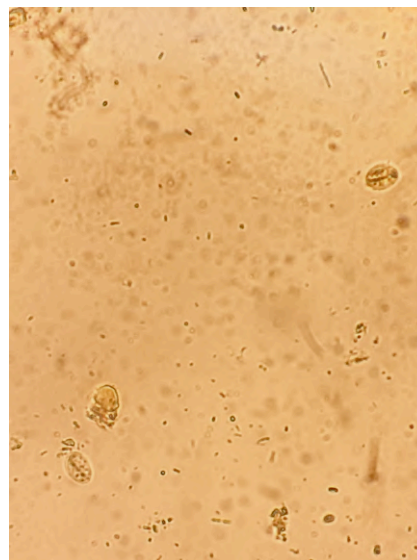
As amostras quando rececionadas e triadas no setor de Urianálise/Parasitologia, são alvo de um exame macroscópico (referenciado no ponto 2.1.6.8.1.), procedendo-se de seguida à execução do exame microscópico.

O exame microscópico consiste na observação do sedimento da amostra fecal, após a realização de um tratamento inicial da amostra e posterior concentração de parasitas fecais,

com recurso a um método baseado no princípio de sedimentação, para o qual é utilizado o *Kit Mini Parasep<sup>®</sup> SF* (Apacor Ltd, Reino Unido).<sup>(50)</sup> O tratamento da amostra fecal consiste na adição de uma porção da mesma ao fixador do *kit*, ocorrendo a emulsificação das fezes.<sup>(50)</sup> Após tratamento (com duração de 1 hora) procede-se à concentração de parasitas fecais, por centrifugação durante 2 minutos a 1000 rotações por minuto. De seguida decanta-se o sobrenadante e suspende-se o sedimento.<sup>(50)</sup> Por fim coloca-se uma gota da suspensão do sedimento numa lâmina, sobre o qual se coloca uma lamela e observa-se ao MO, para identificação visual presuntiva dos parasitas, caso existam. Durante o decorrer do estágio foi possível a observação de um ovo do parasita *Ascaris lumbricoides*, representado na Figura 36 e um cisto do parasita *Giardia lamblia*, observado na Figura 37.



**Figura 36:** Ovo de *Ascaris lumbricoides* numa ampliação de 40x.



**Figura 37:** Cistos de *Giardia lamblia* numa ampliação de 40x.

#### **2.1.6.8.5. Pesquisa de *Helicobacter pylori* em amostras fecais**

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa com forma de espiral, que coloniza naturalmente a mucosa gástrica e duodenal do ser humano, podendo estar presente em mais de metade da população mundial.<sup>(51)</sup>

A infeção gerada por este microrganismo, provocada pela secreção da citotoxina vacuolante A, encontra-se implicada na etiologia de várias doenças gastroentéricas, tais como: úlcera gástrica e duodenal, carcinoma gástrico e gastrite ativa.<sup>(51)</sup>

Para a pesquisa de *Helicobacter pylori* em amostras fecais é aplicado um teste imunocromatográfico para deteção qualitativa e presuntiva de antígenos da bactéria referida, sendo este o teste Dedicio® *H. pylori* Ag (fezes) (nal von minden GmbH, Alemanha). Este teste é utilizado como um teste auxiliar no diagnóstico de infeção por *Helicobacter pylori*.

Como se pode verificar na Figura 38, para que o teste seja considerado positivo tem que aparecer uma banda vermelha na linha teste (T), juntamente com uma banda vermelha na linha de controlo (C), que faz a validação do teste.<sup>(52)</sup>



**Figura 38:** Teste rápido Dedicio® *H. pylori* Ag (fezes), positivo e válido.

### **2.1.6.9. Exsudado retal**

As amostras de exsudados retais, processadas no Setor de Microbiologia, destinam-se à pesquisa de EPC. Por todo o mundo, as bactérias EPC apresentam uma ameaça relevante e emergente para a saúde pública, no que diz respeito aos cuidados de saúde prestados em ambiente hospitalar e na comunidade, tendo sido classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças como uma das ameaças mais urgentes à resistência bacteriana aos antimicrobianos.<sup>(53-55)</sup>

#### **2.1.6.9.1. Colheita**

A obtenção de um exsudado retal é realizada com recurso a uma zaragatoa com meio de transporte (*Amies*), a qual deve ser introduzida no esfíncter anal e exercer movimentos rotativos contra as criptas retais, evitando sempre o contacto com matéria fecal.<sup>(4)</sup> Após a colheita a amostra deve ser transportada ao laboratório à temperatura ambiente.<sup>(4)</sup>

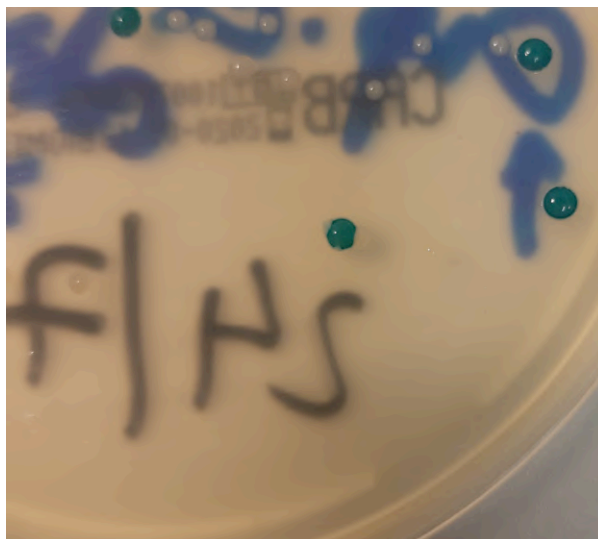
#### **2.1.6.9.2. Processamento laboratorial**

As EPC possuem resistência a vários tipos de antibióticos, entre eles os carbapenems, geralmente utilizados como antibióticos de última linha, estando as infeções causadas por este microrganismo associadas a uma elevada mortalidade.<sup>(53-55)</sup>

Por conseguinte, o rápido *screening* de EPC torna-se essencial para que possa prevenir e controlar infeções causadas por estas bactérias.<sup>(53-55)</sup>

Para tal, no Setor de Microbiologia, é realizado um exame cultural no meio cromogénico CARB, o qual é inoculado com a amostra de exsudado retal e incubado em aerobiose, a 37 °C durante 18/24 horas. Após o tempo de incubação, procede-se à observação dos meios de cultura; caso se verifique a presença de colónias vermelhas (suspeitas de *Escherichia coli*) e/ou com coloração esverdeada (suspeitas do Grupo KESC) faz-se a sua identificação e TSA no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.

Na Figura 39 verifica-se a presença de colónias do Grupo KESC, obtidas do processamento laboratorial para pesquisa EPC em amostras de exsudados retais.



**Figura 39:** Colónias suspeitas do grupo KESC em meio CARB - colónias com coloração esverdeada.

#### **2.1.6.10. Exsudado uretral**

A infecção da uretra, também designada de uretrite, é causada na maioria das vezes por microrganismos transmitidos por via sexual, sendo a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis* os agentes etiológicos mais comumente transmitidos por esta via.<sup>(56, 57)</sup> Este tipo de infecção é caracterizado de uretrite gonocócica (presença de *Neisseria gonorrhoeae*) e não gonocócica (pode ser causada por *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e microrganismos que frequentemente causam infeções urinárias, como por exemplo *Escherichia coli*, entre outros microrganismos).<sup>(56, 57)</sup>

Ao Setor de Microbiologia chegam zaragatoas uretrais para análise, tendo como objetivo a deteção e estudo do(s) microrganismo(s) causador(es) da infeção.

##### **2.1.6.10.1. Colheita**

Em qualquer posto de colheita do laboratório onde realizei estágio, o técnico presente, aquando da chegada de um utente com prescrição médica para realização de exsudado uretral, informa-o que a colheita, se possível, deverá ser executada antes da primeira micção do dia em que irá ser realizada ou, caso não seja possível, terá de estar no mínimo

três horas sem urinar. Anteriormente à colheita, o utente é informado que as relações sexuais são desaconselhadas e não deve aplicar/tomar antibióticos e antimicóticos.<sup>(4)</sup>

Para obtenção do exsudado uretral o técnico procede primeiramente à limpeza, com uma gaze estéril, da mucosa circundante ao local da colheita. De seguida, deve pressionar a uretra de modo a estimular a saída de corrimento, sendo este colhido com uma zaragatoa estéril sem meio de transporte que se destina à execução do exame direto a fresco e para coloração de Gram e azul de metileno. Com uma segunda zaragatoa, com meio de transporte com *Amies*, introduz-se a mesma na uretra com movimentos rotativos para obtenção do exsudado, sendo esta zaragatoa utilizada para o exame cultural. A amostra é enviada ao laboratório à temperatura ambiente.<sup>(4)</sup>

#### **2.1.6.10.2. Processamento laboratorial**

No Setor de Microbiologia, para deteção e estudo do agente causador da infeção uretral, são realizados dois tipos de exames, sendo estes um exame microscópico e um exame cultural.

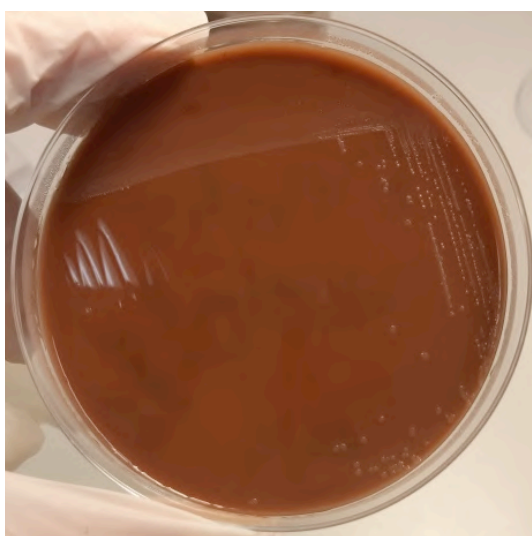
O exame microscópico inclui a execução de um exame a fresco para verificar a existência de microrganismos e observação semi-quantitativa de células. Para além do exame a fresco, realiza-se também um exame direto para coloração de Gram (avaliação do conteúdo em espécies Gram positivas e Gram negativas) e um exame direto para coloração azul de metileno (permite melhor visualização de gonococcus, se presentes).

Em concomitância com o exame microscópico efetua-se um exame cultural, no qual se realiza a inoculação do produto biológico, obtido a partir da zaragatoa utilizada para obtenção do exsudado, nos meios COS, MSA2, CAN2, VCA3 e MCK, sendo todos incubados a 37 °C. O tempo de incubação a aplicar para os meios mencionados será de 24 a 48 horas, com exceção do meio VCA3 que incuba até 72 horas. Para os meios COS e VCA3 a atmosfera de incubação a utilizar será de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, enquanto que para os restantes meios aplica-se uma atmosfera de aerobiose. A cada 24 horas os meios são observados.

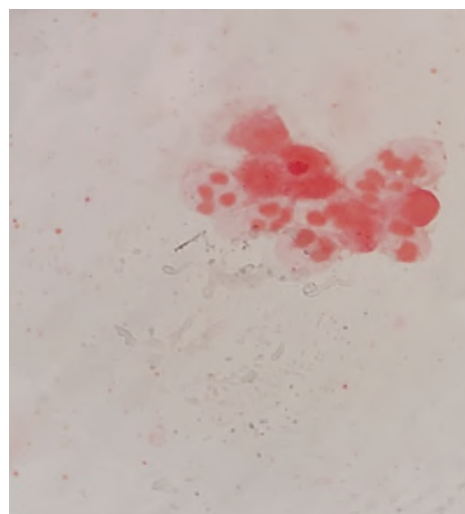
Posteriormente ao tempo de incubação, procede-se à leitura macroscópica dos meios. Perante crescimento microbiano, segue-se para a identificação da(s) colónia(s) presente(s) nos meios de cultura e seu TSA. É de salientar que a valorização do crescimento microbiano nos meios de cultura deverá ter em consideração as informações obtidas do

exame microscópico, como também do estado clínico do utente.<sup>(4)</sup> Se acaso na identificação, efetuada no equipamento VITEK<sup>®</sup> 2 Compact existente no laboratório, for detetada a presença de *Neisseria gonorrhoeae*, a placa de VCA3 onde se verificou crescimento é enviada para o INSA para realização de testes confirmatórios e TSA da bactéria.

No decorrer do estágio, foi possível observar um caso positivo a partir do processamento de um exsudado uretral, no qual se detetou e identificou como agente causador da infeção a bactéria *Neisseria gonorrhoeae*. Na Figura 40 pode-se observar o resultado do exame cultural, onde se visualizam colónias da bactéria identificadas no meio VCA3. Nas Figuras 41 e 42, estão representados, respetivamente, os resultados do exame direto para coloração de Gram e para coloração azul de metileno, indicativos da presença de *Neisseria gonorrhoeae*.

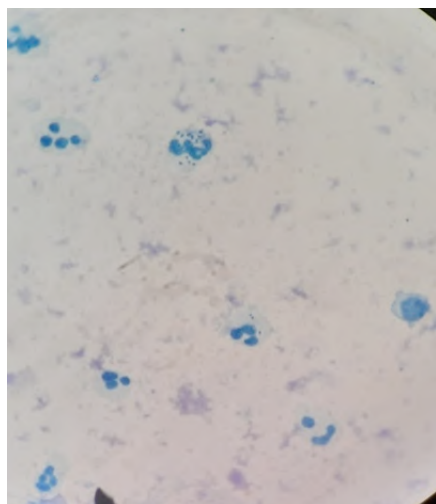


**Figura 40:** Cultura de *Neisseria gonorrhoeae* em meio VCA3, a partir o exame cultural de uma amostra de exsudado uretral.



**Figura 41:** Exame direto para coloração de Gram, numa ampliação de 100X de uma amostra de exsudado uretral - células epiteliais e bactérias Gram negativas.





**Figura 42:** Exame direto para coloração de azul de metileno duma amostra de exsudado uretral, de uma ampliação de 100x - presença de neutrófilos, linfócitos e diplococos intracelulares e extracelulares.

#### **2.1.6.11. Exsudado vaginal**

A microbiota vaginal é constituída por uma elevada diversidade microbiana, apresentando um predomínio do género bacteriano *Lactobacillus spp.* A flora vaginal pode sofrer variações, tanto nos seus constituintes como nas suas quantidades, devido a diversos fatores, tais como a idade, período menstrual, gravidez, entre outros.<sup>(58, 59)</sup>

Os microrganismos que colonizam a microbiota vaginal exercem um papel importante na homeostasia corporal da mulher, criando uma proteção que inibe e exclui o crescimento de outros microrganismos.<sup>(58, 59)</sup> Quando existe uma alteração da constituição da microflora vaginal, pode ser desencadeado o aparecimento de disbioses, como por exemplo infeções, que poderão ser causadas por microrganismos da própria flora vaginal.<sup>(58, 59)</sup>

##### **2.1.6.11.1. Colheita**

Para a colheita de um exsudado vaginal são utilizadas duas zaragatoas, uma com meio de transporte *Amies*, destinando-se ao exame cultural da amostra, e outra zaragatoa sem meio de transporte, para execução do exame microscópico.<sup>(4)</sup> Na colheita de exsudado vaginal, a zaragatoa deve ser introduzida até ao fundo do saco vaginal e/ou paredes vaginais e posteriormente removida com movimentos rotativos.<sup>(4)</sup> As amostras são enviadas ao

laboratório à temperatura ambiente.<sup>(4)</sup> A utente é informada que as relações sexuais são desaconselhadas e não deverá estar menstruada, nem tomar/aplicar antibióticos, antimicóticos ou pomadas, anteriormente à colheita.<sup>(4)</sup>

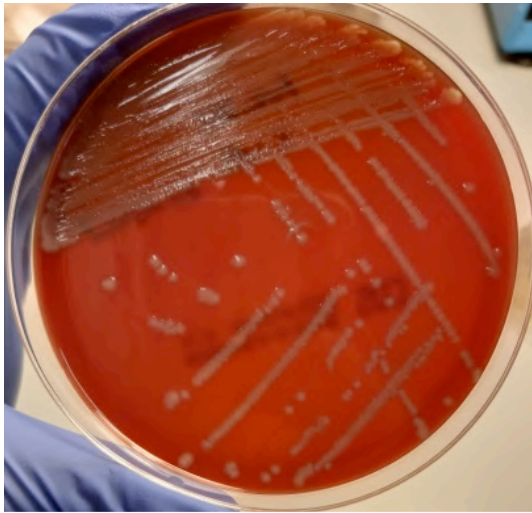
#### **2.1.6.11.2. Processamento laboratorial**

Nas amostras de exsudados vaginais, para deteção e estudo do microrganismo causador da infeção, o procedimento laboratorial engloba a execução de um exame a fresco (pesquisa de microrganismos e elementos celulares). Para além do exame a fresco, são realizados dois exames diretos, que consistem na realização de dois esfregaços do produto biológico, sendo um para posterior coloração de Gram (avaliar o conteúdo em espécies Gram positivas e negativas) e outro para coloração de azul de metileno (melhor visualização de gonococcus caso existam na amostra), sendo posteriormente visualizados ao MO.

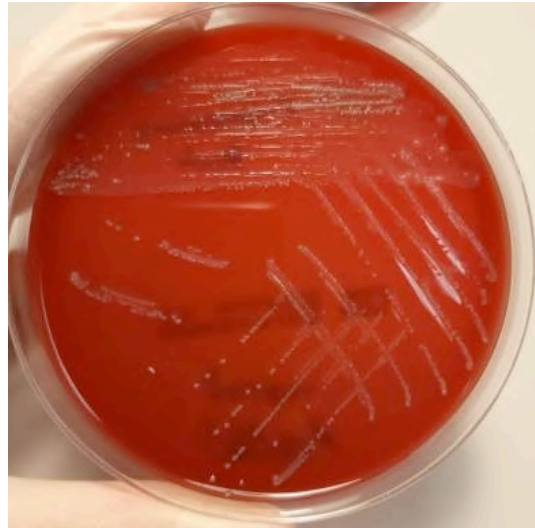
Em paralelo é realizado um exame cultural deste produto biológico que constitui na inoculação do mesmo nos meios de cultura COS, VCA3 e CAN2 a partir da zaragatoa com meio de transporte utilizada na colheita. Os meios COS e VCA3 serão incubados em atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, durante 24/48 horas no caso do meio COS, e durante 72 horas para o meio VCA3. O meio CAN2 deverá ser incubado em aerobiose, a 37 °C durante 24 horas. A cada 24 horas, para todos os meios, efetua-se a observação dos mesmos.

Posteriormente ao período de incubação, procede-se à leitura das placas e, caso se observe crescimento de colónias, efetua-se a identificação e antibiograma do(s) microrganismo(s) no equipamento Vitek<sup>®</sup> 2 Compact.

No decorrer do período de estágio foram observados isolamentos de algumas bactérias decorrentes do processamento laboratorial de exsudados vaginais, estando representados abaixo nas Figuras 43, 44 e 45.



**Figura 43:** Colônias de *Escherichia coli* isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.



**Figura 44:** Colônias de *Streptococcus agalactiae* isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.



**Figura 45:** Colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas em meio COS, a partir do exame cultural de uma amostra de exsudado vaginal.

#### **2.1.6.12. Exsudado vaginal / retal – Pesquisa de *Streptococcus do grupo B***

A análise bacteriológica do exsudado vaginal/retal, no Setor de Microbiologia, é dirigida para o rastreio de SGB, também conhecido como *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas.<sup>(60)</sup>

O SGB é uma bactéria Gram positiva, que geralmente coloniza regiões gastrointestinais, vaginais e retais da mulher de forma assintomática.<sup>(61)</sup> Contudo, a colonização de mucosas vaginais e/ou retal de mulheres grávidas pode levar ao surgimento de infecções, podendo desencadear problemas graves para o feto, como por exemplo pneumonia, sépsis e meningite.<sup>(60, 61)</sup> O rastreio de SGB deverá ser realizado entre as 35-37 semanas de gestação.<sup>(61)</sup>

##### **2.1.6.12.1. Colheita**

Na realização de colheita de um exsudado vaginal/retal utilizam-se duas zaragatoas com meio de transporte, uma para cada região anatómica. A utente deve ser informada, que precedentemente à colheita as relações sexuais, são desaconselhadas e ainda que não se deve encontrar a tomar antibióticos. No laboratório, a colheita deste produto biológico é apenas executado pela Diretora técnica do laboratório e Diretora técnica-adjunta.<sup>(4)</sup>

##### **2.1.6.12.2. Processamento laboratorial**

Para a pesquisa de SGB em mulheres grávidas, o processamento laboratorial de um exsudado vaginal/retal engloba a execução de um exame cultural, procedendo-se inicialmente à inoculação no meio de cultura Tood-Hewitt, com as duas zaragatoas utilizadas na colheita das amostras, incubando a 37 °C, em aerobiose, durante 18-24 horas. Após o tempo de incubação, executa-se a repicagem do meio anteriormente referido para o meio cromogénico STRB, ao qual se deverá aplicar uma incubação em aerobiose, a 37 °C durante 18-24 horas.

