



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Raquel Pires Costa

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo Dr. João Luís Pereira Vaz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Raquel Pires Costa

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e pelo Dr. João Luís Pereira Vaz e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2023

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam ao longo deste percurso, todas de uma maneira ou de outra nunca me deixaram desistir nos dias menos bons e sempre me incentivaram a seguir os meus objetivos.

À Professora Doutora Ana Miguel por todo o apoio, disponibilidade, prontidão e sugestões relativas à elaboração do estágio e respetivo relatório, nunca colocando nenhum entrave.

Ao Dr. João Vaz por me transmitir todo o conhecimento e me auxiliar no desenvolvimento do trabalho escrito e leitura do relatório.

A todas as minhas colegas de trabalho, Alexandra, Ana e Célia que estiveram sempre dispostas a incentivar-me e aconselhar-me ao longo do percurso.

Aos meus pais e irmão por sempre demonstrarem orgulho em mim e nunca me deixarem desistir.

Ao meu namorado, Rodolfo, por ter embarcado comigo nesta aventura, obrigada por todo o incentivo, paciência e compreensão.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	vi
Índice de Figuras.....	ii
Índice de Tabelas.....	iii
Resumo.....	iv
Introdução.....	1
1. Caracterização dos laboratórios de estágio.....	2
1.1. Laboratório do Hospital Pediátrico (HP).....	2
1.2. Laboratório do Hospital Universitário (HUC).....	3
1.3. Fases do Processo Analítico.....	3
1.3.1. Fase Pré-Analítica.....	3
1.3.2. Fase Analítica.....	4
1.3.3. Fase Pós-Analítica.....	4
1.4. Controlo de Qualidade Interno e Externo.....	5
2. Hematologia.....	6
2.1. Hematopoiese.....	6
2.2. Hemograma.....	7
2.2.1. Eritrograma e Alterações eritrocitárias.....	8
2.2.2. Leucograma e Alterações leucocitárias.....	10
2.2.3. Trombocitograma e Alterações plaquetares.....	11
2.2.4. Metodologias dos Contadores Hematológicos.....	12
2.3. Esfregaço de Sangue Periférico.....	13
2.4. Velocidade de Sedimentação.....	13
2.5. Hemóstase.....	14
2.5.1. Testes de avaliação da coagulação.....	15
3. Bioquímica.....	18
4. Imunologia.....	20
5. Microbiologia.....	22
5.1. Virologia – Biologia Molecular.....	24
5.1.1. Vírus com Importância Clínica.....	24
5.1.2. Técnicas Moleculares.....	28
Deteção de Vírus Neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC.....	34
Conclusão.....	44
Bibliografia.....	45

Lista de Abreviaturas

ALT – Alaninina

Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

BKV – Vírus BK

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CMV – Citomegalovírus Humano

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EV - Enterovírus

FSC – *Forward Scatter*

HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HBV – Vírus da Hepatite B

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HCV – Vírus da Hepatite C

HEV – Vírus da Hepatite E

HG – Hospital dos Covões

HIV-I – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo I

HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2

HHV-6 – Herpesvírus Humano tipo 6

HP – Hospital Pediátrico

HPeV – Parechovírus Humano

HSV-I – Herpes Vírus Simplex I

HSV-2 – Herpes Vírus Simplex 2

HUC – Hospital Universitário de Coimbra

INR - *International Normalized Ratio*

ISI - Índice de Sensibilidade Internacional

ITL – Anticoagulante Lúpico

JCV – Vírus John Cunningham

K2 - Dipotássico

K3 – Tripotássico

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Time-of-Flight*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PDW - *Platelet Distribution Width*

QFA – Doseamento de Fibrinogénio

RBC – *Red Blood Cell*

RDW – *Red Cell Distribution With*

RET - Reticulócitos

RNA – Ácido Ribonucleico

SFL – *Side Fluorescence Light*

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central
SPC-CHUC – Serviço de Patologia
Clínica do Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra
SSC – *Side Scatter*
TP – Tempo de Protrombina
TSA – Teste de Sensibilidade aos
Antibióticos