A presença de colónias rosa/vermelhas, após o término do período de incubação para o meio STRB, indicam de forma presuntiva a presença de SGB (representado na Figura 46), tendo de ser sujeitas a um teste confirmatório, executado com recurso ao *KIT Pastorex™ STREP B* (Bio-Rad Laboratories, França).



**Figura 46:** Colónias sugestivas de *Streptococcus agalactiae* em meio STRB.

#### **2.1.6.13. Fragmentos de unhas, cabelo e pele**

No Reino *Fungi* existem alguns organismos com capacidade de infetar e degradar tecidos queratinizados (como, por exemplo, unhas, pele e cabelo), tais como os fungos dermatófitos.<sup>(62)</sup>

Os fungos dermatófitos podem ser classificados em três géneros, sendo eles *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, que têm a capacidade de desencadear a infeção superficial fúngica mais comum: a dermatofitose.<sup>(62)</sup>

A dermatofitose geralmente não é invasiva contudo, quando em pacientes imunocomprometidos, pode disseminar-se rapidamente, colocando a vida do paciente em risco.<sup>(62)</sup>

#### **2.1.6.13.1. Colheita**

No que se refere a amostras de unhas e de pele, anteriormente à colheita deve desinfetar-se o local com álcool a 70%, efetuando-se de seguida a raspagem, da unha ou pele, na zona de transição entre o tecido infetado e o tecido saudável.<sup>(63, 64)</sup>

Em amostras de cabelo, após uma desinfeção do local da colheita com álcool a 70%, com o auxílio de uma pinça esterilizada, arranca-se o cabelo, pela raiz, na zona infetada.<sup>(64)</sup>

A colheita do tecido queratinizado é efetuada num recipiente estéril, uma caixa de Petri, sendo posteriormente transportada para o laboratório a uma temperatura entre os 15 °C e os 30 °C.<sup>(64)</sup>

#### **2.1.6.13.2. Processamento laboratorial**

Para a deteção de fungos dermatófitos, causadores de infeção do tecido queratinizado a partir de amostras de unhas, pele e cabelo, entre outros, é executado um exame direto e um exame cultural.

No que se refere ao exame direto, executa-se uma preparação a fresco da amostra com hidróxido de potássio a 30%, observando-se a mesma ao MO, entre lâmina e lamela, para uma rápida deteção do fungo.<sup>(65)</sup>

Em conjunto com o exame direto, realiza-se o exame cultural, no qual se efetuam sementeiras nos meios SAB B-T e SAB CHL ACTI-T, incubando-se os meios em aerobiose, à temperatura ambiente até 30 dias. De 5 em 5 dias verifica-se se ocorreu crescimento de fungos nos meios referidos.

Caso se verifique turvação no meio SAB B-T, efetua-se uma repicagem para o meio sólido SAB CHL ACTI-T. Quando no meio SAB CHL ACTI-T se observa crescimento de colónias procede-se a uma repicagem para o meio Malte Agar (fornecido pelo Laboratório Tomaz S.A., indicado para o crescimento de fungos) incubando até 7 dias, em aerobiose e à temperatura ambiente.

Perante o crescimento de colónias no meio Malte Agar procede-se à análise macroscópica das características das colónias, e microscópica do fungo.

Para a análise microscópica realiza-se uma preparação a fresco, em lâmina, de uma gota de azul de lactofenol, na qual inocula-se um fragmento da colónia isolada do microrganismo, sendo posteriormente observada ao MO, com a finalidade de analisar as estruturas fúngicas.<sup>(65)</sup>

### **2.1.7. Controlo de qualidade**

No Setor de Microbiologia são realizados dois controlos de qualidade, um controlo de qualidade interno (CQI) e um controlo de qualidade externo (CQE), com a finalidade de assegurar a fiabilidade dos procedimentos e resultados obtidos do processamento de diversos produtos biológicos.

O CQI consiste no controlo semanal do correto funcionamento e desempenho das cartas de ID e TSA do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact com estirpes padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), como também do próprio equipamento. Semanalmente são utilizadas em conjunto as estirpes de *Escherichia coli* ATCC 25922 com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, de forma alternada.

O CQI engloba ainda o controlo de esterilidade da solução salina, existente no Setor de Microbiologia, sendo executado todas as semanas. Diariamente é também efetuado o controlo da leitura do densitómetro e das temperaturas de frigoríficos e estufas.

Relativamente ao CQE, o Setor de Microbiologia do Laboratório José Manuel Chau S.A. participa em dois programas de CQE, sendo eles: o programa *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS), aplicado à bacteriologia e o Programa de *Supervision Externa de la Calidad - Asociacion Española del Laboratorio Clínico* (PSEC-AEFA), aplicado à parasitologia.

### **2.1.8. Conclusão**

Por intermédio do estágio curricular realizado no Setor de Microbiologia do Laboratório José Manuel Chau S.A., foi-me permitido perceber o papel que este setor apresenta a nível da identificação de agentes etiológicos de infeções e a sua importância no auxílio do diagnóstico clínico, monitorização e tratamento de doenças infecciosas.

No decorrer do estágio entrei em contacto direto com a rotina laboratorial, da qual fui parte integrante, onde desempenhei e aprendi métodos e técnicas de diagnóstico microbiológico e aprofundei os conhecimentos adquiridos ao longo de dois anos do Mestrado.

Para além do enunciado, tive oportunidade de acompanhar e realizar a análise à urina tipo II e o exame parasitológico no Setor Urianálise/Parasitologia que enriqueceram o meu conhecimento.

Ainda tive a possibilidade de observar, na qualidade de membro integrante, como funciona de maneira integrada a constituição de todo o sistema de comunicação e processamento do laboratório José Manuel Chau S.A..

Em suma, considero que os objetivos inicialmente propostos para o estágio no Setor de Microbiologia foram alcançados, facultando-me ferramentas essenciais para o mundo laboral.



## 2.1.9. Referências Bibliográficas

1. Sanchez-Romero MI, Garcia-Lechuz Moya JM, Gonzalez Lopez JJ, Orta Mira N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(2):127-34.
2. Misawa S. [Rapid diagnosis of infectious diseases; features and limitations of the microscopic examination of clinical specimens]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*. 1999;10(2):121-31.
3. Bisen PS. MICROBIAL STAINING. Bisen Prakash S *Microbes in Practice*. 1 ed: IK International New Delhi; 2014. p. 139-55.
4. Fonseca ABS, 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. “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.2004. Available from: <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. 24 Abril 2020].
5. Yunusa Th airu IAN, Yahaya Usman. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. 2014;1(4):168-174.
6. Van Deun A, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(1):108-10.
7. M Domeika AS, E Sokolovskiy , R Ballard , M Unemo. Guidelines for laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in East-European countries Part 1. Gonorrhoea, sampling and microscopy for diagnosis. *Europe's journal on infectious disease surveillance, epidemiology, prevention and control*. 2007;14:65–74.
8. Laupland KB, Valiquette L. The changing culture of the microbiology laboratory. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2013;24(3):125-8.
9. bioMérieux SA. GET A culture AHEAD.2011.Available from: [https://www.biomerieux.es/sites/subsidiary\\_es/files/02-12\\_9301631-002-gb-c\\_catalogue\\_ppm.pdf](https://www.biomerieux.es/sites/subsidiary_es/files/02-12_9301631-002-gb-c_catalogue_ppm.pdf) [ Consult. 1 Maio 2020].
10. Bula informativa do Kit Reagente Oxidase (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França).Ref:55635.Availablefrom:[https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package\\_Insert/1713001-1714000/Package\\_Insert\\_-\\_11059\\_-\\_D\\_-\\_55635.pdf](https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/techlib/documents/docLink/Package_Insert/1713001-1714000/Package_Insert_-_11059_-_D_-_55635.pdf) [ Consult. 1 Maio 2020].
11. Sizar O, Unakal CG. Gram Positive Bacteria. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.

12. Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1527-48.
13. Bula informativa do Kit ID indol TDA (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 56541.
14. James AL, Yeoman P, Rasburn JW, Ng M. Sensitive reagents for detection of indole production by bacteria. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*. 1986;262(2):195-202.
15. Bula informativa do Kit Pastorex™ Strep B latex (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França). Ref: 61727
16. Nkembe NM, Kamga HG, Baiye WA, Chafa AB, Njotang PN. Streptococcus agalactiae prevalence and antimicrobial susceptibility pattern in vaginal and anorectal swabs of pregnant women at a tertiary hospital in Cameroon. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):480.
17. van Griethuysen A, Bes M, Etienne J, Zbinden R, Kluytmans J. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):86-9.
18. bioMérieux SA. “VITEK® 2 Compact”: Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.; 2018b. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-compact> [ Consult. 8 Maio 2020].
19. Michalik S, bioMérieux SA. “How does VITEK® 2 Generate MIC Values?”: Marcy-l'Étoile: bioMérieux S.A.; 2017. Available from: <https://www.biomerieux-microbio.com/education/how-does-vitek-2-generate-mic-values/> [ Consult. 8 Maio 2020].
20. Pincus DH. “Microbial Identification using the bioMérieux Vitek® 2 System”: Hazelwood, MO, Estado Unidos da América: bioMérieux Inc.; 2006. 1-32 p.
21. Antibiotic susceptibility diagnostics for the future. *Nat Microbiol*. 2019;4(10):1603.
22. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1645-58.
23. Hickling DR, Sun TT, Wu XR. Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4).
24. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: a comprehensive review. *Am Fam Physician*. 2005;71(6):1153-62.
25. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(5):269-84.
26. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(4):211-26.
27. Najjar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol*. 2009;19(4):129-39.

28. Oyaert M, Van Meensel B, Cartuyvels R, Frans J, Laffut W, Vandecandelaere P, et al. Laboratory diagnosis of urinary tract infections: Towards a BILULU consensus guideline. *J Microbiol Methods*. 2018;146:92-9.
29. Ada O, Lima O. Interpretation of Urinalysis and Urine Culture for UTI Treatment. *US Pharmacist – The Leading Journal in Pharmacy*. 2013;38(11):65-8.
30. Silva SdB. Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2016.
31. Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, Croci MD, Bayer G, Kranicz T. Urine sediment analysis: Analytical and diagnostic performance of sediMAX - a new automated microscopy image-based urine sediment analyser. *Clin Chim Acta*. 2010;411(3-4):147-54.
32. Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis*. 2004;38(8):1150-8.
33. bioMerieux S.A. CHROMID® CPS® ELITE.2018.Available from: [https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary\\_us/files/18\\_chromid\\_reading-guides\\_v3-digital.pdf](https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18_chromid_reading-guides_v3-digital.pdf) [ Consult. 1 Maio 2020].
34. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(9):944-55.
35. Trombley C, Anderson JD. SIGNAL blood culture system for detection of bacteremia in neonates. *J Clin Microbiol*. 1987;25(11):2098-101.
36. Mengistu A, Gaeseb J, Uaaka G, Ndjavera C, Kambyambya K, Indongo L, et al. Antimicrobial sensitivity patterns of cerebrospinal fluid (CSF) isolates in Namibia: implications for empirical antibiotic treatment of meningitis. *J Pharm Policy Pract*. 2013;6(1):4.
37. Micheel V, Hogan B, Koller T, Warnke P, Crusius S, Hinz R, et al. Screening agars for MRSA: evaluation of a stepwise diagnostic approach with two different selective agars for the screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Mil Med Res*. 2015;2:18.
38. Green BN, Johnson CD, Egan JT, Rosenthal M, Griffith EA, Evans MW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists(). *J Chiropr Med*. 2012;11(1):64-76.
39. Karunanayake CP, Albritton W, Rennie DC, Lawson JA, McCallum L, Gardipy PJ, et al. Ear Infection and Its Associated Risk Factors in First Nations and Rural School-Aged Canadian Children. *Int J Pediatr*. 2016;2016:1523897.
40. Egbe CA, Ndiokwere C, Omoregie R. Microbiology of lower respiratory tract infections in benin city, Nigeria. *Malays J Med Sci*. 2011;18(2):27-31.

41. WHO-World Health Organization. “Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Deaths By Cause, Age And Sex, By World Bank Income Group, 2000-2015” Geneva, Suíça: World Health Organization. 2018. Available from: [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/) [ Consult. 20 Junho 2020].
42. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013;5(1):e2013070.
43. Cadmus SI, Falodun OI, Fagade OE. Methods of sputum decontamination with emphasis on local tuberculosis laboratories. *Afr J Med Med Sci.* 2011;40(1):5-14.
44. Patterson RA, Thompsom TL, Larsen DH. The use of zephiran in the isolation of *M. tuberculosis*. *Am Rev Tuberc.* 1956;74(2 Part 1):284-8.
45. Bula informativa do Kit Tratamento dos produtos de expetoração (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França). Ref: 55222.
46. Amjad M. An Overview of the Molecular Methods in the Diagnosis of Gastrointestinal Infectious Diseases. *Int J Microbiol.* 2020;2020:8135724.
47. Kaakoush NO, Castano-Rodriguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):687-720.
48. Bula informativa do Kit *Campylobacter* Balea (BEORTEK S.A., ASUAKOWORKING). Ref: 160803019
49. Harizanov R, Rainova I, Tsvetkova N, Kaftandjiev I, Borisova R, Ivanova A, et al. Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among the Bulgarian Population Over a Three Year Period (2015 - 2017). *Helminthologia.* 2020;57(1):12-8.
50. Mohram AF, Elawamy WE, Nageeb MM, Ali HS, Kishik SM. Combined Mini-Parasep SF and Nanogold Immunoassay Show Potential in Stool Antigen Immunodetection for Giardiasis Diagnosis. *Sci Rep.* 2020;10(1):2.
51. Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbinteanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J Med Life.* 2017;10(2):112-7.
52. Kakiuchi T, Okuda M, Hashiguchi K, Imamura I, Nakayama A, Matsuo M. Evaluation of a Novel Stool Antigen Rapid Test Kit for Detection of *Helicobacter pylori* Infection. *J Clin Microbiol.* 2019;57(3).
53. Hrabak J, Chudackova E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):839-53.
54. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432-8.

55. Kohler PP, Melano RG, Patel SN, Shafinaz S, Faheem A, Coleman BL, et al. Emergence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, South-Central Ontario, Canada(1). *Emerg Infect Dis.* 2018;24(9):1674-82.
56. Moi H, Blee K, Horner PJ. Management of non-gonococcal urethritis. *BMC Infect Dis.* 2015;15:294.
57. Young A, Toncar A, Wray AA. Urethritis. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2020.
58. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2016;902:83-93.
59. Khoudia Diol J-CD, Anthony Levasseur. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Human Microbiome Journal.*2019;11:100051.
60. Vieira LL, Perez AV, Machado MM, Kayser ML, Vettori DV, Alegretti AP, et al. Group B Streptococcus detection in pregnant women: comparison of qPCR assay, culture, and the Xpert GBS rapid test. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):532.
61. Rosen GH, Randis TM, Desai PV, Sapra KJ, Ma B, Gajer P, et al. Group B Streptococcus and the Vaginal Microbiota. *J Infect Dis.* 2017;216(6):744-51.
62. R. Kumar SKS, A. Pandey, H. Pandey, A. Pathak and A. Dikshit. DERMATOPHYTOSIS: INFECTION AND PREVENTION -A REVIEW. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH.* 2016;7(8):3218-25.
63. Leelavathi M, Tzar M. Brief report: nail sampling technique and its interpretation. *Malays Fam Physician.* 2011;6(2-3):58-9.
64. Chaya AK, Pande S. Methods of specimen collection for diagnosis of superficial and subcutaneous fungal infections. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007;73(3):202-5.
65. Forbes BAS, D. F. Weissfeld, A. S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12 ed2007.

## **PARTE III**

### **Deteção SARS-CoV-2**

### 3.1. Introdução

No decorrer da história da civilização humana foram documentadas algumas pandemias que afetaram desde milhares a milhões de vidas.<sup>(1)</sup> No século XIV testemunhou-se a pandemia mais devastadora registada na história da humanidade, tendo ficado conhecida como peste bubónica ou peste negra.<sup>(2)</sup> No ano de 1918, a gripe espanhola assolou o mundo infetando cerca de 500 milhões de pessoas.<sup>(2)</sup> Passando para o ano de 1957, nova pandemia foi documentada, desta vez a gripe asiática. Em 2009, o mundo foi novamente confrontado com mais um fenómeno pandémico, denominado de gripe suína.<sup>(2)</sup>

Não obstante dos avanços da medicina e da ciência no combate aos fenómenos pandémicos, na atualidade o mundo continua a enfrentar o desafio de hostilizar novos microrganismos patogénicos que configuram uma ameaça para o sistema de saúde, economia mundial e inúmeras vidas humanas.<sup>(1)</sup>

Com a chegada do final do ano de 2019, a comunidade mundial foi informada da existência de um surto de doença respiratória aguda desconhecida em Wuhan, uma cidade situada na província de Hubei, na China.<sup>(1)</sup> Verificou-se que o agente etiológico desta doença é um novo coronavírus, nunca antes detetado, sendo intitulado SARS-CoV-2.<sup>(1)</sup> Em janeiro de 2020, a OMS denominou a doença causada pelo SARS-CoV-2 de COVID-19.<sup>(1)</sup> A 11 de março de 2020, a OMS elevou o surto a pandemia com a finalidade de alertar todos os países para o fenómeno que estamos a viver e incentivar a sua atuação no controlo e deteção da COVID-19.<sup>(1)</sup> Naquela data, o número de casos de COVID-19 confirmados estava nos 118 319, com 4292 mortes.<sup>(3)</sup> Na atualidade, a COVID-19 afeta mais de 200 países.<sup>(4)</sup>

O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus a ser detetado como vírus zoonótico, podendo causar doença em Humanos e cuja sintomatologia pode variar de doença leve a crítica, ou ser mesmo fatal.<sup>(1, 5)</sup> Este vírus é altamente transmissível, sendo referida como a principal via de transmissão as gotículas respiratórias de pessoas infetadas, por contacto próximo.<sup>(6)</sup> A sintomatologia mais comum envolve a ocorrência de febre, tosse seca e cansaço, frequentemente confundida com uma gripe vulgar, sendo muitas vezes estes sintomas desvalorizados, o que dificulta a deteção de casos COVID-19.<sup>(1, 5)</sup>

Na população, indivíduos com idade superior a 65 anos e pessoas com doenças crónicas subjacentes apresentam um maior risco a doenças graves (18,5%).<sup>(5)</sup>

A mortalidade associada à COVID-19 tem vindo a aumentar de forma catastrófica, estando em 13 de novembro estimada em cerca de um milhão de mortes, à escala global. O número de casos COVID-19 confirmados estava, nessa data, em mais de 50 milhões.<sup>(7)</sup>

Por todo o mundo, vários países implementam medidas de prevenção como forma de travar a propagação do vírus, que variam deste o uso obrigatório de máscara, confinamento parcial ou total, distanciamento social até ao fecho de fronteiras, entre outras medidas.<sup>(8)</sup>

A pandemia atual está a criar uma crise sem precedentes, tornando-se um desafio feroz para os governos no mundo inteiro, devido à sua rápida transmissão, ao impacto na mortalidade, à falta de tratamento e ao impacto negativo que está a criar quer na sociedade, quer na economia global e na saúde pública.<sup>(9)</sup>

Na atualidade, não existe nenhum agente antiviral terapêutico para o SARS-CoV-2 disponível no mercado.<sup>(5)</sup> O mundo da ciência rapidamente despendeu esforços para o desenvolvimento de vacinas, existindo várias com resultados promissores contra a COVID-19 e com mais de 90% de eficácia na prevenção do SARS-CoV-2.<sup>(10)</sup> Com o início da vacinação no final de dezembro de 2020, esta medida parece ser a esperança mundial no combate à pandemia existente.<sup>(10, 11)</sup>

Posto isto, tendo estagiado num laboratório onde se realizam testes para a deteção de SARS-CoV-2 e perante os resultados emitidos por várias pesquisas, achei oportuno verificar do ponto de vista estatístico até que ponto os dados sobre a sintomatologia mais frequente, as idades, o sexo e as comorbilidades associadas à COVID-19 correspondem a um maior risco para a infeção com o SARS-CoV-2.



### **3.1.1. COVID-19: do surto à expansão global**

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, iniciou-se a maior emergência de Saúde Pública que estamos a viver na atualidade, quando indivíduos apresentaram pneumonia de etiologia desconhecida e relataram sintomas que eram coincidentes, como a tosse seca, febre e dispneia.<sup>(1)</sup>

De acordo com fontes oficiais Chinesas, os primeiros casos de pneumonia de etiologia desconhecida foram relacionados com o Mercado de Marisco de Huanan.<sup>(1)</sup> A 30 de dezembro, na busca por determinar a identidade do microrganismo patogénico da infeção pulmonar que estava a assolar Wuhan, amostras de fluido retirado de lavagens bronco-alveolares de um paciente que continha essa infeção foram colhidas e enviadas para uma empresa de sequenciação para proceder à identificação do microrganismo patogénico.<sup>(1)</sup>

As análises bioinformáticas e da sequenciação do genoma completo evidenciaram que estávamos perante um novo coronavírus, do género betacoronavírus, com cerca de 82% de similaridade para a identidade da sequência do genoma com o vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV).<sup>(1, 12)</sup> Ainda no mês de dezembro as autoridades Chinesas reportaram a situação existente à OMS.<sup>(1)</sup>

Já no ano de 2020, em janeiro, foi comunicado oficialmente um novo coronavírus como a causa do surto observado em Wuhan, sendo posteriormente denominado de SARS-CoV-2.<sup>(1)</sup> Em meados do mês de janeiro foi confirmado o primeiro caso de COVID-19 fora da China Ocidental.<sup>(1)</sup>

Com o aumento contínuo de novos casos de COVID-19, a 30 de janeiro de 2020 foi declarado o surto como uma emergência de saúde pública mundial pela OMS com 7818 casos confirmados em 19 países.<sup>(1, 13)</sup> Ainda que todo o globo tenha, em associação, implementado esforços com a finalidade de prevenir a transmissão SARS-CoV-2 por intermédio do encerramento de escolas, quarentena de pessoas infetadas e seus familiares, confinamento obrigatório e pelo distanciamento social, a propagação do vírus não foi controlada, passando a OMS a 11 de março do ano de 2020 a caracterizar o surto com uma pandemia.<sup>(1, 5, 13)</sup>

Em 13 de março de 2020, a OMS considerou a Europa o epicentro da pandemia, chegando mesmo a Itália a ultrapassar a China no número de óbitos e a 26 de março do presente ano os Estados Unidos da América ultrapassaram tanto a China como a Itália, tendo o maior

número de casos COVID-19 confirmados em todo o globo.<sup>(14-16)</sup> Nesta altura, o SARS-CoV-2 propagou-se para mais de 200 países.<sup>(1)</sup>

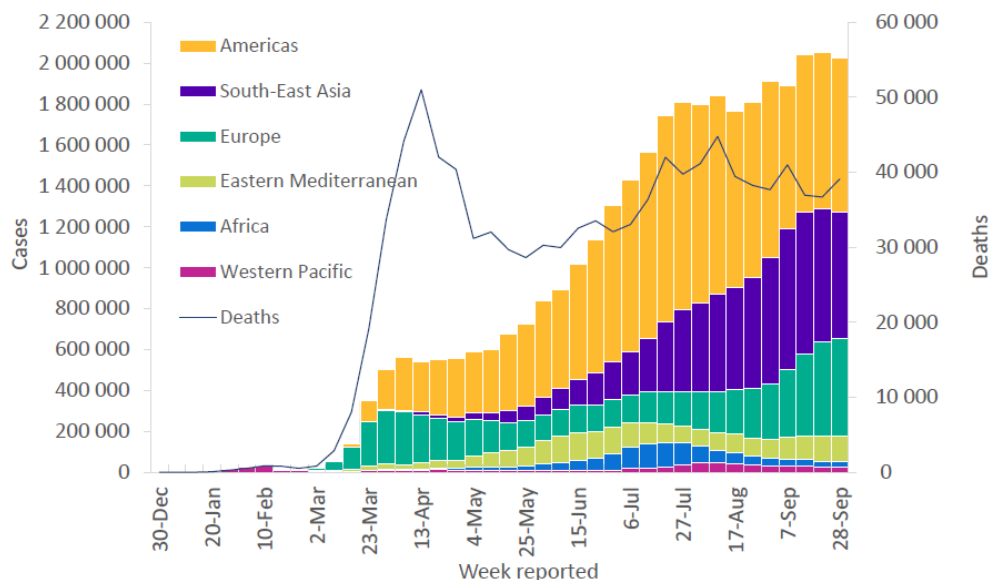
No mês de abril de 2020, mais precisamente no dia 4, o mundo ultrapassou um milhão de casos COVID-19 confirmados com um número de óbitos que ascendia aos 50 mil, com a Europa a revelar mais de metade dos indivíduos com COVID-19.<sup>(17)</sup>

Em maio do mesmo ano, no dia 31, foram relatados mais 117 551 novos casos em todo o mundo e mais de 4 mil novas mortes pela COVID-19.<sup>(18)</sup> A 29 de junho do ano de 2020, a OMS alertou o mundo para o aumento da propagação do vírus à medida que cada país reabria a sua economia.<sup>(19)</sup>

Globalmente, em julho ultrapassou-se os 15 milhões de casos confirmados COVID-19 e os 600 mil óbitos, com as Américas a contribuírem com um número mais expressivo para os valores referidos.<sup>(20)</sup> A OMS, na semana do término de agosto, foi notificada da ocorrência de mais de 1,8 milhões de novos casos COVID-19 e 38000 novas mortes, ocorrendo um aumento de 1% no número de casos e uma diminuição de 3% no número de mortes em comparação com a semana de 17 a 23 do mesmo mês, com as Américas a representar a maior carga COVID-19 no mundo.<sup>(21)</sup>

Nas três semanas anteriores a 4 de outubro, o número de casos COVID-19, por semana, manteve-se estável representando cerca de 2 milhões de novos casos, com um total de casos de mais de 34,8 milhões, desde o dia 30 de janeiro até ao dia 4 de outubro de 2020 (Figura 1).<sup>(22)</sup>

A nível mundial, mais de 1 milhão de mortes já foram relatadas, das quais a maioria ocorreram nas Américas, representando 55% do total das mortes, seguindo-se a Europa (23%). Na semana de 28 de setembro a 4 de outubro, 91% dos novos casos corresponderam à Europa, Sudoeste Asiático e Américas.<sup>(22)</sup>



**Figura 1:** Número de casos COVID-19 relatados pela OMS semanalmente e número de óbitos no mundo, no período de 30 de dezembro de 2019 e 4 de outubro 2020. (Fonte: WHO. Weekly epidemiological update - 5 October 2020<sup>(22)</sup>)

Mundialmente, os casos COVID-19 confirmados representam uma maior percentagem na faixa etária dos 25 aos 39 anos, correspondendo a cerca de 50% dos casos. Todavia, o número de óbitos tende a aumentar com a idade. Pessoas com idades iguais ou superiores a 65 anos representam 75% das mortes por COVID-19.<sup>(22)</sup>

Ao longo do tempo, a Europa continua a revelar um aumento acelerado quer no número de novos casos, quer no número de óbitos.<sup>(23)</sup> Na semana de 11-17 de outubro, o número de novos casos foi superior a 927 000, com um aumento de 25% em contraste com a semana anteriormente indicada, retratando 38% dos novos casos em todo o mundo.<sup>(23)</sup> No que se refere ao número de óbitos na Europa reportadas à OMS, em comparação com a semana de 11 a 17 de outubro e a semana anterior a esta, o número de mortes aumentou cerca de 29%.<sup>(23)</sup>

Em regiões como África, Mediterrâneo Ocidental e Pacífico Oriental, quer o número de mortes, quer o número de novos casos têm vindo a aumentar mas de forma mais gradual que na Europa.<sup>(23)</sup> Diversos países observam novamente um aumento do número de novos casos e em muitos a segunda vaga COVID-19 excede o valor obtido nos picos precedentes (com maior relevância nos países Europeus). Por contraste, em países como Brasil, Peru e Colômbia observa-se um declínio progressivo do número de novos casos COVID-19.<sup>(23)</sup>

A Austrália é um exemplo de país que conseguiu um decréscimo do número de novos casos, com reduções expressivas relativamente a picos anteriores.<sup>(23)</sup>

Ainda que em alguns países o número de casos comece a regredir, os epidemiologistas alertam que estamos longe de cessar a pandemia.<sup>(5)</sup>

### **3.1.2. COVID-19 em Portugal**

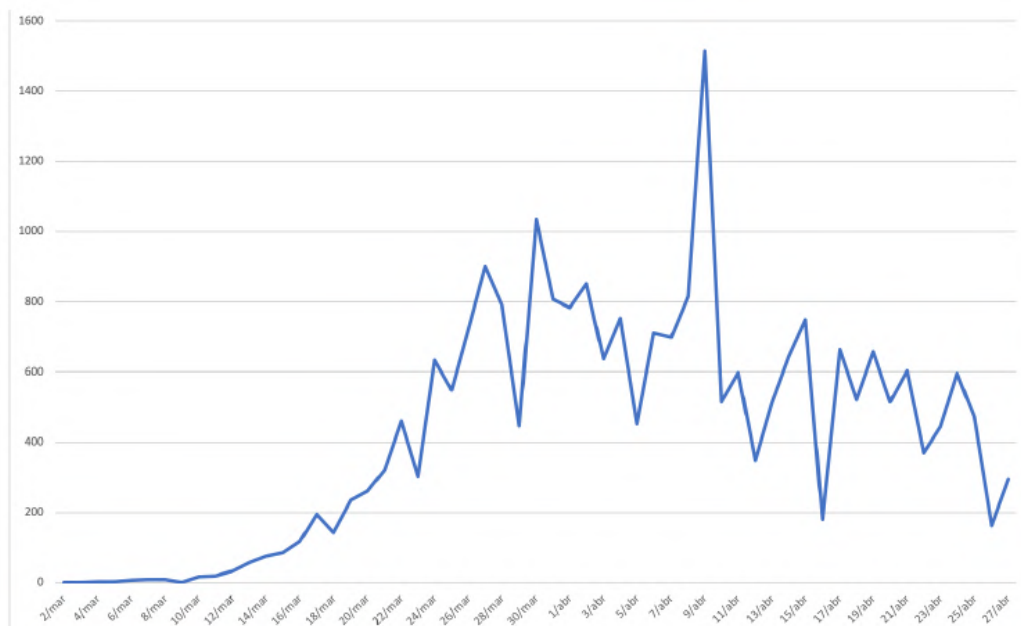
A pandemia COVID-19 iniciou-se em Portugal no dia 2 de março de 2020. O governo português, motivado pela vertiginosa progressão da COVID-19 noutros países do globo, com maior ênfase na vizinha Espanha, implementou de forma precoce medidas com a finalidade de controlar a pandemia existente.<sup>(24, 25)</sup>

As medidas começaram a ser implementadas em meados de março, com a restrição da vida social e da atividade económica do país, numa altura em que Portugal apenas apresentava 62 casos COVID-19 por milhão de habitantes. O baixo número de casos COVID-19 contrastava com o país vizinho, Espanha, e com a Itália e o Reino Unido, cuja implementação de medidas de controlo e prevenção da infeção foram aplicadas numa fase mais tardia no decurso da pandemia. A 18 de março de 2020, o governo português declarou o estado de emergência.<sup>(24, 25)</sup>

Foram instaladas medidas de mitigação e contenção muito rigorosas que incluíram o encerramento de escolas, serviços públicos, locais laborais, confinamento obrigatório da população, distanciamento social e restrição de circulação quer nacional, quer também internacional.<sup>(24)</sup> O povo português rapidamente cumpriu as medidas impostas pelo governo, registando-se uma redução de cerca de 80% na sua mobilidade.<sup>(24, 25)</sup>

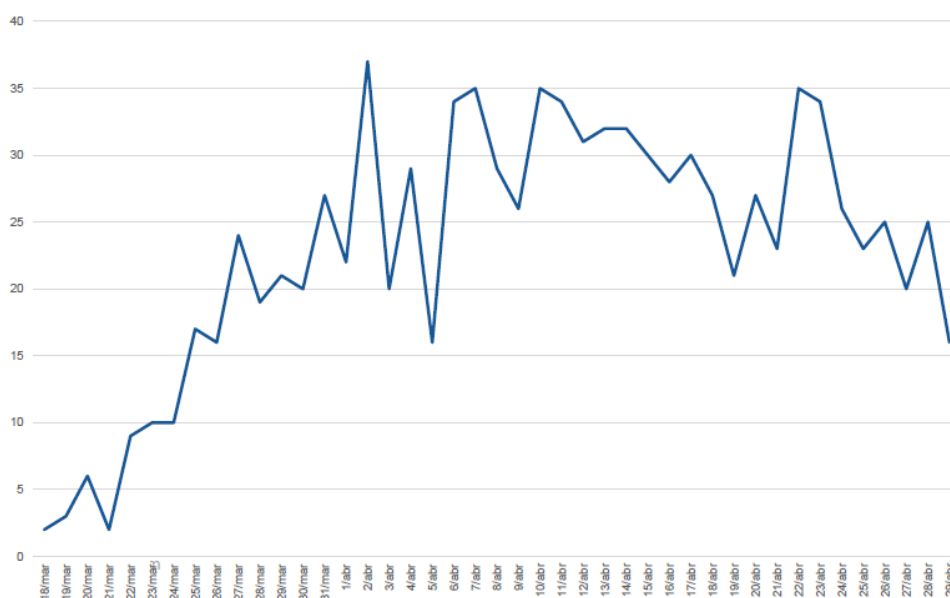
A COVID-19, em Portugal e no mês de março de 2020, registou 187 mortes devido à infeção por SARS-CoV-2, com uma taxa de mortalidade de 2,3% e 8521 casos COVID-19 confirmados.<sup>(24, 25)</sup>

Em abril, o governo português e as autoridades sanitárias do país competentes começavam a organizar o término faseado das medidas de contingência aplicadas para o controlo da pandemia, de acordo com as orientações emanadas pela União Europeia.<sup>(24, 25)</sup> No decorrer desse mês, o país revelou uma diminuição do número de novos casos, encontrando-se no término do mês com menos de 400 casos COVID-19 notificados (Figura 2).<sup>(26)</sup>



**Figura 2:** Evolução diária de novos casos COVID-19 notificados em Portugal de 2 de março a 27 de abril de 2020. (Fonte: XXII Governo 2020<sup>(26)</sup>)

No que se refere ao número de óbitos, ao longo do mês de abril verificou-se um decréscimo, sendo no seu término inferior a mil mortes, com um sistema de saúde ainda sem saturação (Figura 3).<sup>(25, 26)</sup>



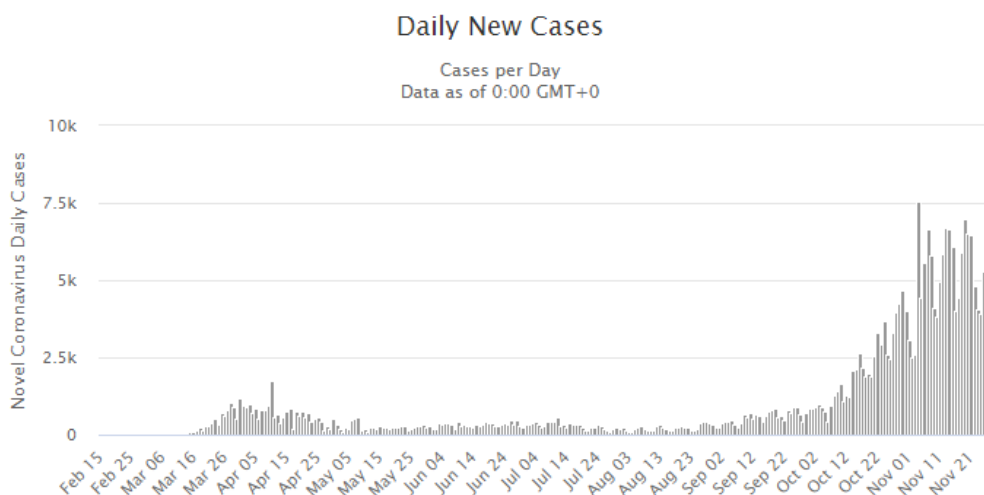
**Figura 3:** Evolução diária de óbitos por COVID-19 em Portugal de 18 de março a 29 de abril de 2020. (Fonte: XXII Governo 2020<sup>(26)</sup>)

Um estudo publicado por Ricoca *et al.* (2020), no qual foi determinado o impacto das medidas de contingência implementadas no país, revelou que entre 1 a 15 de abril ocorreram menos 23% de infeções por SARS-CoV-2, menos 25% de mortes e menos 69% de internamentos nos cuidados intensivos do que era esperado para este período de tempo.<sup>(25)</sup> Estes valores sugerem que a intervenção do governo, na forma precoce como aplicou medidas de mitigação e contenção, em associação com o cumprimento em massa da população portuguesa, favoreceram a existência de valores inferiores aos esperados, na fase inicial da primeira vaga da COVID-19.<sup>(25)</sup>

Estes fatores pareciam evidenciar que Portugal estava a conseguir controlar a pandemia, sendo alvo de muitos elogios pela imprensa internacional.<sup>(25, 27)</sup>

No dia 30 de abril, o estado de emergência terminou e aprovou-se um plano para iniciar a libertação progressiva das medidas de restrição impostas no país.<sup>(26)</sup>

Do meio do mês de maio ao início do mês de julho em Portugal, o decréscimo do número de novos casos COVID-19, foi interrompido (Figura 4), verificando-se um aumento dos mesmos.<sup>(24, 28)</sup> Neste período, os novos casos estavam localizados na sua maioria nas áreas urbanas e suburbanas de Lisboa.<sup>(24)</sup>



**Figura 4:** Novos casos diários COVID-19 em Portugal. (Fonte: Worldometer 2020<sup>(28)</sup>)

Com a economia a abrir de forma gradual, a reabertura das escolas e o retorno ao mercado de trabalho, o mês de setembro superou os 10 mil contactos.<sup>(29)</sup>

Em outubro vários hospitais alertaram para o facto de poderem entrar em rotura, com o número insuficiente de profissionais de saúde, o cansaço extremo que apresentavam e a escassez de camas nos cuidados intensivos.<sup>(30)</sup>

Com o aumento exponencial dos casos desde setembro (como se pode verificar pela figura 4 anteriormente apresentada), o governo português, a 18 de outubro, declara o estado de calamidade, com o número de novos casos no final de outubro a ultrapassar diariamente mais de 4 mil novos casos COVID-19, 33 mortos e 7 novos internamentos, com a região norte a representar 80% dos novos casos.<sup>(31)</sup>

Em face do exposto, com os dados alarmantes existentes do SARS-CoV-2 em Portugal, o país não deverá baixar a guarda continuando no combate à pandemia.

### 3.1.3. Coronavírus

Os coronavírus (CoV), são um grupo de vírus conhecidos desde meados do ano 1960, pertencentes à família *Coronaviridae*, sendo classificados em quatro subgrupos: alfacoronavírus, betacoronavírus, gamacoronavírus e deltacoronavírus.<sup>(32)</sup>

Os membros da família *Coronaviridae* possuem capacidade de infetar humanos e uma grande variedade de animais, originando doenças neurológicas, entéricas e respiratórias.<sup>(32)</sup>

Os gamacoronavírus e os deltacoronavírus afetam principalmente aves, podendo também infetar mamíferos, contudo até à data não existem relatos de infeção/doença em humanos causadas por estes dois subgrupos de vírus.<sup>(33)</sup> Em oposição, tanto os alfacoronavírus como os betacoronavírus apresentam a capacidade de desencadear doenças respiratórias e gastrointestinais em humanos e animais.<sup>(33)</sup>

O genoma dos CoV consiste numa molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples de sentido positivo. Na superfície externa do vírus são observados peplómeros de grandes dimensões que se assemelham a uma coroa, daí a utilização do nome coroa.<sup>(12, 33)</sup>

Aos CoV são associadas elevadas taxas de mutação e de frequência de recombinação, fatores que podem contribuir para a sua adaptabilidade a novos nichos ecológicos e ambientais.<sup>(34)</sup>

Até ao ano de 2003, os CoV humanos não eram considerados vírus mortais.<sup>(33)</sup> Todavia, tudo mudou quando em 2003 o mundo detetou o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), considerada a primeira grande pandemia do século XXI, com

origem na província de Guangdong, na China. A nível mundial, esta pandemia provocou mais de 8 mil pacientes infetados e uma taxa de mortalidade 9%.<sup>(12, 35)</sup>

Passados nove anos, foi descoberta uma nova espécie de CoV com origem na Arábia Saudita denominada como síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV). Dados relatados indicam que o MERS-CoV infetou mais de 2400 indivíduos, provocando 838 mortes.<sup>(35)</sup>

Recentemente, no final de 2019, o governo chinês alertou a OMS para a ocorrência de um número anormal de casos de pneumonia viral incomum, sendo em 2020 descoberto que o agente patogénico causador daquelas doenças infecciosas é um novo CoV nunca antes identificado, denominado de SARS-CoV-2, descobrindo-se que pertence ao grupo dos betacoronavírus.<sup>(12, 33)</sup>

Atualmente a doença provocada por este CoV afeta mais de 200 países em todo o mundo.<sup>(33)</sup>

#### **3.1.4. Origem do SARS-CoV-2**

Como forma de prevenir e controlar uma pandemia, a identificação dos hospedeiros, da sua origem e o caminho de evolução do agente patogénico revelam-se ser pontos cruciais.<sup>(1)</sup>

A origem do surto SARS-CoV-2 ocorreu no mercado de marisco de Hunan, na cidade de Wuhan, China.<sup>(33, 35)</sup> Neste mercado são vendidos animais vivos terrestres e aquáticos como, por exemplo, morcegos, cobras, ratos, propondo uma origem zoonótica do vírus.<sup>(33, 35)</sup>

Investigações publicadas sugerem que o SARS-CoV-2 provém de morcegos, podendo resultar da combinação de um CoV do morcego comum com um CoV de origem desconhecida, sendo transmitido aos humanos através de um hospedeiro animal intermediário.<sup>(33, 36)</sup> O pangolim chegou a ser apontado como o hospedeiro intermediário deste vírus, uma vez que amostras provenientes de pangolins foram analisadas e revelaram novos genomas de CoV com 85 a 92% de similaridade com o SARS-CoV-2.<sup>(1)</sup>

Mais pesquisas estão a ser desenvolvidas para saber a origem concreta do SARS-CoV-2.