TTPa – Tempo de Tromboplastina
Parcial ativado
VCM – Volume Corpuscular Médio
VPM – Volume Plaquetar Médio
VS – Velocidade de Sedimentação
VZV - Vírus *Varicella-Zoster*

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama esquemático da hematopoiese e diferentes linhagens.....	7
Figura 2: Diagrama esquemático simplificado da cascata da coagulação, com representação da via intrínseca e extrínseca.....	14
Figura 3: Eletroforeses de proteínas séricas. A: Eletroforese com padrão normal; B: Eletroforese sugestiva de cirrose hepática (gamapatia policlonal); C: Eletroforese com padrão inflamatório; D: Eletroforese sugestivo de paraproteinémia (gamapatia monoclonal).....	20
Figura 4: Intervalo temporal (janeiro de 2016 a fevereiro de 2023) das amostras de LCR de suspeita de infecção do SNC.....	40
Figura 5: Poster intitulado “Detecção de vírus neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infecção no SNC”	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros analisados no eritrograma, valores de referência e metodologias utilizadas pelo Sysmex XN-I500.....	8
Tabela 2: Parâmetros analisados no Leucograma, valores de referência num adulto saudável e metodologia utilizada pela Sysmex XN-I500.....	10
Tabela 3: Parâmetros analisados no Trombocitograma, valores de referência e metodologia utilizada pela Sysmex XN-I500.....	11
Tabela 4: Aumentos dos parâmetros da função plaquetar e causas associadas.....	17
Tabela 5: Equipamentos utilizados no setor de Bioquímica, parâmetros avaliados, metodologias e amostras biológicas processadas.....	18
Tabela 6: Equipamentos utilizados no setor de Imunologia, metodologias, parâmetros avaliados e amostras biológicas processadas.....	21
Tabela 7: Família <i>Orthoherpesviridae</i> , Subfamília, Género, Espécie, Transmissão e Local de Latência dos vírus.....	25
Tabela 8: Família <i>Polyomaviridae</i> , Género, Espécie, Transmissão e Locais de Latência dos vírus.....	26
Tabela 9: Família <i>Picornaviridae</i> , Género, Espécie e Genoma dos vírus.....	27
Tabela 10: Família, Género, Espécie, Transmissão e Latência dos vírus causadores de Hepatites virais.....	27
Tabela 11: Família, Vírus, Genoma e Transmissão e Latência dos vírus causadores de infecções respiratórias.....	28
Tabela 12: Distribuição da amostragem de indivíduos com ou sem infecção viral (PCR) pelos diferentes grupos etários e respetiva prevalência.....	39
Tabela 13: Vírus detetados em amostras de LCR de indivíduos com suspeita de infecção no SNC.....	40

Resumo

O presente relatório de estágio tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas nas áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia ao longo do período de estágio, dando maior ênfase às áreas de Hematologia e Microbiologia.

O estágio curricular foi realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tendo decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Durante este período tive a oportunidade de conciliar as componentes teóricas e práticas e integrar equipas multidisciplinares que trabalham em conjunto para dar o melhor resultado possível aos doentes.

Este documento é constituído por duas partes, a primeira referente à descrição dos estágios elaborados e uma segunda parte referente a um estudo retrospectivo, intitulado “Deteção de Vírus Neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC”.

Palavras-chave: Análises Clínicas, Hematologia, Microbiologia, Virologia, SPC-CHUC, Vírus Neurotrópicos, Infeções do SNC.

Introdução

As Análises Clínicas são consideradas exames complementares de diagnóstico e terapêutica que desempenham um papel crucial na prática clínica, fornecendo aos clínicos informações importantes sobre o estado de saúde do indivíduo e auxiliando no diagnóstico, monitorização e tratamento de várias patologias.

Os avanços científicos e tecnológicos permitiram aumentar a diversidade de análises clínicas, originando uma medicina mais personalizada e rápida e uma melhor compreensão da fisiologia humana.

O laboratório de Análises Clínicas desempenha cada vez mais, um papel fundamental na medicina, mas para que esta evolução e confiança por parte da população e dos clínicos continue é necessário garantir a qualidade e fiabilidade dos resultados analíticos através da implementação de sistemas de controlo da qualidade.

O Mestrado em Análises Clínicas surgiu como um projeto formativo de modo a adquirir novos conhecimentos e a colmatar algumas lacunas como Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica.

O estágio curricular foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, que sendo um laboratório que reúne vastas áreas de conhecimento permite conciliar as componentes teórica e prática. Durante o período de estágio, orientado pelo Dr. João Vaz e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos, tive a oportunidade de integrar e colaborar com as diferentes equipas nas áreas de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia e ainda desenvolver um trabalho na área da Virologia, intitulado “Deteção de Vírus Neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC”.

Das quatro áreas onde realizei o estágio serão apenas abordados de um modo mais aprofundado a Hematologia e a Microbiologia, mais concretamente Virologia.

I. Caracterização dos laboratórios de estágio

A caracterização geral do laboratório de estágio tem como objetivo fornecer informações sobre a localização, funcionamento, e organização do laboratório e recursos humanos associados.

O estágio laboratorial foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) estando este dividido em três unidades hospitalares, o Hospital Universitário de Coimbra (HUC), o Hospital Pediátrico (HP) e o Hospital Geral dos Covões (HG). O estágio foi realizado maioritariamente no polo do Hospital Pediátrico e no polo do Hospital Universitário.

O serviço é constituído pelo diretor clínico, o Dr. Fernando Rodrigues, e uma equipa multidisciplinar de médicos patologistas, técnicos superiores de saúde, técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, assistentes técnicos e assistentes operacionais.

I.1. Laboratório do Hospital Pediátrico (HP)

O laboratório do Hospital Pediátrico é constituído pela receção, laboratório de urgência/rotina (que engloba as áreas de Bioquímica e Hematologia), laboratório de Hematologia Molecular e laboratório de Virologia – Biologia Molecular.

Na receção é realizada a integração e triagem no sistema informático das amostras biológicas provenientes de enfermarias do Hospital Pediátrico, dos outros polos (HUC e HG), das maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos ou outros hospitais. Consoante o setor a que se destinam são transportadas em mão ou pelo sistema pneumático até ao respetivo setor.

O laboratório de urgência/rotina procede ao processamento de todas as amostras pediátricas que envolvam Química e Hematologia.

Os laboratórios de Virologia – Biologia Molecular e de Hematologia Molecular recebem amostras de todas as proveniências, consoante a análise pretendida.

Cada setor é composto por salas de trabalho e respetivas salas de validação de resultados.

1.2. Laboratório do Hospital Universitário (HUC)

O laboratório do Hospital Universitário situa-se no Edifício São Jerónimo, sendo o polo principal e o que recebe maior fluxo de amostras biológicas.

O laboratório é constituído pela sala de colheitas, sala de espera, *Corelab* (engloba os setores de Bioquímica e Hematologia) e setores de Microbiologia e Imunologia.

Na sala de colheitas são realizadas aproximadamente 300 flebotomias por dia e rececionadas amostras de urina, fezes ou expetoração. Os tubos e contentores de colheita são devidamente identificados com um código de barras que identifica o nome completo, número de processo do utente, data de realização da colheita e número da amostra biológica, as quais são entregues no *Corelab* em mão.

No *Corelab* é realizada a receção, integração, triagem e distribuição das amostras pelos diferentes setores. Para além da sala de colheitas, as amostras advêm das enfermarias do Hospital Universitário, dos outros polos (HP e HG), das maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos ou outros hospitais. O *Corelab* é constituído por uma cadeia automatizada que encaminha as amostras para os diferentes equipamentos das áreas de química e hematologia para que as amostras sejam processadas com a maior rapidez e eficiência.

O sistema informático, *Clinidata XXI*, é utilizado por todo o Serviço de Patologia Clínica para facilitar a troca de informações entre polos, sejam informações clínicas de cada utente, pedidos de análises ou rastreabilidade de amostras.

1.3. Fases do Processo Analítico

1.3.1. Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica é uma etapa fundamental no processo analítico devido à elevada percentagem de erros associados à colheita, transporte e preparação das amostras biológicas, sendo a primeira fase do processo analítico.