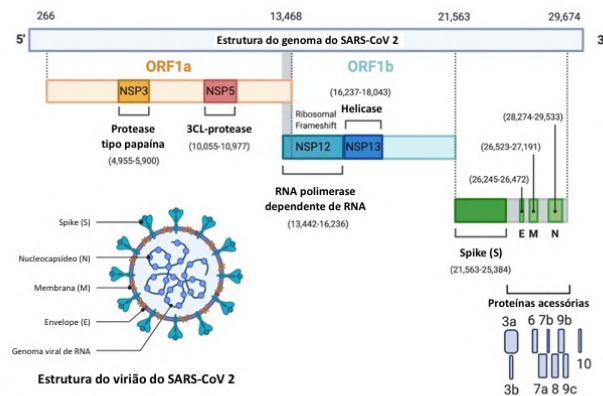
#### **3.1.5. Estrutura do SARS-CoV-2**

O SARS-CoV-2 é um vírus de envelope de RNA de cadeia simples, pertencente ao género betacoronavírus. Através da microscopia eletrónica deste vírus, verificou-se que a sua



forma é esférica, contendo na superfície externa vários peplômeros que conferem a aparência de coroa ao vírus, morfologia esta consistente com os restantes membros da família *Coronaviridae*.<sup>(6, 37)</sup>

A estrutura do genoma (Figura 5) apresenta na sua extremidade 5' a *open reading frame* (ORF) 1a e ORF1b que ocupam cerca de dois terços de todo o comprimento do genoma, codificando duas poliproteínas (pp), pp1a e a pp1b, respetivamente. Para além disso, codifica cerca de dezasseis proteínas não estruturais (NSP). As NSP são processadas com a finalidade de formar um complexo de transcrição e replicação no genoma do hospedeiro.<sup>(12, 33)</sup>



**Figura 5:** Organização do genoma do SARS-CoV-2. (Adaptado de Alanagreh L *et al.*, 2020<sup>(33)</sup>)

Na Figura 5 encontram-se representadas algumas NSP, como a NSP3 e NSP5 que codificam, respetivamente, uma protease tipo papaína e 3CL protease, atuando ambas como proteínas de clivagem de peptídeos. Ainda se encontram representadas a NPS15 que codifica a RNA helicase e a NSP12 que codifica para a RNA polimerase dependente de RNA.<sup>(12, 33)</sup>

Na extremidade 3' do genoma SARS-CoV-2 encontram-se quatro proteínas estruturais, sendo elas a glicoproteína *Spike* (S), proteína da membrana (M), proteína do envelope (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N).<sup>(12, 33)</sup> As proteínas estruturais mencionadas apresentam um papel relevante no ciclo de vida do vírus nas células do hospedeiro.

Relativamente à proteína S, esta é referida como a proteína responsável pelo reconhecimento dos recetores das células hospedeiras.<sup>(12, 33)</sup> Já a proteína M encontra-se envolvida na formação de viriões.<sup>(12, 33)</sup> A proteína estrutural E é descrita como sendo a responsável pelas fases de montagem e libertação do vírus e, por último mas não menos importante, a proteína N que desempenha uma função relevante no empacotamento do RNA viral no ribonucleocapsídeo.<sup>(12, 33)</sup>

Para além das proteínas estruturais, o SARS-CoV-2 apresenta proteínas acessórias, representadas a cinzento na figura 5.<sup>(33)</sup>

### **3.1.6. Patogenicidade**

O ciclo de vida do novo CoV inicia-se com a ligação da proteína S ao recetor celular da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) da célula hospedeira.<sup>(38, 39)</sup> A proteína S é constituída por duas subunidades (S1 e S2) que, respetivamente, facilitam a entrada (com ligação ao recetor ECA2) e a fusão entre a célula hospedeira e a membrana do vírus.<sup>(38, 39)</sup>

Descobriu-se que um evento de clivagem mediado pela protease serínica TMPRSS2 ocorre na subunidade S2 da proteína S do SARS-CoV-2, o que resulta na fusão da membrana e assim facilita a entrada do vírus na célula hospedeira.<sup>(38, 39)</sup> A furina, outra protease celular, tem sido mencionada como relevante no ciclo de vida deste CoV.<sup>(38, 39)</sup> Foi descrito que os locais de clivagem da furina facilitam uma forte ligação entre o recetor ECA2 da célula hospedeira e a glicoproteína S.<sup>(38, 39)</sup> A clivagem da proteína S ocorre no limite existente entre as subunidades S1 e S2, sucedendo após a ligação da glicoproteína S com o recetor ECA2 e causando alterações conformacionais irreversíveis, que promovem uma maior afinidade entre a glicoproteína e o seu recetor na célula hospedeira, ativando de forma extensiva a S2 para a fusão.<sup>(38, 39)</sup>

Os locais de clivagem da furina (existentes nas duas subunidades da proteína S) bem como as alterações conformacionais que ocorrem no local de ligação da proteína S ao seu recetor na célula hospedeira, são apontadas como uma razão provável que pode promover a rápida replicação, transmissão e infeciosidade.<sup>(38, 39)</sup>

Após a fusão do envelope viral com a membrana da célula, por endocitose, o RNA do SARS-CoV-2 é libertado para o citoplasma da célula hospedeira, onde se inicia a tradução da ORF1a e ORF1b, com a produção de dois polipeptídeos, sendo eles o pp1a e pp1b.<sup>(38, 39)</sup>

Estas poliproteínas sofrem processos de proteólise sintetizando NSP. Quando formadas, as NSP reorganizam-se no interior da membrana do retículo endoplasmático rugoso e formam o seu *replication - transcription complex* (RTC).<sup>(38, 39)</sup>

No decorrer da replicação, o RTC promove a síntese de RNA antisense que serve como modelo para a síntese de genomas de RNA (+).<sup>(38, 39)</sup>

Já no decurso do processo de transcrição, a partir do RNA antisense são gerados vários conjuntos de RNA subgenómicos que poderão traduzir-se em várias proteínas estruturais e acessórias.<sup>(38, 39)</sup>

As glicoproteínas E, M e S são incorporadas na membrana do retículo endoplasmático rugoso ou na membrana do complexo de Golgi.<sup>(38, 39)</sup> O RNA genómico viral combina-se com a proteína do nucleocapsídeo, originando a formação de nucleocapsídeos com subsequente montagem no compartimento intermédio do complexo de Golgi e posterior libertação dos viriões maduros para o citoplasma da célula.<sup>(38, 39)</sup>

Por fim, os viriões maduros são libertados das células infetadas por exocitose, apresentando capacidade de infetar um novo hospedeiro.<sup>(38, 39)</sup>

### **3.1.7. Infeciosidade**

De acordo com a evolução da pandemia atual, a compreensão da dinâmica da carga viral e da duração da infeciosidade do novo CoV apresenta uma importância crítica para o controlo da pandemia que o mundo está a atravessar.<sup>(9)</sup>

Estima-se que o período de incubação do SARS-CoV-2, ou seja, o tempo que decorre desde o momento de exposição ao vírus até ao aparecimento dos primeiros sintomas, é de aproximadamente 5 dias. Contudo, deve-se ter em consideração que o aparecimento de sintomatologia pode ocorrer até ao décimo quarto dia da infeção.<sup>(40)</sup>

As evidências divulgadas até ao momento, a partir de determinações do RNA viral por *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), revelam que o pico da carga viral, de amostras do trato respiratório, pode ser atingido por volta do momento do início dos sintomas ou após cinco dias do início dos mesmos, com um declínio subsequente da carga viral ao longo do tempo.<sup>(9, 40)</sup> Estes fatores indicam que, nos momentos referidos anteriormente, ocorre maior poder de infeciosidade.<sup>(9, 40)</sup>

Um a três dias anteriores ao início do desenvolvimento dos sintomas, pode-se detetar a carga viral do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório superior.<sup>(9, 40)</sup>

Nestas amostras, a detecção da carga viral do SARS-CoV-2 por RT-PCR pode ocorrer por uma média de 17 dias (máximo de 83 dias, valor sustentado pela pesquisa de Muge Cevik *et al.* (2020)).<sup>(6, 41)</sup> Contudo, geralmente o RNA deste vírus deixa de ser detetável cerca de duas semanas após o início dos sintomas.<sup>(6, 41)</sup>

Com base em estudos publicados de rastreamento de contactos, calcula-se que o risco de transmissão aparenta ser mais elevado na primeira semana da doença e no momento em torno do início dos sintomas.<sup>(6, 42)</sup>

Associações entre a carga viral e o tipo de sintomatologia existente, relatam a presença de cargas virais superiores em indivíduos COVID-19 positivos com sintomatologia grave, chegando mesmo o estudo realizado por Liu Y *et al.* (2020) a apontar uma diferença de sessenta vezes superior entre indivíduos COVID-19 positivos com sintomatologia grave e indivíduos COVID-19 positivos com sintomatologia leve.<sup>(9, 43)</sup>

Na literatura, alguns autores debruçaram-se na tentativa de estabelecer relações entre as cargas virais de indivíduos COVID-19 assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos. Dos resultados apresentados não existiram diferenças estatisticamente significativas da carga viral entre os diferentes indivíduos COVID-19.<sup>(43-45)</sup>

No decorrer da pandemia, os indivíduos COVID-19 positivos assintomáticos e pré-sintomáticos têm vindo a merecer a atenção de todo o mundo, sendo apontados como vias de transmissão plausíveis do vírus. Ainda que a infeciosidade seja associada, maioritariamente, a indivíduos COVID-19 sintomáticos, conjectura-se que o período de latência para o SARS-CoV-2 (período desde o início da exposição ao vírus até ao início da infeciosidade) poderá ser menor do que o período de incubação, ocorrendo um período de tempo onde o indivíduo infetado ainda não apresenta sintomatologia, contudo é infecioso.<sup>(46)</sup>

Existem provas que indicam que indivíduos infetados com SARS-CoV-2 são infeciosos de um a três dias prévios ao início dos sintomas.<sup>(9, 45)</sup>

Em dois estudos epidemiológicos realizados, um em Singapura e outro em Guangdong, China, verificou-se que ocorreu uma transmissão pré-sintomática entre 1 a 3 dias anteriores ao início dos sintomas, observando-se que 6,4% e 44%, respetivamente para os países mencionados, dos casos secundários derivaram daquele tipo de transmissão.<sup>(47, 48)</sup>

Numa análise de dados divulgada no trabalho de Miriam *et al.* (2020), estimou-se a ocorrência de uma proporção de cerca de 56% de transmissão pré-sintomática. Com base nas evidências apresentadas a transmissão pré-sintomática é plausível.<sup>(9, 49)</sup>

O impacto da transmissão de indivíduos com infecções assintomáticas SARS-CoV-2 na comunidade ainda é limitado por falta de evidências abrangentes.<sup>(50)</sup> Contudo, a informação existente preconiza que uma em cada cinco pessoas infetadas com SARS-CoV-2 são assintomáticas, representando 40 a 45% dos casos COVID-19, e podem transmitir o vírus mas em número inferior aos indivíduos infetados sintomáticos.<sup>(50)</sup>

Embora ocorra um aumento da procura de informação sobre as infecções assintomáticas, existe uma problemática em estabelecer de forma confiável a taxa de infecções COVID-19 em assintomáticos, uma vez que é difícil realizar o rastreio e identificação destes casos e, por vezes, verifica-se que os casos estudados como assintomáticos são na realidade pré-sintomáticos.<sup>(50)</sup>

Valores revelados no início da pandemia sugeriam taxas de infeção assintomática que poderiam atingir os 81%. Uma meta-análise publicada no mês de outubro de 2020, que calculou a taxa de indivíduos assintomáticos numa amostra de 21708 pessoas, apresentou um valor de 17%.<sup>(51)</sup>

Os cientistas reúnem esforços para perceber com que frequência as pessoas infetadas com COVID-19 mas assintomáticas transmitem o vírus, uma vez que estas infecções são muitas vezes não detetadas e na maioria dos países os testes para a deteção do SARS-CoV-2 são direcionados para indivíduos infetados sintomáticos.<sup>(50,51)</sup>

Apesar de existir um menor risco de transmissão do vírus associado a pessoas infetadas assintomáticas, estas podem representar uma ameaça significativa para a saúde pública da população uma vez que existe uma maior probabilidade de estarem presentes na comunidade do que em isolamento, uma vez que a sua identificação também é mais difícil.<sup>(50)</sup>

Apesar da transmissão assintomática e pré-sintomática revelar um papel de interesse na transmissão do SARS-CoV-2, a maioria das infecções ocorre do contacto com indivíduos sintomáticos.<sup>(9)</sup>

Na literatura referente à infeciosidade do novo CoV, relata-se que dos 7 aos 10 dias após o início dos sintomas ocorre uma redução da infeciosidade e que o vírus não poderá ser cultivado em amostras respiratórias, posteriormente ao início dos sintomas.<sup>(9, 52)</sup> Estes

fatores parecem apoiar as recomendações da OMS que refere a segurança aparente na libertação do isolamento de indivíduos SARS-CoV-2 positivos após 10 dias do início dos sintomas, se o indivíduo não apresentar sintomatologia pelo menos três dias antes do fim do isolamento, em vez da quebra do isolamento apenas após um teste RT-PCR negativo.<sup>(52)</sup> Contrariamente à carga viral que diminui, de forma gradual, após atingir o seu pico, a resposta imune (aparecimento de anticorpos) aumenta de forma gradual, surgindo no sangue por volta dos 7 dias posteriores ao início dos sintomas, com deteção frequente em pacientes no décimo quarto dia, após a identificação da infeção.<sup>(6, 9, 40)</sup>

Mais estudos são necessários para que se consiga compreender melhor a dinâmica da carga viral e a duração da infeciosidade, pois representam peças chave para a saúde pública no controlo da pandemia existente.

### **3.1.8. Transmissão**

Com a aproximação do final de 2020 e um ano após o início do surto COVID-19, verifica-se a existência, em vários países, de mais um aumento do número de novos casos.<sup>(53)</sup> As pesquisas efetuadas sobre SARS-CoV-2 ajudaram a uma melhor compreensão deste vírus e a capacidade mundial em testar e combater o vírus tem vindo a sofrer melhorias.<sup>(53)</sup> Contudo, a forma de transmissão do SARS-CoV-2 continua a ser alvo de estudos e debates.<sup>(53)</sup>

Várias publicações têm demonstrado as possíveis vias de transmissão do novo CoV. Na atualidade é considerado que o mecanismo de transmissão primário do SARS-CoV-2 ocorre por meio de gotículas respiratórias infetadas, através do contacto com a mucosa conjuntival, nasal ou oral.<sup>(6, 54)</sup>

A formação de partículas respiratórias pode ocorrer por intermédio de tosse, espirro ou, simplesmente, por cantar ou falar.<sup>(54)</sup>

No Homem, os recetores alvo estão situados, principalmente, ao nível do trato respiratório.<sup>(6)</sup> Outras áreas do corpo humano, como a gastrointestinal e a conjuntiva, apresentam suscetibilidade à infeção por SARS-CoV-2, tendo também capacidade de atuar como porta de transmissão.<sup>(6)</sup>

Maioritariamente, a disseminação do SARS-CoV-2 desencadeia-se por intermédio do contacto próximo, a uma distância inferior a dois metros, com indivíduos infetados com

sintomas (como tosse e febre) ou falando, sendo a transmissão no seio familiar e nas reuniões em núcleos de amigos especialmente eficiente.<sup>(6)</sup>

Dados experimentais levam a concluir que a transmissão do SARS-CoV-2 possa também ocorrer através da inalação de aerossóis, que abrigam vírus infecciosos.<sup>(53-55)</sup> Os aerossóis podem ser formados por procedimentos geradores dos mesmos (por exemplo intubação), contudo estes também podem ser formados através da fala e da tosse, com capacidade de percorrer distâncias superiores a dois metros, o que está em conflito com a distância decretada para o distanciamento social.<sup>(55)</sup>

Van Doremalen *et al.* (2020) demonstrou que o SARS-CoV-2 possui a capacidade de permanecer viável e infeccioso no interior de aerossóis por cerca de três horas.<sup>(56)</sup> Este facto, juntamente com a capacidade dos aerossóis infetados poderem percorrer distâncias superiores a dois metros, suscita preocupação e torna esta via de transmissão plausível mesmo com o cumprimento do distanciamento social.<sup>(53, 55)</sup>

Alguns estudos efetuados em unidades de saúde onde doentes COVID-19 sintomáticos foram tratados e não existiam procedimentos de produção de aerossóis, relataram a presença do SARS-CoV-2 em amostras de ar<sup>(57, 58)</sup>, contrastando com outras investigações em ambientes prestadores de cuidados de saúde e estabelecimentos não relacionados com a saúde onde a presença do vírus foi inexistente.<sup>(59, 60)</sup> Nas amostras onde foi detetado o vírus, a quantidade de RNA era muito baixa, sendo relatada a incapacidade de detetar vírus viáveis.<sup>(57, 58)</sup>

A 5 de outubro de 2020, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças indicou que evidências publicadas apoiam a transmissão de COVID-19 através da exposição ao vírus suspenso no ar sob certas condições.<sup>(53)</sup> A propagação do vírus por aerossóis está maioritariamente associada a ambientes internos fechados, lotados e com uma ventilação deficitária, normalmente com exposição por mais de trinta minutos com um indivíduo infetado.<sup>(53)</sup>

No presente, a investigação da transmissão por aerossóis é um tema em estudo, contudo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças é claro e afirma que esta via de propagação viral não é o principal modo de transmissão do SARS-CoV-2.<sup>(53)</sup>

Para além da via de aerossolização, a transmissão do novo CoV através de fomites está, também, a ser lançada como uma hipótese admissível.<sup>(6, 54)</sup> As gotículas e secreções respiratórias emitidas por um indivíduo infetado com o SARS-CoV-2 podem gerar

contaminação de objetos e superfícies, originando as fomites.<sup>(6, 54)</sup> O vírus que instigou a pandemia existente pode permanecer viável por vários dias em superfícies lisas.<sup>(6)</sup>

Assim, a propagação da infeção COVID-19 pode desencadear-se pelo contacto com fomites, onde o vírus esteja presente, seguido do toque na boca, olhos ou nariz, por intermédio de mãos contaminadas, sendo uma fonte de contaminação a considerar.<sup>(6, 54)</sup>

Moriarty *et al.* (2020) detetaram, no estudo que realizaram em navios de cruzeiro, múltiplas superfícies de cabines com RNA viral, tanto de indivíduos sintomáticos como assintomáticos.<sup>(61)</sup> Outro estudo, realizado por Santarpia *et al.* (2020), evidencia a libertação ambiental do SARS-CoV-2 com base no estudo das superfícies dos quartos de 13 indivíduos infetados com este vírus quando se encontravam em quarentena.<sup>(62)</sup> O investigador verificou que 80,4% de todas as superfícies existentes nos quartos estavam contaminadas com o vírus.<sup>(62)</sup> Deste modo, os resultados dos estudos apoiam que uma contaminação indireta por fomites pode ser uma provável via de transmissão.

Todavia, e até à data, ainda não se isolou nenhum vírus viável em amostras de fomites, não havendo para já informação significativa sobre o seu poder na transmissibilidade do SARS-CoV-2.<sup>(6, 54)</sup> A associação entre a propagação do vírus por superfícies contaminadas é difícil de estabelecer, pelo facto dos indivíduos que entraram em contacto com fomites com alguma frequência também revelaram o contacto com pessoas infetadas com COVID-19, tornando difícil a diferenciação entre transmissão por fomites ou gotículas respiratórias.<sup>(6, 54)</sup>

O papel da via fecal-oral na disseminação da COVID-19 tem vindo a ser alvo de algumas investigações. Na fase inicial do surto, a transmissibilidade do vírus por esta via foi fundamentada com a elevada concentração do recetor ECA2 no trato gastrointestinal.<sup>(63)</sup>

Ademais, investigações noticiaram a associação entre a eliminação prolongada do vírus na matéria fecal e o potencial de transmissão fecal-oral.<sup>(63, 64)</sup> Jiang X *et al.* (2020) publicou a ocorrência da deteção do RNA de SARS-CoV-2 até 42 dias em amostras de fezes de um paciente COVID-19 assintomático, ao mesmo tempo que ao nível de amostras da nasofaringe testadas obteve-se uma inexistência da deteção deste vírus.<sup>(64)</sup>

Em outros estudos, como um liderado pelo investigador Zhang *et al.* (2020) que comparou a deteção de SARS-CoV-2 em amostras fecais e nasofaríngeas de doentes COVID-19 pediátricos após estarem curados, ou seja, após apresentarem um teste RT-PCR nasofaríngeo negativo, relatou que o vírus foi detetado em amostras fecais após 10 dias das



crianças avaliadas estarem recuperadas.<sup>(65)</sup> Em estudos que abordaram a mesma situação anterior referida mas em adultos, verificou-se que, nalguns casos, a detecção do vírus pode ir até aos 33 dias. No período da execução dos estudos, os indivíduos participantes não apresentaram testes RT-PCR nasofaríngeos positivos, nem sintomatologia.<sup>(54)</sup>

Não obstante a detecção frequente de RNA do novo CoV nas fezes, o isolamento do vírus raramente obteve sucesso.<sup>(6, 54)</sup>

Para além das vias de propagação anteriormente referidas, a transmissão vertical do SARS-CoV-2 tem sido alvo de interesse, todavia ainda carece de evidências conclusivas.<sup>(54)</sup> No geral, os bebés nascidos de mães COVID-19 positivas apresentam, no nascimento, 6,3% de resultados positivos ao teste COVID-19.<sup>(54)</sup>

Alguns estudos demonstram a evidência da transmissão vertical, fundamentada na hipótese de alguns recém-nascidos de mães infetadas apresentarem valores elevados de anticorpos imunoglobulina M (IgM), após o nascimento.<sup>(66, 67)</sup> Num estudo efetuado por Parazzini *et al.* (2020), onde foram avaliadas 37 grávidas infetadas, apenas três neonatos apresentavam anticorpos IgM, contudo o teste RT-PCR deu negativo.<sup>(66)</sup> Na China, um recém-nascido apresentou teste positivo após 36 horas do parto, associando-se este fenómeno à via de transmissão vertical.<sup>(67)</sup>

A OMS publicou um estudo sobre a transmissibilidade do vírus através do leite materno. Investigadores inseridos nesta pesquisa detetaram RNA viral SARS-CoV-2 no leite de mães infetadas.<sup>(68)</sup> No entanto, não foi encontrado nenhum vírus viável no leite materno, não existindo provas de transmissão de mãe para filho pelo leite materno, encorajando mesmo as mães a amamentar os seus filhos.<sup>(68)</sup>

O vírus SARS-CoV-2 foi também detetado no sangue, urina, saliva e secreções conjuntivais, contudo o seu papel na transmissão deste vírus permanece incerto, não existindo evidências concretas do seu poder de transmissibilidade.<sup>(54, 63)</sup>

No decorrer do ano de 2020, questionou-se a transmissão entre os animais e o Homem. É preconizado que os humanos infetados com o novo CoV podem infetar animais domésticos. Já o inverso ainda não está comprovado, não sendo os animais domésticos um motivo de preocupação para a disseminação da COVID-19.<sup>(69)</sup>

A evolução da pandemia COVID-19 revela a necessidade da existência de um maior controlo da infeção, tendo a identificação das fontes virais um papel relevante no combate ao vírus.<sup>(6, 54)</sup> O RNA do SARS-CoV-2 tem sido detetado em várias regiões do corpo

humano, potenciando o aumento da propagação devido à sua fácil transmissão. Contudo, é de referir que na literatura consultada, até ao momento, a via de propagação mais plausível deste vírus é por intermédio de gotículas respiratórias infetadas.<sup>(6, 54)</sup>

### **3.1.9. Sintomas**

As manifestações clínicas da COVID-19 apresentam uma vasta gama de sintomas. Estima-se que a sintomatologia surja, em média, após 5 dias de incubação.<sup>(32)</sup> Contudo, é de ressalvar que as manifestações clínicas podem variar entre o segundo e o décimo quarto dia de infeção.<sup>(32)</sup>

É também relevante notar que algumas infeções são assintomáticas, sendo descrito por algumas investigações que este tipo de infeção pode provavelmente representar 40 a 45% das pessoas infetadas com SARS-CoV-2, podendo ser um ponto crítico para a propagação do vírus.<sup>(70)</sup>

Os sintomas mais comuns da COVID-19 caracterizam-se por sintomas respiratórios, constitucionais e, com menor frequência, sintomas gastrointestinais.<sup>(70)</sup>

As manifestações clínicas mais correntes são a febre (80-98% dos casos), tosse, normalmente seca, (68-82% dos casos), fadiga (40 a 60% dos casos), perda de olfato ou paladar (representam cerca de 55% dos casos) e dispneia (19 a 31% dos casos).<sup>(32, 38)</sup> Os sintomas menos comumente relatados englobam mialgias (cerca de 15%), cefaleias (8 a 14%), odinofagia (5 a 14% dos casos), rinorreia (5% dos casos), náuseas e vômitos (1 a 10% dos casos) e dor torácica (2%).<sup>(32, 71)</sup>

### **3.1.10. Suscetibilidade à infeção pelo SARS-CoV-2**

O Homem apresenta fatores de risco para a COVID-19 que o podem tornar mais suscetível à infeção por SARS-CoV-2, como a idade, o sexo e patologias crónicas que possam exibir.<sup>(72)</sup>

No que se refere à idade é referenciado, na literatura, em particular para a população com idades entre os 35 e os 65 anos, o maior número cumulativo de casos COVID-19 positivos, pois este grupo representa a idade produtiva, ocupando em maio 50% dos casos COVID-19 confirmados, realçando que o novo CoV não afeta apenas idosos.<sup>(72)</sup>

Contudo, os indivíduos com idades superiores a 65 anos são os que apresentam maior suscetibilidade à infeção pelo SARS-CoV-2, quando comparados com jovens e adultos

(com idades inferiores a 65 anos).<sup>(72, 73)</sup> A maior suscetibilidade está relacionada, principalmente, com a existência de uma maior prevalência de doenças crónicas e uma maior fragilidade, culminando numa imunidade mais reduzida.<sup>(72)</sup>

Dos casos COVID-19 notificados, a população com idades inferiores a 20 anos representavam em setembro 1 a 3% dos casos, revelando menor suscetibilidade para a infeção causada pelo SARS-CoV-2.<sup>(73)</sup>

Além da idade, o facto de um indivíduo ser do sexo feminino ou do sexo masculino parece ter influência na suscetibilidade à COVID-19.<sup>(74)</sup> Em várias partes do globo, dados epidemiológicos publicados relataram uma maior morbidade no sexo masculino, comparativamente com o sexo feminino.<sup>(74)</sup> Esta associação tem por base as diferenças entre o sistema imunológico, no combate à infeção (com os homens a terem maior expressão ECA2) e também devido ao estilo de vida.<sup>(74)</sup>

Não só a maior suscetibilidade de contrair a infeção por SARS-CoV-2 está associada às idades mais avançadas e, ao que parece, ao sexo masculino mas também é constatado que indivíduos com doenças crónicas subjacentes apresentam maior risco para contrair o vírus referido.<sup>(73)</sup> As comorbilidades mais associadas à COVID-19 são a diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares crónicas, sendo descrito que tal facto pode estar relacionado com respostas imunes mais fracas ou reduzidas.<sup>(73)</sup>

### **3.1.11. Doença COVID-19**

De acordo com a gravidade da doença COVID-19, esta pode variar de ligeira, moderada, grave e crítica, culminando por vezes na morte.<sup>(71, 75)</sup>

A doença COVID-19 ligeira consiste na existência de sintomatologia das vias aéreas superiores e constitucionais, com evidência de pneumonia viral e hipoxia. A maioria das doenças COVID-19 é ligeira.<sup>(71, 75)</sup> Cerca de 75 a 90% dos doentes com este grau de severidade de doença recuperam sem necessidade de tratamento hospitalar. Os sintomas associados à doença ligeira são muitas vezes confundidos com uma vulgar constipação.<sup>(71, 75)</sup>

No que diz respeito à doença moderada, esta envolve sinais clínicos de pneumonia (febre, dispneia, respiração rápida), com uma saturação de oxigénio no sangue superior a 94%.<sup>(71, 75)</sup>

O grau de severidade grave corresponde a indivíduos infetados com SARS-CoV-2 que apresentam sintomas clínicos de pneumonia (febre, respiração rápida, dispneia ou tosse), com uma saturação de oxigénio no sangue inferior a 94%, uma frequência respiratória superior a 30 respirações por minuto, um rácio entre a pressão parcial de oxigénio arterial e a fração de oxigénio inspirado inferior a 300 milímetros de mercúrio ou infiltrados pulmonares superiores a 50% no período de 24 a 48 horas.<sup>(71, 75)</sup>

Cerca de 20% dos indivíduos infetados com SARS-CoV-2 desenvolvem doença moderada a grave.<sup>(71, 75)</sup>

A doença COVID-19 classificada como crítica é descrita como a existência de pneumonia extensa, disfunção multiorgânica e/ou choque séptico e falência respiratória onde existe necessidade de internamento nos cuidados intensivos.<sup>(71, 75)</sup> Cerca de 5% dos doentes infetados apresentam doença com o grau de gravidade crítico. Em doentes que desenvolveram doença crítica a taxa de mortalidade ronda os 50%.<sup>(71, 75)</sup>

No decorrer da pandemia tem vindo a aumentar o número de relatos de indivíduos que após recuperação da infeção COVID-19 revelam sequelas da doença. Entre as sequelas relatadas encontram-se a perda de mobilidade, perda de olfato e paladar, mialgia e dores de cabeça.<sup>(75)</sup> Todavia, é fundamental a continuação de pesquisas que melhor compreendam a fisiopatologia e a evolução clínica das sequelas da infeção, bem como para identificar estratégias eficazes no tratamento para pacientes COVID-19.<sup>(75)</sup>

### **3.1.12. Detecção do SARS-CoV-2**

Na pandemia atual, em que o mundo se encontra já há um ano, os testes de diagnóstico para a deteção do SARS-CoV-2 representam um ponto fulcral no que diz respeito ao controlo de surtos.<sup>(76)</sup> No decorrer da pandemia produziu-se de forma veloz vários testes para a deteção do novo CoV.<sup>(76)</sup>

O teste padrão para o diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2 é o RT-PCR devido à sua precisão e sensibilidade na deteção do RNA viral.<sup>(76)</sup> Este teste consiste previamente numa transcrição reversa, na qual ocorre a conversão do RNA viral em ácido desoxirribonucleico complementar, seguida da amplificação em tempo real por reação em cadeia da polimerase do ácido nucleico.<sup>(76, 77)</sup> A deteção do novo CoV por este método pode incluir os genes alvo S, E, N e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e demorar até 4 horas.<sup>(77)</sup>

Além dos testes RT-PCR, foram desenvolvidos testes rápidos de detecção de antígeno para o SARS-CoV-2, apresentando a vantagem de poder obter-se um resultado em 15 minutos. Contudo, quando comparados com a técnica padrão para a detecção do SARS-CoV-2, os testes de detecção de antígenos revelam pouca sensibilidade, com maior risco de ocorrência de falsos negativos.<sup>(76, 77)</sup>

Outros dos testes desenvolvidos para a COVID-19 são os designados testes serológicos, cuja finalidade é a detecção de anticorpos para o novo CoV.<sup>(76, 77)</sup> Este tipo de testes deverá ser aplicado com precaução, uma vez que ainda é tema em investigação e não existem evidências significativas da imunidade contra o SARS-CoV-2, da sua duração, a produção de anticorpos e o perfil de seroconversão após exposição ao vírus.<sup>(76, 77)</sup>

Para uma eficaz monitorização da progressão ou regressão da pandemia COVID-19 e para a aplicação de estratégias de restrição ou diminuição das mesmas, a disponibilidade de testes em grande escala torna-se essencial.<sup>(76)</sup>

Durante o período de fevereiro a abril de 2020, por todo o mundo as linhas de abastecimentos de testes de diagnóstico foram afetadas, tendo implicações na testagem à COVID-19.<sup>(76)</sup> Na Europa, a capacidade de testagem aumentou ao longo da pandemia.<sup>(76)</sup>

Em Portugal, desde 1 de março a meados de outubro, foram realizados mais de 3 milhões de testes de diagnóstico à COVID-19, sendo anunciado pelo Secretário da Saúde Diogo Lopes que, na semana de 11 a 16 de outubro, o país ultrapassou os 30 mil testes diários, tendo este valor triplicado em comparação com o mês de março.<sup>(78, 79)</sup>

Até ao momento, o diagnóstico de novos casos COVID-19 é realizado pelo método RT-PCR.<sup>(77)</sup>

### 3.1.13. Prevenção da propagação da COVID-19

Em março de 2020, com a elevação do surto COVID-19 a pandemia pela OMS, a mesma instituição enfatizou a gravidade da situação existente e aconselhou todos os países a agirem de forma rápida e eficaz tanto na detecção da infecção, como também na prevenção da propagação do SARS-CoV-2 que causa a doença COVID-19.<sup>(33)</sup>

As medidas preventivas são a estratégia atual para combater a propagação do novo CoV.<sup>(33)</sup> Elementos como o rastreio, diagnóstico, tratamento e isolamento são fulcrais para a prevenção de uma elevada transmissão.<sup>(33)</sup> O foco das estratégias preventivas encontra-se no isolamento de indivíduos COVID-19 positivos e no controlo da infecção.<sup>(33)</sup> É importante ressaltar que, à medida que as vacinas em preparação vão sendo aprovadas, a estratégia de combate à transmissão do SARS-CoV-2 ganha um aliado de peso.

A OMS, como outras organizações de saúde semelhantes, divulgou medidas de relevância na prevenção e controlo da COVID-19 a serem aplicadas pela comunidade. Uma dessas medidas a ser adotada pela população passa pela lavagem com frequência das mãos com água e sabão ou a utilização de soluções à base de álcool, sendo esta medida uma estratégia relevante a adotar pela comunidade no combate à propagação do vírus.<sup>(8, 33)</sup>

Com vista à redução do risco de transmissão na comunidade, os indivíduos são aconselhados a praticar a higiene respiratória, ou seja, quando um indivíduo espirra ou tosse, deverá tapar a boca ou o nariz com um lenço ou a parte interna do cotovelo.<sup>(8, 80)</sup>

Outra medida preventiva é o distanciamento social, prática também aconselhada pela OMS, principalmente em locais com risco de transmissão comunitária, onde os indivíduos são solicitados a manter uma distância de 2 metros, uns dos outros.<sup>(8, 80)</sup> Esta medida potencia a redução de interações entre pessoas na comunidade, onde possam existir infetados não identificados.<sup>(8, 80)</sup>

Como o mecanismo primário de transmissão do SARS-CoV-2 é por gotículas respiratórias, o que requer uma certa proximidade entre pessoas, a prática de distanciamento social contribuirá para uma menor transmissão tendo, portanto, uma importância crítica no controlo da pandemia que vivemos.<sup>(8, 80)</sup>

A nível mundial vários países introduziram, como estratégia para combater a propagação do SARS-CoV-2, o distanciamento social/físico e a quarentena.<sup>(8)</sup> Estas estratégias incluíram, entre outras, a limitação do número de visitantes e contacto entre residentes em ambientes confinados, como lares e prisões; fecho de fronteiras internas e externas; fecho

parcial ou total de instituições de educação, locais de trabalho e o fecho ou restrição de acesso a estabelecimentos públicos (shoppings, hotéis, entre outros), confinamento obrigatório e o cancelamento, restrição e proibição de reuniões que movessem multidões.<sup>(8)</sup>

Em países como o Japão e a China que rapidamente aplicaram medidas preventivas, o controlo da pandemia foi mais significativo.<sup>(8, 80)</sup> Nos países onde tais medidas não foram aplicadas de forma lesta e/ou obrigatória, como por exemplo os Estados Unidos da América, continua a existir um número expressivo de novos casos COVID-19.<sup>(8, 22)</sup>

O uso de máscara é recomendado, em particular ao frequentar espaços fechados e movimentados.<sup>(8)</sup> Em vários países, o uso de máscara foi decretado como obrigatório em espaços fechados e nas ruas onde exista um movimento elevado de pessoas, com a finalidade de conter as secreções respiratórias que podem estar infetadas com o novo CoV, evitando a transmissão do mesmo entre indivíduos.<sup>(8)</sup>

A limpeza de superfícies de alto contacto, com água quente ou desinfetantes, também é aconselhada, como forma de evitar a propagação do vírus, uma vez que na literatura é referenciado a possível transmissão do SARS-CoV-2 por fomites.<sup>(6, 8, 80)</sup>

No decorrer da pandemia que estamos a vivenciar, a quarentena é outra das medidas aplicadas no seu combate, uma vez que é considerada uma das ferramentas mais antigas e eficazes no controlo de surtos de doenças transmissíveis e o método mais eficiente na redução do número de infetados e mortos.<sup>(8, 81, 82)</sup> A monitorização ativa de pessoas que estejam em quarentena é um ponto crucial para o controlo da pandemia.<sup>(8)</sup>

Outro ponto, também importante, na prevenção da propagação da COVID-19 na comunidade, é o aumento da capacidade de testar, com a finalidade de detetar mais casos, isolá-los e realizar um rastreio de indivíduos que tiveram contacto com casos COVID-19 positivos.<sup>(8)</sup>

É essencial que por todo o mundo sejam aplicadas e executadas medidas de prevenção delegadas pelas organizações de saúde, a fim de assegurar a saúde e o bem estar de toda a comunidade, como também evitar a propagação do SARS-CoV-2, até que surja um medicamento específico e/ou vacinas comecem a ser administradas em massa a toda a população para o combate da infeção desencadeada pelo novo CoV.<sup>(8)</sup>

### **3.1.14. Impacto da COVID-19 no mundo**

A globalização facilitou a interconexão mundial, promovendo e garantindo o crescimento económico e cultural do Homem.<sup>(2)</sup> O comércio, viagens, economia e a migração são componentes da globalização que contribuem e amplificam consideravelmente a propagação de doenças infecciosas, com significativas consequências socioeconómicas e de saúde pública.<sup>(2)</sup>

Historicamente, no que se refere à civilização humana, tem sido documentada a existência de pandemias com forte impacto na sociedade mundial.<sup>(4)</sup>

A pandemia que assola na atualidade o mundo é apontada como uma catástrofe mundial, consistindo no maior desafio que a humanidade já combateu desde a segunda guerra mundial, disseminando-se velozmente por todo o globo e com graves consequências para a saúde, ambiente, sociedade e economia mundiais.<sup>(4)</sup>

O colapso económico e social provocado pela economia atual está a verificar-se arrasador, estimando-se que entre 88 a 115 milhões de pessoas estão sob risco de mergulhar numa pobreza extrema, prevendo-se atingir um valor de 150 milhões durante o ano de 2020.<sup>(83)</sup>

Atualmente, estima-se que o número de pessoas subnutridas ronda os 60 milhões e que, no final do ano 2020, possa atingir até 132 milhões de pessoas.<sup>(83)</sup>

Globalmente, o mundo laboral enfrenta uma ameaça existencial, sendo obrigado a adaptar-se ao momento em que vivemos.<sup>(2)</sup> Com a pandemia muitas empresas viram o seu modo de trabalho alterar-se, tendo muitas delas estado fechadas no período da primeira vaga e muitas ainda permanecem fechadas ou com horas de funcionamento modificadas, nalguns casos recorreu-se à aplicação do teletrabalho.<sup>(2)</sup>

No decorrer da pandemia COVID-19, os setores laborais mais fustigados são os serviços da alimentação, indústria e os serviços de alojamento.<sup>(2)</sup> Os setores referidos representam cerca de 54% dos empregos em todo o mundo.<sup>(2)</sup> Estima-se uma diminuição de 10,5% do tempo de trabalho, contrastando com o trimestre prévio ao início da pandemia, afetando a produção e economia das empresas.<sup>(2)</sup>

É estimado que 3,3 biliões de pessoas estejam em risco de perder os seus empregos.<sup>(83)</sup> Com tantos milhões de meios de subsistência em risco, o acesso à alimentação é mais limitado e a falta de dinheiro poderá significar a inexistência de comida, ou menos comida e menos nutritiva.<sup>(83)</sup>



Por todo o mundo, os programas desportivos, culturais e eventos, como conferências, foram cancelados e remarcados para o ano de 2021.<sup>(2)</sup> Um desses exemplos são os jogos olímpicos de Tóquio que iriam realizar-se em 2020.<sup>(2)</sup> Os eventos que foram levados a cabo no decorrer da pandemia, realizaram-se sob restrição do número de pessoas e com normas de segurança decretadas pelas organizações de saúde.<sup>(2)</sup> O cancelamento dos eventos referidos provocou perdas massivas nos países onde os mesmos iriam ocorrer.<sup>(2)</sup>

Devido à COVID-19, restrições de viagens, mobilidade, a implantação do confinamento e o bloqueio da economia e comércio desencadearam um decréscimo na produção, emprego e consumo, com forte impacto na economia mundial.<sup>(2)</sup> Em consequência da pandemia, a economia mundial pode entrar numa grave recessão, mais severa do que a atingida no ano de 2008.<sup>(2)</sup>

A saúde mundial é outro ponto fortemente atingido pelo SARS-CoV-2, causador de fortes preocupações, uma vez que a doença desenvolvida por este CoV é uma das principais causas de morte e hospitalização, neste momento, em países atingidos pelo vírus.<sup>(4)</sup>

A perda de vidas devido à COVID-19 tem vindo a aumentar de forma catastrófica com valores superiores a um milhão a 13 de novembro.<sup>(7)</sup> Para os sistemas de saúde, o combate à pandemia está a ser um desafio sem precedentes, com a demonstração da fragilidade do setor, com profissionais de saúde em número não suficiente, com um ponto de exaustão extrema, o número reduzido de ventiladores e camas nos cuidados intensivos, estando algumas unidades de saúde a entrar em colapso.<sup>(30, 84)</sup>

Durante a pandemia foi também relatada a escassez de equipamentos de proteção nas unidades prestadoras de cuidados de saúde, realçando a vulnerabilidade na prestação destes cuidados ao doente.<sup>(84)</sup>