Antes da realização da colheita de sangue é importante verificar a identificação dos dados pessoais do utente e dos parâmetros a analisar, na eventualidade de ser necessário requisitos específicos, nomeadamente, jejum ou a realização de uma determinada dieta.

Durante a flebotomia é importante seguir o Manual de Boas Práticas Laboratoriais, de acordo com os requisitos do Manual de Boas Práticas para que não ocorra interferência na qualidade da amostra, sendo fundamental respeitar a ordem de colheita dos tubos. A ordem inicia-se pelo tubo gel com ativador de coágulo, citrato de sódio, heparina e por fim, o tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA K3).

A identificação das amostras biológicas é sempre realizada por um técnico superior de diagnóstico e terapêutica na presença do doente, sendo verificadas as condições das amostras e atribuído a cada amostra um código de barras alfanumérico como referido anteriormente.

O transporte, receção, integração e triagem de amostras, assim como a colocação das mesmas na cadeia automatizada (polo HUC) ou no sistema pneumático (polo HP). Deste modo, é importante observar as condições de transporte, a adequação do contentor e amostra à análise pretendida, verificar a existência de coágulo em amostras com anticoagulantes, entre outros

I.3.2. Fase Analítica

A fase analítica baseia-se no processamento analítico, sendo fundamental os equipamentos serem sujeitos a manutenções e controlos internos para fornecerem resultados o mais fidedignos possíveis ao utente.

I.3.3. Fase Pós-Analítica

A fase pós-analítica é a terceira e última fase do processo analítico onde ocorre uma validação técnica para verificar se os resultados obtidos se encontram corretos, no caso de haver discrepâncias a amostra é novamente analisada. Posteriormente, é realizada uma validação biopatológica realizada pelo clínico com base na clínica e historial clínico do utente.

I.4. Controlo de Qualidade Interno e Externo

O Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra sendo um centro de referência utiliza controlos internos e externos para avaliar o desempenho dos equipamentos e metodologias, de modo a garantir a fiabilidade e reprodutibilidades dos resultados analíticos.

O **Controlo de Qualidade Interno (CQI)** é um controlo intra-laboratorial, que tem como objetivo verificar possíveis erros sistemáticos ou aleatórios para melhorar a precisão dos resultados laboratoriais. Geralmente são utilizadas preparações com concentrações conhecidas do analito que possuem vários níveis de concentração.

O **Controlo de Qualidade Externo (CQE)** é um controlo inter-laboratorial que se baseia na análise de amostras biológicas enviadas ao laboratório por entidades externas a este. Tem o intuito de avaliar a exatidão dos métodos analíticos utilizados no laboratório em comparação com outros laboratórios que utilizam as mesmas metodologias.

A Patologia Clínica participa em vários programas de CQE, nomeadamente, *National External Quality Assessment Schemes (NEQAS)* e *Randox Internacional Quality Assessment Schemes (RIQAS)*, entre outros.

2. Hematologia

A hematologia dedica-se ao estudo do sangue e patologias associadas, incluindo a análise das células sanguíneas, do sistema hematopoiético e da hemóstase. (1) O estudo hematológico é indispensável no diagnóstico, monitorização, tratamento e prevenção de doenças hematológicas como anemias, leucemias, linfomas, mielomas e distúrbios de coagulação.

Deste modo, é muito importante conhecer os valores de referência de indivíduos saudáveis tendo em atenção o facto de estes se alterarem consoante o género, idade ou etnia.

No serviço de urgência/rotina do HP o hemograma é realizado no contador hematológico *Sysmex XN-I500* de modo automático acoplado ao módulo SP50 que realiza os esfregaços de sangue periférico em todas as amostras, pois o fluxo de amostras é reduzido.

2.1. Hematopoiese

A hematopoiese é o processo pelo qual as células hematopoiéticas formam diferentes células sanguíneas maduras, sendo a medula óssea o principal local onde este processo ocorre a partir dos 6/7 meses de gestação e durante a infância e vida adulta.

A hematopoiese inicia-se a partir de células tronco pluripotentes também denominadas “*stem cells*”, estas células sofrem mitoses e originam em cada divisão uma célula-tronco (autorrenovação celular) e uma célula com capacidade de se diferenciar numa das diferentes linhagens celulares (diferenciação celular), sendo este processo regulado por fatores de crescimento e citocinas.