Não só a saúde e o trabalho foram atingidos pela pandemia COVID-19, o sistema educacional também foi afetado, desde a pré-escola ao ensino superior.<sup>(84)</sup> A maioria das instituições de educação aplicaram o fecho total, em março, tendo o Reino Unido aberto exceção para filhos de trabalhadores relevantes. As aulas passaram a ser lecionadas à distância, por via *online*, cancelando as aulas presenciais.<sup>(2, 84)</sup>

Com a abertura do ano letivo 2020/2021, as aulas voltaram a ser presenciais sob medidas de prevenção para evitar a disseminação do vírus, como o uso de máscara e horários distintos entre as diferentes turmas das escolas, para evitar um elevado número de pessoas

no mesmo espaço, para além de intervalos no interior das salas de aula, entre outras medidas.<sup>(84)</sup>

Apesar do encerramento das escolas e das aulas não presenciais, com a finalidade de prevenir a propagação do vírus, estas medidas causaram interferências socioeconómicas.<sup>(2, 84)</sup>

<sup>84)</sup> Com as escolas fechadas o apoio social, com o fornecimento de comida gratuita a crianças de famílias com menores rendimentos, foi interrompido. Com o recurso às aulas *online*, constatou-se que quase 10% das instituições escolares não tinham infraestruturas e instalações adequadas para lecionar a matéria nestes moldes.<sup>(2, 84)</sup> As aulas não presenciais realçaram as disparidades na sociedade, onde famílias com baixos rendimentos muitas vezes não possuíam as ferramentas eletrónicas para conseguir ter acesso às mesmas, nem meios financeiros para as obter.<sup>(2, 84)</sup>

Embora a pandemia atual tenha impacto negativo no mundo, nem tudo é negro.<sup>(4)</sup> O ambiente, por exemplo, tem sofrido manipulações pelo ser humano para seu próprio benefício.<sup>(4)</sup> Contudo, por consequência do surto COVID-19, as medidas restritivas aplicadas em diversos países, como a regulação do movimento de indivíduos na rua, o cancelamento de eventos que envolvem aglomerados de pessoas, restrições em viagens, empresas com restrições no horário de trabalho ou teletrabalho têm tido impacto favorável no meio ambiente.<sup>(4)</sup> Ocorreu uma diminuição da emissão de gases com efeito de estufa, uma vez que a indústria esteve parada ou encontra-se a trabalhar com restrições.<sup>(4)</sup> O teletrabalho também diminuiu o número de veículos a circular na via pública. Em grandes cidades, os habitantes conseguiram ver o azul do céu pela primeira vez em muitos anos.<sup>(4)</sup> A queda do turismo também contribuiu para uma menor poluição em praias, florestas, áreas montanhosas, entre outros locais.<sup>(4)</sup>

Embora as nações tenham vindo a melhorar a sua capacidade de resposta a uma calamidade de saúde pública, as instalações de saúde têm visto à prova a sua capacidade de atuação em casos de emergência.<sup>(2, 4)</sup> Mesmo países considerados desenvolvidos estão a ter dificuldades no controlo da pandemia existente, realçando ainda a inadequação de sistemas de vigilância de controlo de pandemias, com fortes lacunas no seu processo de controlo.<sup>(2, 4)</sup>

No momento atual, é crucial o controlo da doença, quebrar a transmissão viral por todos os meios possíveis, incluindo a vacinação em massa e descobrir o tratamento para a COVID-19.<sup>(2, 4)</sup>

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. População em estudo**

A população em estudo correspondeu a 1222 indivíduos, aos quais foram realizadas colheitas de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo para a pesquisa de SARS-CoV-2, no período de 17 de março a 24 de junho de 2020. As amostras dos exsudados referidos foram colhidas nos postos da Avenida Sá da Bandeira, Bairro Norton de Matos e Santa Clara (Coimbra, Portugal), que o Laboratório José Manuel Chau S.A. possui e estabeleceu para a colheita dos exsudados, com a finalidade de realizar a pesquisa de SARS-CoV-2.

### **3.2.2. Colheita de exsudado nasofaríngeo e orofaríngeo**

O exsudado da nasofaringe e o exsudado da orofaringe foram obtidos com o *kit Sample Collection* da Beaver Biomedical Engineering Co, Ltd. (Suzhou, China). Os dois produtos biológicos foram colhidos com duas zaragatoas distintas, sendo posteriormente colocadas no mesmo tubo que possui meio de preservação. Para a colheita do exsudado nasofaríngeo deverá inserir-se a zaragatoa numa das narinas de forma paralela ao palato até atingir uma ligeira resistência. Quando encontrada a resistência deve-se deixar, por alguns segundos, a zaragatoa no local para ocorrer absorção de secreções. Passado esse tempo, procede-se à sua remoção, de forma lenta, com movimentos de rotação. O procedimento descrito deve repetir-se na outra narina.<sup>(85)</sup>

Relativamente ao exsudado orofaríngeo, o procedimento de colheita consiste na inserção de uma zaragatoa até à faringe posterior, realizando esfregaço na parede faríngea e nos pilares da orofaringe. Durante a colheita deve evitar-se tocar com a zaragatoa na língua.<sup>(85)</sup>

Após a colheita, as amostras são transportadas para o setor de biologia molecular do Laboratório Labeto, Centro de Análises Bioquímicas, S.A., membro do Grupo Beatriz Godinho S.A.. Todo o modo de acondicionamento e transporte das amostras desde o local da colheita até ao local do seu processamento seguiram as recomendações da Direção-Geral da Saúde.

### 3.2.3. Recolha de dados

A cada indivíduo, aquando da colheita, foi realizado um pequeno questionário onde, para além dos dados pessoais, idade e sexo também foram realizadas as seguintes questões: a realização de viagens ao estrangeiro, a existência de contacto com casos COVID-19 confirmados, se o indivíduo apresentava sintomatologia (tosse, dificuldade em respirar, febre, perda de olfato/paladar ou outros sintomas), motivo da realização do teste e patologias.

A recolha de informação anteriormente descrita, como também o resultado do teste RT-PCR para a pesquisa de SARS-CoV-2, decorreu durante o mesmo período da realização da colheita dos exsudados nasofaríngeos e orofaríngeos.

### 3.2.4. Extração do ácido ribonucleico do vírus SARS-CoV-2

O processo de extração de RNA do SARS-CoV-2 é automatizado e realizado com o kit Lab-Aid vírus RNA Extration da Zeesan Biotech Co. Ltd (Fujian, China).

Este kit possui o *reagent cartridge* constituído por 10 tubos que contêm todos os reagentes necessários à extração do material genético do vírus (tampão de lise, buffer de ligação, partículas magnéticas, reagente de lavagem 1 e 2 e o buffer de eluição).

Previamente à extração, o tubo que contém a amostra a ser processada foi homogeneizado durante 30 segundos no vortex e posteriormente foram transferidos 100 µL da amostra para o primeiro tubo do *reagent cartridge* ao qual se adicionou 10 µL de Poli-A. De seguida coloca-se o *reagent cartridge* no extrator automático, o qual procede à extração do material genético viral, obtendo-se no final do processo o RNA purificado.

Todo o procedimento de extração foi realizado de acordo com as indicações do fabricante.

### 3.2.5. Pesquisa do SARS-CoV-2: *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

A pesquisa do novo CoV é efetuada com o kit Eurobio Plex SARS-CoV-2 multiplex (EBX-041) da Eurobio Scientific (Avenida Scandinavie, Les Ulis, França).

O teste EBX-041 amplifica em tempo real os genes alvo RdRp1, RdRp2 e N, sendo a presença de qualquer um dos genes RdRp sinal de deteção do SARS-CoV-2.

Para a deteção do vírus, cada amostra foi preparada para um volume total de 25 µL, possuindo na sua composição 20 µL de *mastermix* [constituída pela enzima *taq* polimerase,

enzima transcriptase reversa, oligomix e controlo de extração e controlo de inibição da RT-PCR (CI-ARN)] e 5 µL do RNA extraído.

O vírus é detetado pela utilização de oligomix com sondas específicas para cada alvo a amplificar, marcadas com os seguintes fluoró cromos: FAM (gene alvo RdRp1), HEX (gene alvo RdRp2), Texas Red (gene N) e Cy5 (CI-ARN).

A amplificação é executada no termociclador CFX96 Deep Well Real Time System da Bio-Rad (Califórnia, Estados Unidos da América) e sob as seguintes condições: 1 ciclo de transcrição reversa (45 °C durante 10 minutos), seguida de 1 ciclo de desnaturação (95°C por 3 minutos). De seguida ocorrem 40 ciclos de amplificação que consistem na fase de desnaturação (95 °C durante 15 segundos) e *annealing*/extensão (58 °C por 30 segundos).

### **3.2.6. Teste confirmatório para resultados SARS-CoV-2 positivos**

Dos resultados positivos obtidos a partir do teste EBX-041, efetua-se um teste confirmatório com o Kit GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp fabricado por OSANG Healthcare Co., Ltd (Gyeonggi, Coreia).

Os alvos que este teste deteta são os genes RdRp, N, E e o controlo da amplificação (CI). Para a amplificação foi preparada uma amostra com um volume total de 20 µL, constituída por 5 µL do RNA extraído e 15 µL da mistura principal que foi elaborada juntando 10 µL da mistura de reação COVID-19 Plus [possuindo cloridrato de tris (hidroximetil)aminometano, cloreto de magnésio e desoxirribonucleotídeos trifosfatados] mais 5 µL da mistura das sondas COVID-19 Plus.

Este kit possui um controlo positivo e negativo. As sondas encontram-se marcadas com fluorescência: FAM (gene RdRp), JOE (ABI) / VIC (CFX96) (gene N), Texas Red (gene E) e Cy5 (CI).

O processo de amplificação foi realizado no termociclador CFX96 Deep Well Real Time System da Bio-Rad (Califórnia, Estados Unidos da América) e perante as seguintes condições: 1 ciclo de transcriptase reversa (50 °C durante 20 minutos), seguida de 1 ciclo de desnaturação (95 °C por 5 minutos). Posteriormente à etapa de desnaturação, ocorrem 45 ciclos de amplificação que consistem na fase de desnaturação (95 °C durante 15 segundos) e *annealing*/extensão (58 °C durante 60 segundos).

### **3.2.7. Análise estatística**

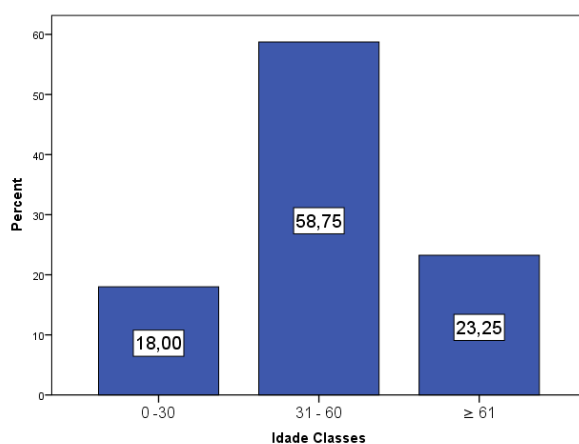
A análise estatística foi realizada com a utilização do programa SPSS<sup>®</sup> *Statistics* versão 22 da IBM<sup>®</sup>. O nível de significância adotado para a aceitação de diferenças estatisticamente significativas foi de 0,05.

No presente estudo, utilizou-se o teste V de Cramér para a avaliação da existência de relação entre casos positivos e negativos e as variáveis “*Idade*”, “*Sexo*”, “*Contacto com casos confirmados*”, “*Apresentação de Sintomas*”, “*Febre*”, “*Tosse seca*”, “*Dificuldade em respirar*”, “*Outros sintomas*” e “*Patologias*”. As correlações existentes foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

### 3.3. Resultados e Discussão

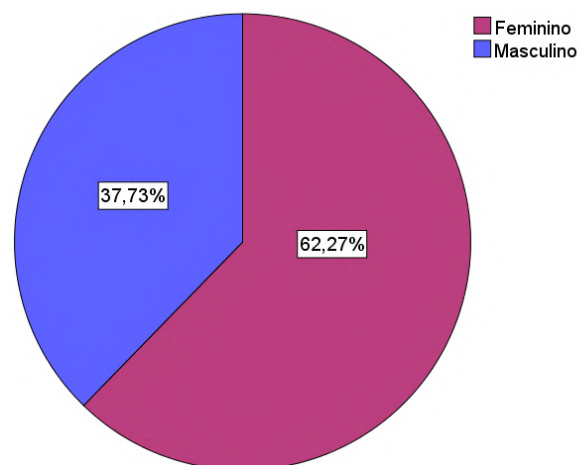
#### 3.3.1. Caracterização geral da população em estudo

Foram estudados 1222 indivíduos que realizaram o teste RT-PCR para detecção do SARS-CoV-2, com a finalidade de saber se estavam ou não infectados com este vírus. Dos indivíduos em estudo 18% (n=219) apresentavam idades entre os 0-30 anos. A maioria dos indivíduos encontra-se integrado na classe de idades dos 31-60 anos e 23,25% (n=283) revelou ter idade igual ou superior a 61 anos.



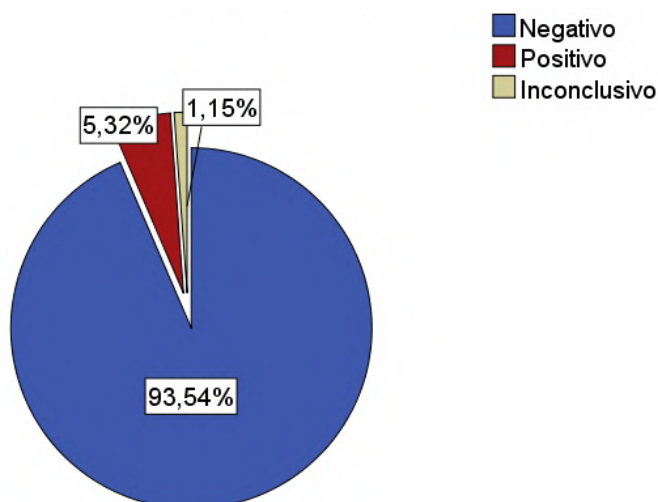
**Figura 6:** Indivíduos em estudo por classes de idades.

Relativamente ao sexo dos 1222 indivíduos, 62,27% (n=761) são do sexo feminino. O sexo masculino representou 37,73% (n=461) dos indivíduos.



**Figura 7:** Percentagem de indivíduos do sexo masculino e feminino que realizaram o teste para pesquisa do SARS-CoV-2.

Dos resultados do teste RT-PCR, para a pesquisa do SARS-CoV-2, 93,54% (n=1143) foram negativos, 5,32% (n=65) positivos e 1,15% (n=14) inconclusivos.



**Figura 8:** Resultados do teste RT-PCR para a pesquisa do SARS-CoV-2.

A grande diferença existente entre o número de casos positivos e negativos pode estar associada ao facto do país, como o mundo, ter estado de quarentena, em teletrabalho, com as escolas encerradas que também levou a que muitos pais tivessem que ficar em casa com os seus filhos, diminuindo assim o contacto e a circulação.<sup>(2, 25)</sup> Outra explicação plausível prende-se com o desconhecimento se qualquer um dos sintomas atribuídos à COVID-19 e que são comuns noutros diagnósticos, possam estar relacionados com uma efetiva infeção



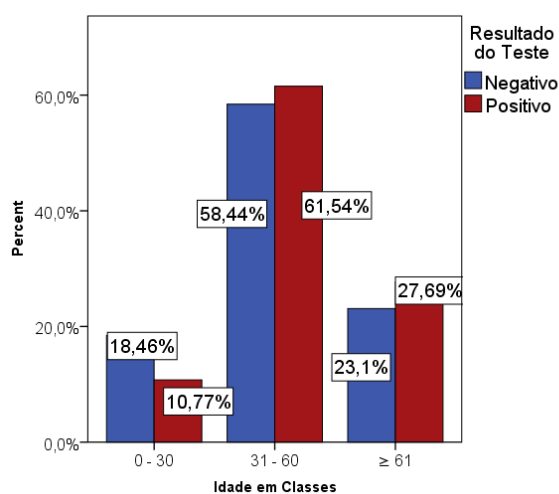
pelo SARS-Cov-2. É possível que tal tenha resultado numa “corrida” aos testes sempre que um sintoma comum como tosse ou febre ligeira estava presente, o que levaria a uma diminuição significativa no quociente infetados/total de testes.

### 3.3.2. Casos positivos *versus* casos negativos

No presente estudo foi verificada a existência de correlações entre os casos COVID-19 positivos e negativos.

Com base nas classes de idades estabelecidas para o estudo, em função do resultado do teste RT-PCR (Figura 9), tanto para os casos positivos como para os casos negativos a classe de idades 31-60 anos apresentou maior número de indivíduos, com 58,44% (n= 666) com resultado teste pesquisa SARS-CoV-2 negativo e 61,54% (n=39) com resultado positivo.

A segunda classe de idades que apresentou um maior número de indivíduos tanto para os casos positivos [com 27,69% (n=16)] como para os negativos [com 23,1% (n=264)] foi a classe de idades igual ou superior aos 61 anos.



**Figura 9:** Classes de idades em função do resultado do teste RT-PCR.

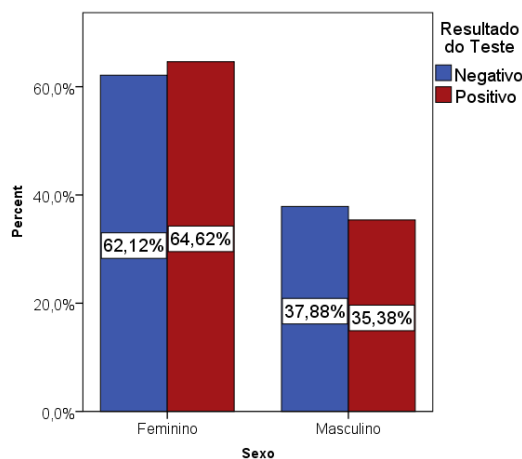
Como verificado na Figura 9, a maioria dos indivíduos que revelou teste positivo para a COVID-19, apresentou idades entre os 31 a 60 anos, o que coincide com os dados divulgados pela Direção-Geral da Saúde, onde o número de infetados, inseridos na classe de idades referida até ao dia 25 de junho de 2020, foi superior a 19 mil, num número total de casos de COVID-19 acima dos 40000 casos.<sup>(86)</sup> É de reparar que é perfeitamente lógico

esperar um maior número de casos positivos numa classe em que é realizado um maior número de testes mas as percentagens dos totais mostram que a faixa dos 31-60 anos e a  $\geq 61$  anos têm um desvio positivo face ao número de casos positivos esperado.

Um estudo publicado pelo *Epidemiology Working Group for Ncip Epidemic Response* CCfDC, Prevention indicou a existência de uma elevada taxa de indivíduos infetados na faixa etária dos 30 aos 79 anos.<sup>(87)</sup> Estes achados assemelham-se aos resultados obtidos neste estudo, podendo estar relacionados com o facto de nesta faixa etária estarem maioritariamente inseridos no mercado de trabalho, contactando com diferente pessoas no local de trabalho como também nos meios de transporte públicos utilizados para a sua deslocação.<sup>(25, 88)</sup>

A razão para a classe de idades dos 0-30 anos apresentar percentagens mais baixas pode estar associada ao facto de neste grupo estarem inseridos crianças e jovens que, durante parte do período correspondente ao presente estudo, viram cessadas as aulas presenciais, passando a ter aulas em casa, o que limitou a probabilidade de serem infetados, excluindo possíveis infeções por adultos ou idosos da sua família.<sup>(25, 87, 88)</sup>

No que se refere ao sexo dos indivíduos que efetuaram teste para pesquisa de SARS-CoV-2, como é possível constatar na Figura 10, o sexo dominante foi o feminino representando 62,12% (n=710) para os casos negativos e 64,62% (n=42) para os casos COVID-19 positivos.



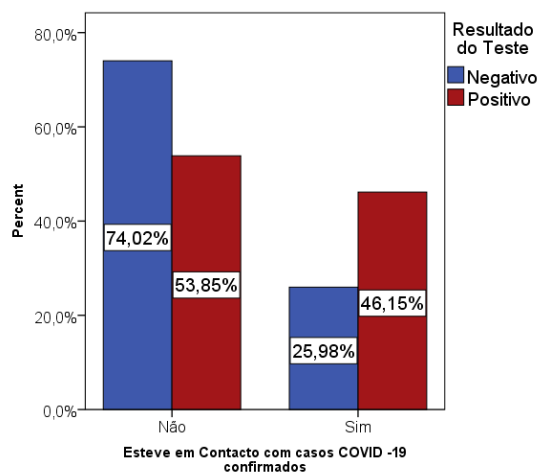
**Figura 10:** Sexo em função do resultado do teste RT-PCR.

A nível mundial, o sexo masculino indica maior morbilidade do que sexo feminino para o novo CoV.<sup>(74, 89)</sup> Contudo, os dados emitidos pela Direção-Geral da Saúde até 25 de junho de 2020 revelaram que o número de casos COVID-19 confirmados foi maior no sexo feminino com 22948 casos e o sexo masculino representou 17918 casos.<sup>(86)</sup> Este fator pode ser explicado pela existência na população portuguesa, de um maior número de indivíduos do sexo feminino (51,5%) do que no sexo masculino (48,5%), embora a diferença não seja muito expressiva.<sup>(90)</sup>

O Comité Europeu revela também que o número mais elevado de infetados é no sexo feminino, justificando que, nos Estados-membros, as mulheres apresentam maiores responsabilidades de cuidar dos seus familiares, em comparação com o sexo masculino e, de certo modo, também possuem uma contribuição maior no setor da saúde que pode favorecer maior suscetibilidade para a infeção pelo SARS-CoV-2.<sup>(72)</sup>

Os resultados obtidos neste estudo, em relação ao sexo com maior número de casos COVID-19 positivos, estão de acordo com a literatura publicada.

A procura de correlações para todas as variáveis analisadas entre os casos positivos e negativos revelou resultados surpreendentes. Antes de mais, optou-se pela utilização do teste V de Cramér em virtude de a análise comparativa pretender medir e verificar a associação entre duas variáveis qualitativas nominais. Apenas a variável “Esteve em contacto com casos confirmados” (Figura 11 e Tabela 1) deu uma associação fraca (V de Cramér = 0,102) com a variável “Resultado do teste”. De entre os indivíduos que tiveram um teste positivo, 53,85% (n=30) indicaram não ter estado em contacto com casos COVID-19 confirmados, contrastando com 46,15% (n=35) que revelaram a existência de contacto. No que diz respeito aos casos negativos a tendência manteve-se com 74,02% (n=846) a indicar a ausência de contacto com indivíduos SARS-CoV-2 positivos.



**Figura 11:** Contacto com casos COVID-19 confirmados em função do resultado do teste RT-PCR.

**Tabela 1:** Correlações pelo teste V de Cramér entre a variável “Resultados positivos/negativos” e as restantes variáveis indicadas.

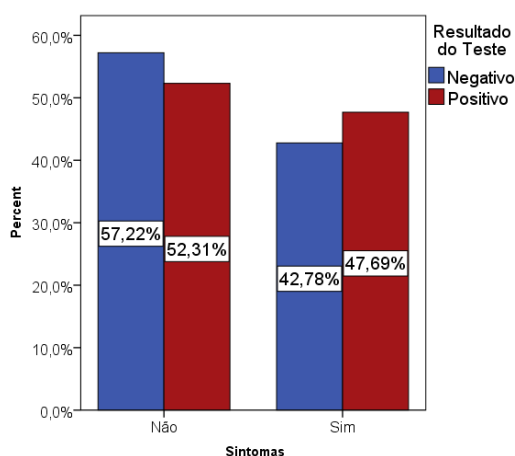
| Variável                       | V de Cramér | p-valor |
|--------------------------------|-------------|---------|
| Sexo                           | 0,012       | 0,697   |
| Contacto com casos confirmados | 0,102       | 0,001   |
| Idades                         | 0,048       | 0,398   |
| Apresentação de sintomas       | 0,022       | 0,443   |
| Febre                          | 0,003       | 1,000   |
| Tosse seca                     | 0,018       | 0,579   |
| Dificuldade em respirar        | 0,001       | 1,000   |
| Perda de olfato/paladar        | 0,031       | 0,284   |
| Outros sintomas                | 0,170       | 0,672   |
| Viagem ao estrangeiro          | 0,000       | 1,000   |
| Patologias                     | 0,166       | 0,247   |

p-valor: probabilidade de um dado acontecimento ocorrer apenas por acaso

Estes resultados explicam-se pela simples razão de um indivíduo que tenha estado em contacto com um qualquer caso COVID-19 confirmado, possuir uma maior probabilidade

de vir a ser infectado (tendo, por conseguinte, um resultado positivo ao teste) do que alguém que não tenha tido contactos confirmados com esta doença. Todavia, a relação revelada pelo teste V de Cramér é fraca, pelo que conclusões mais definitivas só poderiam ter lugar caso o número de casos positivos fosse bastante maior do que a que foi usada no presente estudo.

A apresentação de sintomatologia (Figura 12) avaliada neste estudo, resultando do inquérito efetuado, aquando da realização da colheita dos produtos biológicos para a pesquisa de SARS-CoV-2, 57,22% (n=654) dos casos negativos com ausência de sintomatologia e 52,31% (n=34) dos casos positivos a revelar a mesma situação.

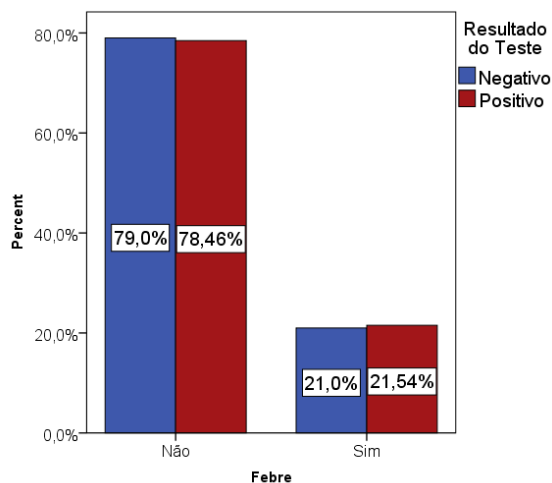


**Figura 12:** Existência ou ausência de sintomas em função do resultado do teste RT-PCR.

Da Figura 12 podemos constatar que no que se refere aos casos positivos existe uma ligeira diferença entre os indivíduos que revelaram ter sintomatologia e os que indicaram a sua ausência. Tal ocorrência pode ser justificada por haver uma maior probabilidade de se estar perante um caso positivo se o indivíduo apresentar a sintomatologia associada à infeção. No entanto, esta diferença é demasiado pequena para ser considerada estatisticamente significativa.

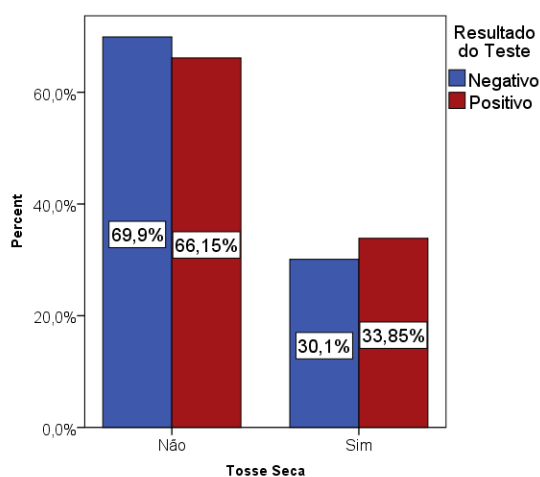
No questionário realizado aos indivíduos, quando referida pelos mesmos a existência de sintomatologia, era perguntado se sentiam febre, tosse seca, dificuldade em respirar, perda de olfato/paladar ou outro tipo de sintomas.

O sintoma febre (Figura 13) foi referido por 21,0% (n=240) dos casos negativos e 21,54% (n=14) dos casos positivos.



**Figura 13:** Existência ou ausência de febre em função do resultado do teste RT-PCR.

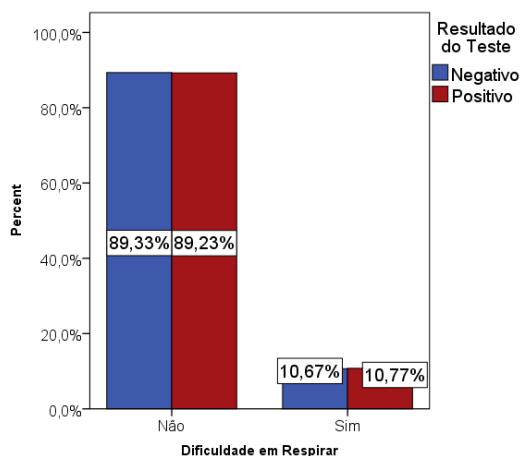
Em relação à tosse seca (Figura 14) 33,85% (n=22) dos casos positivos e 30,10% (n=344) dos casos negativos indicaram a existência deste sintoma.



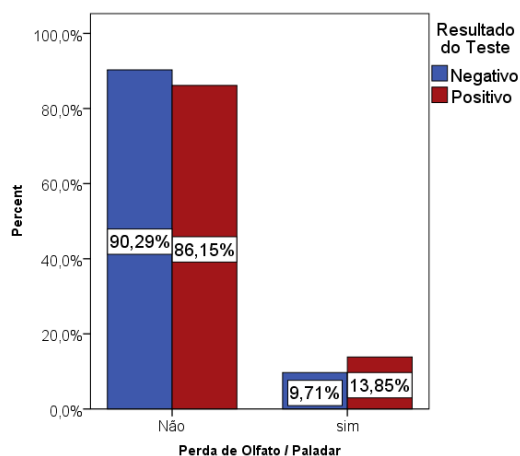
**Figura 14:** Existência ou ausência de tosse seca em função do teste RT-PCR.

Comparativamente à dificuldade em respirar (Figura 15) foi relatada por 10,77% (n=7) dos indivíduos COVID-19 positivos e 10,67% (n=122) dos indivíduos SARS-CoV-2 negativos. Para a perda de olfato/paladar (Figura 16) 13,85% (n=9) dos casos positivos e 9,71% (n=111) dos casos negativos indicaram a existência do sintoma referido. A baixa expressão

dos valores das sintomatologias referidas é espelho de a população em estudo ser maioritariamente assintomática, no momento da colheita dos produtos biológicos para testagem.

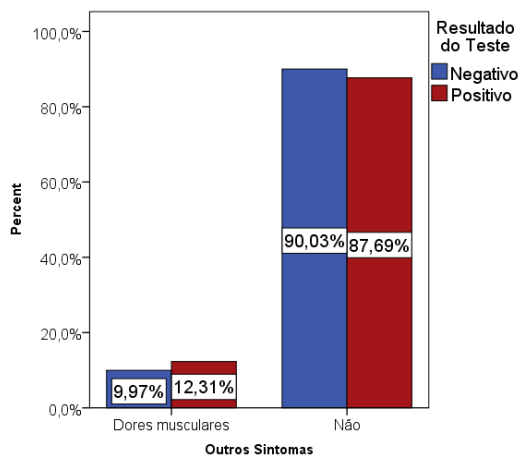


**Figura 15:** Existência ou ausência de dificuldade em respirar em função do resultado do teste RT-PCR.



**Figura 16:** Existência ou ausência de perda de olfato/paladar em função do resultado do teste RT-PCR.

Para além das sintomatologias referidas, a existência de dores musculares foi a mais indicada pelos indivíduos, com 12,31% dos casos positivos e 9,97% dos casos negativos. Este sintoma na literatura também é referenciado no leque dos sintomas da COVID-19. (32,71,86)

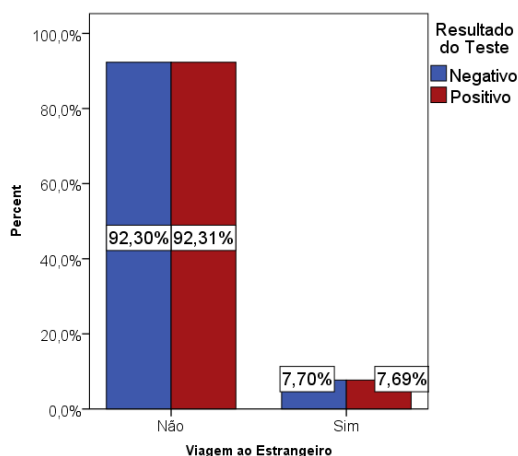


**Figura 17:** Existência ou ausência de outros sintomas em função do resultado do teste RT-PCR.

No que se refere às sintomatologias indicadas, aos valores obtidos no estudo para casos positivos encontram-se próximos dos revelados pela Direção-Geral da Saúde até 26 de junho de 2020, no que diz respeito aos sintomas expressos pelos indivíduos SARS-CoV-2 positivos. Segundo os dados reportados pela Direção-Geral da Saúde, até à data referida anteriormente, a febre representou 28% dos casos, a tosse seca 37%, dificuldade em respirar 10% e dores musculares 21%, cuja proximidade destes valores com os obtidos no estudo pode ser observada, respetivamente nas figuras 13, 14, 15, 17.<sup>(86)</sup>

Como já tinha sido referido, nenhuma das sintomatologias apresentadas revelou estar associada à variável casos positivos através do teste V de Cramér. Este foi claramente o resultado mais surpreendente, pois antecipou-se que pelo menos algum dos sintomas mais descritos na literatura mostrasse uma correlação positiva com a infeção pelo SARS-CoV-2. Para além de uma explicação plausível estar relacionada com um número reduzido de casos positivos no nosso estudo, podemos também especular que terá sido a presença dos próprios sintomas que, por iniciativa própria ou por conselho médico, levou os indivíduos a pedirem os testes, diminuindo a probabilidade de se poder observar uma associação entre as duas variáveis.

Em face da questão “Realizou viagem ao estrangeiro”, 7,69% (n=5) dos casos positivos revelou o ter feito e 7,70% (n=88) dos casos negativos indicou também o ter efetuado.



**Figura 18:** Existência ou ausência de viagem ao estrangeiro em função do resultado do teste RT-PCR.

O baixo número de indivíduos que revelaram ter realizado viagens ao estrangeiro pode encontrar-se relacionado com o facto desde o início da pandemia as viagens internacionais

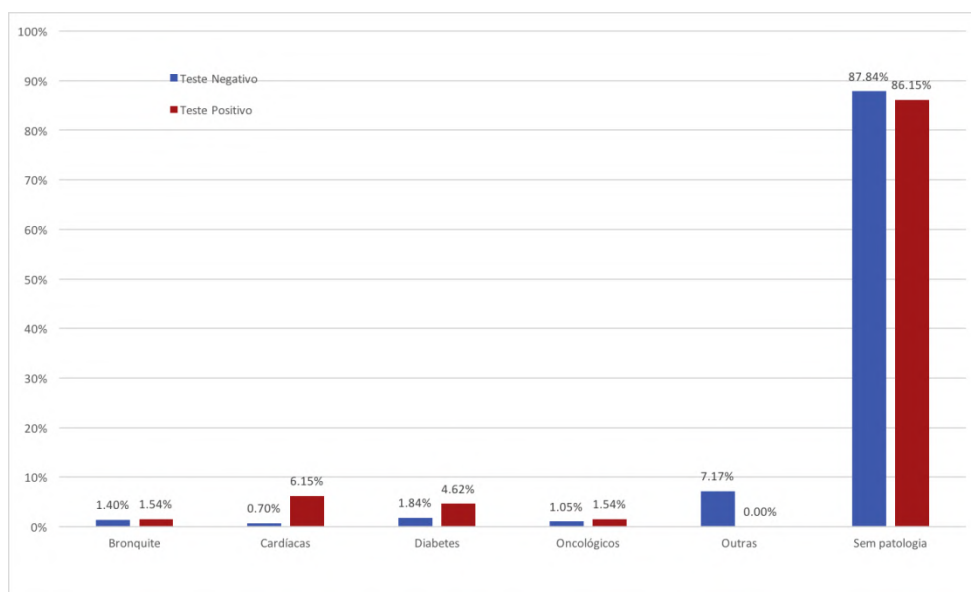


terem registado uma queda, como consequência das restrições impostas por vários governos de vários países, como também pelo receio em viajar, sob a possibilidade de poderem correr o risco de ficarem infetados.<sup>(91)</sup>

Alguns dos casos positivos que revelaram viagens ao estrangeiro podem ser casos importados. Em Portugal, o número de casos divulgados pela Direção-Geral da Saúde indicou que o país até 25 de junho importou mais de 700 casos, tendo as viagens ao Reino Unido, Suíça, Espanha e França sido aquelas com maior contribuição.<sup>(86)</sup>

Durante o questionário ainda foi perguntado aos indivíduos em estudo se tinham alguma patologia. Dos casos positivos foram reveladas quatro patologias (Figura 19), entre as quais as que indicaram maior expressão foram as doenças cardíacas, com 6,15 % (n=4) e a diabetes, com 4,62% (n=3). As patologias referidas vão de acordo com as indicadas na literatura, como um fator de risco para a COVID-19.<sup>(73)</sup>

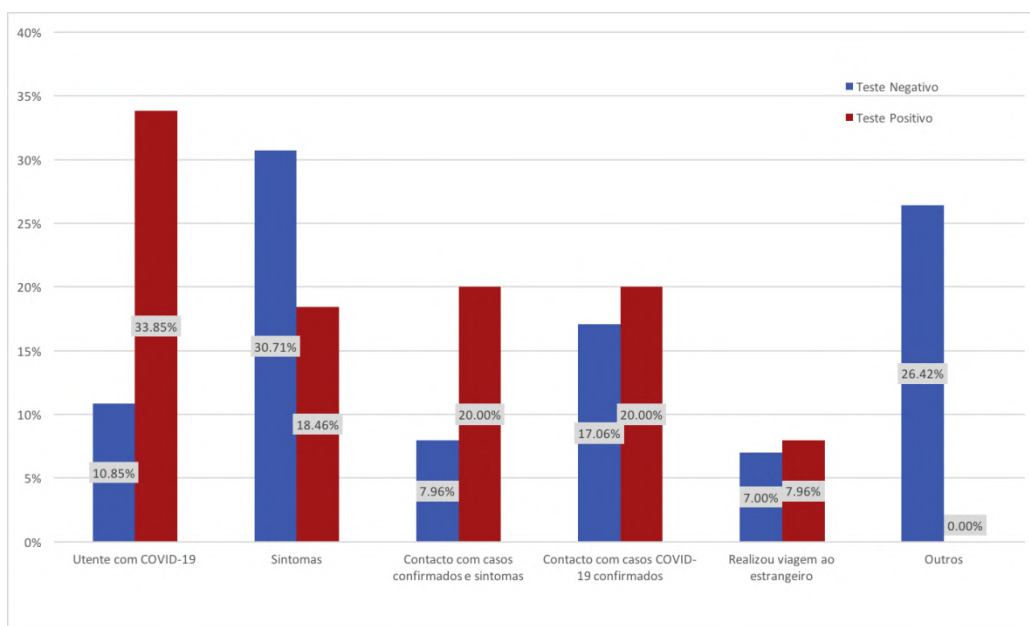
Devido ao número baixo de patologias indicadas para os casos positivos e ainda devido ao facto de não ser conhecido o respetivo acompanhamento hospitalar, não é possível tirar qualquer conclusão sobre se alguma das patologias pode indicar uma suscetibilidade maior em contrair o SARS-CoV-2 e/ou associação com uma eventual morbidade.



**Figura 19:** Patologias referidas pelos indivíduos com teste SARS-CoV-2 positivo e negativo.

Por fim o motivo de realização do teste, também foi alvo de questão, para a qual 33,85 % dos casos positivos revelou realizar o teste por ter estado infetado pelo SARS-CoV-2,

pretendendo com o teste verificar a sua ausência. Comparando com os casos negativos, 30,71% dos mesmos revelaram fazer o teste por ter apresentarem sintomatologia. Para esta pergunta, os resultados estão de acordo com o esperado. Quem foi diagnosticado com teste positivo teve de o repetir, por vezes mais do que uma vez, até o resultado ser negativo (frequentemente por motivos de trabalho), enquanto que, para os casos negativos, o motivo principal de realização dos testes foi a presença de sintomas compatíveis com a presença da COVID-19.



**Figura 20:** Motivos de realização do teste para deteção do novo CoV referidas pelos indivíduos com teste SARS-CoV-2 positivo e negativo.

### **3.4. Conclusão**

A COVID-19 surgiu em dezembro de 2019, gerando preocupações a nível mundial e sendo alvo de vários estudos, entre os quais tentar perceber as idades e o sexo mais suscetíveis à COVID-19, a sintomatologia mais frequente e as comorbilidades associadas a esta doença. Na análise apresentada neste trabalho podemos concluir que, apesar dos indivíduos com idades superiores a 65 anos serem identificados como mais suscetíveis ao SARS-CoV-2, as idades que apresentaram maior número de infetados inserem-se na classe dos 31 aos 60 anos, indicando que outros fatores relacionados com a natureza do pedido dos testes deverão estar envolvidos.

No que se referiu ao sexo, sintomatologia e doenças associadas à COVID-19, os resultados foram de acordo com os estudos presentes na literatura e emitidos pela Direção-Geral da Saúde.

Num ano tão fustigado pela COVID-19, continuar a apostar na testagem é essencial, pois é uma arma forte para controlar esta pandemia. Na atualidade, a existência de vacinas vem dar uma esperança ao mundo no combate a esta pandemia tão devastadora.