Durante a diferenciação celular as “*stem cells*” originam células tronco multipotentes, os progenitores hematopoiéticos, que podem ser de linhagem mieloide ou linfoide. Os progenitores de linhagem mieloide permitem a formação de eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e plaquetas (Figura 1). Os progenitores de linhagem linfoide originam os linfócitos (Figura 1).

A regulação da hematopoiese pode variar consoante as necessidades do organismo. Assim, a medula pode promover o aumento de hematopoiese em situações fisiológicas, como o crescimento durante a infância e gravidez ou situações patológicas,

nomeadamente, hemorragias, anemias, infeções e doenças hematológicas (leucemias e mielofibrose).

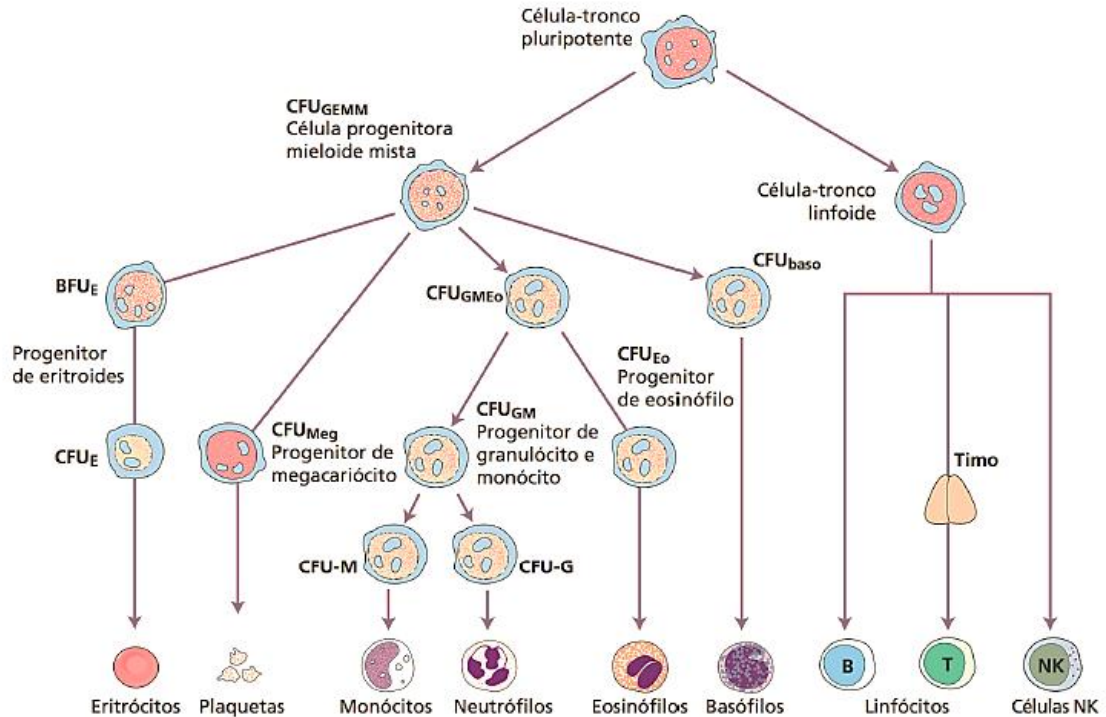


Figura 1: Diagrama esquemático da hematopoiese e diferentes linhagens. Adaptado(2).

2.2. Hemograma

O hemograma é um exame complementar de diagnóstico que permite avaliar qualitativamente e quantitativamente as células sanguíneas consoante o seu tamanho e complexidade morfológica. Este exame é o mais solicitado nos laboratórios de hematologia, devido à facilidade de realização associado a um reduzido volume de amostra e à possibilidade de obter informações relativas à hemóstase e hematopoiese do doente(2–4).

O exame deve ser realizado numa amostra de sangue total colhida em tubo com anticoagulante EDTA-K3, pois este sendo quelante de Cálcio (ião necessário no processo de coagulação) inibe a formação do coágulo sanguíneo através da formação de complexos irreversíveis cálcio-EDTA(1).