### 3.5. Referências Bibliográficas

1. Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, et al. COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Front Public Health*. 2020;8:383.
2. Shrestha N, Shad MY, Ulvi O, Khan MH, Karamehic-Muratovic A, Nguyen UDT, et al. The impact of COVID-19 on globalization. *One Health*. 2020:100180.
3. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report,51. WHO. 2020. Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10) [ Consult. 26 Setembro 2020]
4. Chakraborty I, Maity P. COVID-19 outbreak: Migration, effects on society, global environment and prevention. *Sci Total Environ*. 2020;728:138882.
5. Kumar M, Al Khodor S. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. *J Transl Med*. 2020;18(1):353.
6. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*. 2020;371:m3862.
7. WHO. Weekly operational update on COVID-19-13 November 2020. WHO.2020. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-operational-update-on-covid-19--13-november-2020> [ Consult. 19 Novembro 2020].
8. Guner R, Hasanoglu I, Aktas F. COVID-19: Prevention and control measures in community. *Turk J Med Sci*. 2020;50(SI-1):571-7.
9. Walsh KA, Jordan K, Clyne B, Rohde D, Drummond L, Byrne P, et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J Infect*. 2020;81(3):357-71.
10. MCKEEVER A. Here's the latest on COVID-19 vaccines. *National Geographic*.2020. Available from: <https://www.nationalgeographic.com/science/health-and-human-body/human-diseases/coronavirus-vaccine-tracker-how-they-work-latest-developments-cvd/> [ Consult. 23 Dezembro 2020].
11. Callaway E. What Pfizer's landmark COVID vaccine results mean for the pandemic. *Nature*. 2020.
12. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165878.
13. WHO. Novel Coronavirus(2019-nCoV): Situation Report - 10 World Health Organization. WHO. 2020. Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf?sfvrsn=d0b2e480\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf?sfvrsn=d0b2e480_2) [ Consult. 27 Setembro 2020].
14. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19-13 March 2020. WHO. 2020. Available from: <https://www.who.int/director->

- general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mission-briefing-on-covid-19---13-march-2020 [ Consult. 27 Setembro 2020].
15. Sky News. Coronavirus: Number of COVID-19 deaths in Italy surpasses China as total reaches 3,405. Sky News. 2020. Available from: <https://news.sky.com/story/coronavirus-number-of-covid-19-deaths-in-italy-surpasses-china-as-total-reaches-3-405-11960412> [ Consult. 27 Setembro 2020].
  16. G. D. Donald G. The United States now leads the world in confirmed coronavirus cases. The New York Times. 2020. Available from: <https://www.nytimes.com/2020/03/26/health/usa-coronavirus-cases.html> [ Consult. 26 Outubro 2020]
  17. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 75. WHO. 2020. Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200404-sitrep-75-covid-19.pdf?sfvrsn=99251b2b\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200404-sitrep-75-covid-19.pdf?sfvrsn=99251b2b_4) [Consult. 26 Outubro 2020].
  18. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) :Situation Report – 132. WHO. 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332280/nCoVsitrep31May2020-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [ Consult. 28 Outubro 2020].
  19. Will Feuer JK. WHO warns coronavirus pandemic is speeding up as countries ease lockdown rules: ‘The worst is yet to come’. CNBC. 2020. Available from: <https://www.cnbc.com/2020/06/29/who-warns-coronavirus-pandemic-is-speeding-up-as-countries-ease-lockdown-rules.html> [ Consult. 2 Novembro 2020].
  20. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Report-193. WHO. 2020. Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200731-covid-19-sitrep-193.pdf?sfvrsn=42a0221d\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200731-covid-19-sitrep-193.pdf?sfvrsn=42a0221d_4) [ Consult. 2 Novembro 2020].
  21. WHO. Weekly epidemiological update - 31 August 2020. WHO. 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---31-august-2020> [ Consult. 5 Novembro 2020].
  22. WHO. Weekly epidemiological update - 5 October. WHO. 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---5-october-2020> [Consult. 16 Novembro 2020]
  23. WHO. Weekly epidemiological update - 18 October. WHO. 2020. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20201020-weekly-epi-update-10.pdf> [ Consult. 16 Novembro 2020].
  24. Milhinhos A, Costa PM. On the Progression of COVID-19 in Portugal: A Comparative Analysis of Active Cases Using Non-linear Regression. *Front Public Health*. 2020;8:495.

25. Ricoca Peixoto V, Vieira A, Aguiar P, Carvalho C, Rhys Thomas D, Abrantes A. Initial Assessment of the Impact of the Emergency State Lockdown Measures on the 1st Wave of the COVID-19 Epidemic in Portugal. *Acta Med Port.* 2020;33(11):733-41.
26. XXII Governo. Plano de Desconfinamento: Conselho de Ministros, 30 de abril 2020. República Portuguesa.2020. Available from: <https://www.portugal.gov.pt/download-ficheiros/ficheiro.aspx?v=%3d%3dBAAAAB%2bLCAAAAAAABACztDA0AQAYL%2fZhBAAA%3d%3d> [ Consult. 16 Novembro 2020].
27. Minder R. Counting Bodies and Pointing Fingers as Spain Tallies Coronavirus Dead. *The New York times.* 2020. Available from: <https://www.nytimes.com/2020/04/16/world/europe/coronavirus-spain-death-toll.html> [ Consult. 16 Novembro 2020].
28. Worldometer . Daily New Cases in Portugal. Worldometer. 2020. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/> [ Consult. 18 Novembro 2020].
29. DGS .COVID-19 | RELATÓRIO DE SITUAÇÃO | 14 SETEMBRO 2020. DGS. 2020. Available from:[https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/09/196\\_DGS\\_boletim\\_20200914.pdf](https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/09/196_DGS_boletim_20200914.pdf). [ Consult . 18 Novembro 2020].
30. MARTINS C. Hospitais avisam: cuidados intensivos em rutura nos próximos dias. *Expresso.* 2020. Available from : <https://expresso.pt/coronavirus/2020-10-16-Hospitais-avisam-cuidados-intensivos-em-rutura-nos-proximos-dias> [ Consult. 19 Novembro 2020].
31. DGS. COVID-19 | RELATÓRIO DE SITUAÇÃO | 29 OUTUBRO. 2020. DGS Available from: [https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/10/241\\_DGS\\_boletim\\_20201029.pdf](https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/10/241_DGS_boletim_20201029.pdf) [ Consult. 19 Novembro 2020].
32. Fadaka AO, Sibuyi NRS, Adewale OB, Bakare OO, Akanbi MO, Klein A, et al. Understanding the epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management of SARS-CoV-2. *J Int Med Res.* 2020;48(8):300060520949077.
33. Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens.* 2020;9(5).
34. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, et al. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2013;87(15):8638-50.
35. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91-8.

36. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74.
37. Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2020;16(8):e1008762.
38. Samudrala PK, Kumar P, Choudhary K, Thakur N, Wadekar GS, Dayaramani R, et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol*. 2020;883:173375.
39. Shah VK, Firmal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol*. 2020;11:1949.
40. Brendan A McGrath MJB, Stephen J Warrillow, Vinciya Pandian. Tracheostomy in the COVID-19 era: global and multidisciplinary orientation. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8(7):717-25.
41. Muge Cevik MT, Ollie Lloyd, Alberto Enrico Maraolo, Jenna Schafers, Antonia Ho. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*. 2020.
42. Cheng HY, Jian SW, Liu DP, Ng TC, Huang WT, Lin HH, et al. Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods Before and After Symptom Onset. *JAMA Intern Med*. 2020;180(9):1156-63.
43. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):656-7.
44. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med*. 2020;382(22):2081-90.
45. Corman VM, Rabenau HF, Adams O, Oberle D, Funk MB, Keller-Stanislawski B, et al. SARS-CoV-2 asymptomatic and symptomatic patients and risk for transfusion transmission. *Transfusion*. 2020;60(6):1119-22.
46. Lee S, Meyler P, Mozel M, Tauh T, Merchant R. Asymptomatic carriage and transmission of SARS-CoV-2: What do we know? *Can J Anaesth*. 2020;67(10):1424-30.
47. Wei WE, Li Z, Chiew CJ, Yong SE, Toh MP, Lee VJ. Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 - Singapore, January 23-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(14):411-5.
48. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(5):672-5.

49. Miriam Casey JG, Conor G. McAloon, Andrew W. Byrne. Pre-symptomatic transmission of SARS-CoV-2 infection: a secondary analysis using published data medRxiv. 2020:1-34.
50. Nogrady B. What the data say about asymptomatic COVID infections. *Nature*. 2020;587(7835):534-5.
51. Oyungerel Byambasuren MC, Katy Bell, . Estimating the extent of asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: Systematic review and meta-analysis. *JAMMI*. October 21, 2020.
52. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. WHO. 2020. Available from: file:///C:/Users/Utilizador/Downloads/WHO-2019-nCoV-Sci\_Brief-Transmission\_modes-2020.3-eng.pdf [ Consult. 26 Novembro].
53. COVID-19 transmission—up in the air. *The Lancet Respiratory Medicine*. October 29, 2020;8(12):1159.
54. Patel KP, Vunnam SR, Patel PA, Krill KL, Korbitz PM, Gallagher JP, et al. Transmission of SARS-CoV-2: an update of current literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(11):2005-11.
55. Klompas M, Baker MA, Rhee C. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. *JAMA*. 2020.
56. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-7.
57. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, Ong SWX, Gum M, Lau SK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun*. 2020;11(1):2800.
58. Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1583-91.
59. Faridi S, Niazi S, Sadeghi K, Naddafi K, Yavarian J, Shamsipour M, et al. A field indoor air measurement of SARS-CoV-2 in the patient rooms of the largest hospital in Iran. *Sci Total Environ*. 2020;725:138401.
60. Cheng VC, Wong SC, Chan VW, So SY, Chen JH, Yip CC, et al. Air and environmental sampling for SARS-CoV-2 around hospitalized patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(11):1258-65.
61. Moriarty LF, Plucinski MM, Marston BJ, Kurbatova EV, Knust B, Murray EL, et al. Public Health Responses to COVID-19 Outbreaks on Cruise Ships - Worldwide, February-March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(12):347-52.



62. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, Morwitzer MJ, Creager HM, Santarpia GW, et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep.* 2020;10(1):12732.
63. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med.* 2020.
64. Jiang X, Luo M, Zou Z, Wang X, Chen C, Qiu J. Asymptomatic SARS-CoV-2 infected case with viral detection positive in stool but negative in nasopharyngeal samples lasts for 42 days. *J Med Virol.* 2020;92(10):1807-9.
65. Zhang T, Cui X, Zhao X, Wang J, Zheng J, Zheng G, et al. Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia. *J Med Virol.* 2020;92(7):909-14.
66. Parazzini F, Bortolus R, Mauri PA, Favilli A, Gerli S, Ferrazzi E. Delivery in pregnant women infected with SARS-CoV-2: A fast review. *Int J Gynaecol Obstet.* 2020;150(1):41-6.
67. Wang S, Guo L, Chen L, Liu W, Cao Y, Zhang J, et al. A Case Report of Neonatal 2019 Coronavirus Disease in China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):853-7.
68. WHO. Breastfeeding and COVID-19. WHO. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/breastfeeding-and-covid-19> [ Consult. 28 Novembro 2020].
69. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2020;6:1-14.
70. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;173(5):362-7.
71. Sofia R. de Valdoeiros ICG, Carolina Silva,. COVID-19 | Manual Clínico. Centro Hospitalar e Universitário do Porto.2020. Available from: [https://www.chporto.pt/pdf/2020/COVID-19\\_Manual\\_Clinico\\_CHUPorto.pdf](https://www.chporto.pt/pdf/2020/COVID-19_Manual_Clinico_CHUPorto.pdf) [ Consult. 28 Novembro 2020].
72. Goujon A NF, Ghio D, Conte A, Dijkstra L. Age, gender, and territory of COVID-19 infections and fatalities. JRC Publications Repository. 2020. Available from: [https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC120680/gender\\_territory\\_covid19\\_online.pdf](https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC120680/gender_territory_covid19_online.pdf) [ Consult. 23 Dezembro 2020].
73. Khan S, Liu J, Xue M. Transmission of SARS-CoV-2, Required Developments in Research and Associated Public Health Concerns. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:310.
74. Bwire GM. Coronavirus: Why Men are More Vulnerable to Covid-19 Than Women? *SN Compr Clin Med.* 2020:1-3.

75. NHI. Clinical Presentation of People with SARS-CoV-2 Infection. NHI 2020. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-presentation/> [ Consult. 29 Novembro 2020].
76. Vandenberg O, Martiny D, Rochas O, van Belkum A, Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat Rev Microbiol.* 2020:1-13.
77. Magalhães S. SARS-CoV-2: Diagnóstico Laboratorial. *Acta Farmacêutica Portuguesa.* 2020;9(1):32-7.
78. Notícias. Dd. Portugal já fez mais de três milhões de testes à covid-19 desde o início da pandemia. *Diário de Notícias.*2020. Available from: <https://www.dn.pt/pais/portugal-ja-fez-mais-de-tres-milhoes-de-testes-a-covid-19-desde-o-inicio-da-pandemia-12937991.html> [ Consult. 29 Novembro 2020].
79. DGS. Portugal já ultrapassou os 30 mil testes diários à COVID-19. DGS. 2020. Available from: <https://covid19.min-saude.pt/portugal-ja-ultrapassou-os-30-mil-testes-diarios-a-covid-19/> [ Consult. 29 Novembro 2020].
80. Glenna Burner MB. SARS-CoV-2 and COVID-19 Pathogenesis: A Review. *LSBio.* 2020:1-34.
81. Pan A, Liu L, Wang C, Guo H, Hao X, Wang Q, et al. Association of Public Health Interventions With the Epidemiology of the COVID-19 Outbreak in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(19):1915-23.
82. Iwasaki A, Grubaugh ND. Why does Japan have so few cases of COVID-19? *EMBO Mol Med.* 2020;12(5):e12481.
83. Chriscaden K. Impact of COVID-19 on people's livelihoods, their health and our food systems. WHO .2020. Available from: <https://www.who.int/news/item/13-10-2020-impact-of-covid-19-on-people's-livelihoods-their-health-and-our-food-systems> [ Consult. 29 Novembro].
84. Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg.* 2020;78:185-93.
85. CDC. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. CDC .2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> [ Consult. 1 Dezembro 2020].
86. Direção - Geral da Saúde. Relatório de Situação nº 116 | 26/06/2020. Direção - Geral da Saúde.2020. Available from: [https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/06/116\\_DGS\\_boletim\\_20200626-1.pdf](https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/06/116_DGS_boletim_20200626-1.pdf) [ Consult. 23 Dezembro 2020].

87. Epidemiology Working Group for Ncip Epidemic Response CCfDC, Prevention. [The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2020;41(2):145-51.
88. Zhao ZY, Zhu YZ, Xu JW, Hu SX, Hu QQ, Lei Z, et al. A five-compartment model of age-specific transmissibility of SARS-CoV-2. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):117.
89. Agrawal H, Das N, Nathani S, Saha S, Saini S, Kakar SS, et al. An Assessment on Impact of COVID-19 Infection in a Gender Specific Manner. *Stem Cell Rev Rep*. 2020.
90. countrymeters. Portugal Population. countrymeters. 2020. Available from: <https://countrymeters.info/en/Portugal> [ Consult. 23 Dezembro 2020].
91. Russell TW, Wu JT, Clifford S, Edmunds WJ, Kucharski AJ, Jit M, et al. Effect of internationally imported cases on internal spread of COVID-19: a mathematical modelling study. *Lancet Public Health*. 2020.

## **PARTE IV**

### **Conclusão geral**

## 4. Conclusão geral

O diagnóstico de algumas doenças infecciosas pode ser realizado clinicamente, devido às características distintas que apresentam, permitindo a sua identificação pelo clínico.

Contudo, uma única síndrome clínica poderá suceder de uma infecção, cuja origem pode estar em vários microrganismos patogênicos. Por isso, na maioria das vezes, as metodologias laboratoriais microbiológicas são solicitadas pelo clínico, com a finalidade de identificar o agente etiológico da infecção em estudo. Estas metodologias não só permitem saber qual o microrganismo patogênico que está na gênese da infecção, como também têm um papel relevante na orientação terapêutica, monitorização e prevenção de diversas patologias infecciosas.

O estágio por mim efetuado, no Laboratório José Manuel Chau S.A., permitiu-me constatar a importância que as metodologias laboratoriais têm no auxílio do diagnóstico clínico. O mundo, como também os estágios curriculares, foram assolados pela COVID-19. No decorrer do estágio foi-me permitido a aquisição de novas experiências e conhecimentos no que se refere ao SARS-CoV-2 (principalmente no que diz respeito à colheita dos produtos biológicos para deteção do novo CoV, seu acondicionamento e transporte), o que me possibilitou a apresentação de um pequeno estudo sobre este vírus.

Do estudo efetuado pode-se concluir que os dados obtidos no que diz respeito às idades e o sexo com maior número de infetados pelo SARS-CoV-2, a sintomatologia e as comorbilidades associadas com este vírus, encontram-se de acordo com a literatura existente.

Em suma, foi única a oportunidade a mim concedida pela Dr.<sup>a</sup> Maria Beatriz em realizar o estágio, possibilitando-me apresentar este documento, pois permitiu a aquisição de novos conhecimentos e experiências numa área pela qual apresento um elevado interesse pessoal, a Microbiologia, ficando ciente que um diagnóstico laboratorial exato, fiável e de fácil interpretação é essencial no auxílio ao diagnóstico clínico de patologias.

## **Anexo**

## Método difusão em disco: antibióticos e seus valores de referência para veterinária

| ANTIBIÓTICO   | CÓD ATB | MIC (mm) | R/I/S   | Interpretação diâmetros (mm)  |                               |                   |
|---|---------|----------|---|---|-------------------------------|-------------------|
|   |         |          |   | Resistente  | Intermédio                    | Susceptível       |
| Ácido Nalidixico 30 µg  |         |          |   |   |                               |                   |
| Amoxicilina + Ácido Clavulânico 30 µg   | AMC     |          | Enterobacteriaceae<br>Staphylococcus spp<br>Haemophilus                 | ≤13<br>≤19<br>≤19   | 14 - 17                       | ≥18<br>≥20<br>≥20 |
| Amoxicilina 30 µg   | AML     |          | Enterococcus spp<br>Outras bactérias                                    | ≤19<br>≤16  | -<br>17 - 19                  | ≥20<br>≥20        |
| Ampicilina (Representativa da ampicilina e da amoxicilina, reportar também Amoxicilina) | AM      |          | Enterobacteriaceae<br>Staphylococcus spp<br>Haemophilus                 | ≤13<br>≤28<br>≤18   | 14 - 16<br>19 - 21            | ≥17<br>≥29<br>≥22 |
| Apromicina 15 µg  | APR     |          | MIC para 40 µg  | ≤19   | 20 - 22                       | ≥23               |
| Cefalexina 30 µg  |         |          |   |   |                               |                   |
| Cefovecin (Convenia™) 30 µg   | CVN     |          | Só para usar em cães e gatos  | ≤20   | 21 - 23                       | ≥24               |
| Ceftiofur 30 µg   | EFT     |          |   | ≤17   | 18 - 20                       | ≥21               |
| Colistina 50 µg *   | CS      |          |   | ≤15   |                               | ≥15               |
| Doxicilina DO 30 *  | DO      |          |   | ≤12   | 13 - 15                       | ≥16               |
| Enrofloxacin 5 µg   | ENR     |          |   | ≤16   | 17 - 20                       | ≥21               |
| Florfenicol 30 µg   | FFC     |          |   | ≤18   | 19 - 21                       | ≥22               |
| Flumequina 30 µg  | UB      |          |   | ≤21   |                               | ≥25               |
| Gentamicina 10 µg *   | GM/CN   |          |   | ≤12   | 13 - 14                       | ≥15               |
| Lincomicina 10 µg   | MY      |          |   | ≤17   |                               | ≥21               |
| Lincomicina + Spectinomina (109 µg)   | LS      |          |   | Não foram encontradas tabelas interpretativas das MIC para este composto. |                               |                   |
| Marbofloxacin   | MAR     |          |   | ≤14   | 15 - 19                       | ≥20               |
| Neomicina 30 µg   | N       |          |   | ≤13   | 14 - 15                       | ≥16               |
| Oxitetraciclina OT30 *  | OT      |          |   | ≤15   | 16 - 25                       | ≥26               |
| Penicilina G 6 µg (10TU)  | P       |          | Staphylococcus spp<br>Enterococcus spp<br>Streptococcus b-hem           | ≤28<br>≤14<br>-   | -                             | ≥29<br>≥15<br>≥24 |
| Sulfametoxazol + Trimetoprim (SxT) 23,75/1,25 µg  | SxT     |          |   | ≤10   | 11 - 15                       | ≥16               |
| Tetraciclina 30 µg  | TE      |          | Enterobacteriaceae<br>Staphyl e Enteroc. spp<br>Streptococcus b-hem     | ≤11<br>≤14<br>≤18   | 12 - 14<br>15 - 18<br>19 - 22 | ≥15<br>≥19<br>≥23 |
| Tilosina  |         |          |   | Não foram encontradas tabelas interpretativas das MIC para este composto. |                               |                   |
| Tiamulina 30 µg   | T       |          |   | < 11  | 11 - 19                       | ≥19               |
| Tilmicosina 15 µg   | TIL     |          |   | ≤10   | 11 - 14                       | ≥14               |
| Tianfenicol 30 µg   | TP      |          | Usar em ovinos, caprinos, suínos e bovinos. Não usar em aves e coelhos. | ≤12   | 13 - 17                       | ≥18               |

Característica - enquanto molécula possui uma ação superior in vivo quando comparada à ação in vitro. Isto é relevante sobretudo quando os resultados são mais difíceis de interpretar ou se situam sobre valores limite, onde nestes casos deverá ser sempre assumida a maior sensibilidade.