O hemograma simples refere-se apenas à contagem de leucócitos totais, plaquetas, eritrócitos e quantificação dos índices eritrocitários no sangue total. O hemograma com leucograma permite uma análise mais detalhada, fornecendo uma contagem

diferencial dos diferentes tipos de leucócitos. Deste modo, este exame pode ser dividido em três partes: eritrograma, leucograma e trombocitograma.

2.2.1. Eritrograma e Alterações eritrocitárias

Eritrograma

Os eritrócitos são células maduras em forma de disco bicôncavo e sem núcleo, resultantes do processo de eritropoiese. Este processo é regulado pela hormona eritropoietina que é sintetizada principalmente nas células renais(2).

O eritrograma é a parte do hemograma que avalia os eritrócitos fornecendo não só informações sobre a contagem de eritrócitos e doseamento da concentração de hemoglobina, como também obtém os índices hematimétricos através de cálculos para auxiliar na caracterização dos eritrócitos, descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros analisados no eritrograma, valores de referência e metodologias utilizadas pelo Sysmex XN-1500 (4)

Eritrograma		
Parâmetros	Valores de Referência	Metodologia
Contagem de eritrócitos (RBC – Red Blood Cell Count)	Homem: $4,5 - 5,9 \times 10^{12}/L$ Mulher: $4,0 - 5,2 \times 10^{12}/L$	Impedância com Focagem Isoelétrica
Hemoglobina	Homem: 13.5 – 17.5 g/dL Mulher: 12.0 – 16.0 g/dL	Método de Sulfato Lauril de Sódio
Hematócrito	Homem: 41 – 53 % Mulher: 36 – 46 %	Impedância com Focagem Isoelétrica
Volume Corpuscular Médio (VCM)	80 - 100 fL (fentolitros)	$VCM = \frac{\text{Hematócrito}}{\text{Número de Eritrócitos}}$
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	26 – 34 pg (picogramas)	$HCM = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Número de Eritrócitos}}$
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	31 – 37 g/dl	$HCM = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Hematócrito}}$
Índice de Variação Eitrocitária (RDW – Red Cell Distribution With)	11.5 – 15.0 %	RDW= (Desvio padrão dos volumes dos eritrócitos/VCM) x100
Reticulócitos (RET)	25 – 105 x10 ⁹ /L	Citometria de Fluxo

Alterações eritrocitárias

Alterações nos parâmetros eritrocitários devem ser avaliados principalmente em crianças, idosos e grávidas devido à elevada incidência de anemia nestas populações.

A anemia é caracterizada pela diminuição da concentração de hemoglobina, que sendo a proteína responsável pelo transporte de oxigénio, afeta a capacidade de transporte de oxigénio aos tecidos do organismo, originando sintomas e eventualmente complicações.

O valor de hemoglobina associado aos índices hematimétricos auxiliam na classificação das anemias em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas, de acordo com os valores de VCM e em hipocrómicas ou normocrómicas, com base nos valores de HCM (3,5).

As anemias microcíticas, hipocrómicas geralmente estão associadas a deficiências de ferro, talassémias, anemia sideroblástica ou intoxicação por chumbo. As anemias normocíticas, normocrómicas são causadas por anemias hemolíticas, hemorragias agudas ou doenças renais. Por fim, a anemia macrocítica é comum em situações de anemia megaloblástica (associada a défice de vitamina B12 e ácido fólico), doença hepática, alcoolismo e hipotireoidismo.

O RDW também é útil neste contexto fornecendo informações relativas à variação do tamanho dos eritrócitos (anisocitose). Consequentemente, um RDW elevado indica uma variação no volume dos eritrócitos em circulação, geralmente associado a anemia microcítica por défice de ferro.

Os reticulócitos são o último estadio antes do eritrócito maduro e apresentam restos de ácido ribonucleico (RNA) e organelos. Em situações de anemia, a resposta reticulocitária expectável resulta num aumento de reticulócitos no sangue periférico consequente ao aumento de eritropoietina que induz a medula óssea a produzir eritrócitos. Contudo, há fatores que diminuem a resposta reticulocitária normal, como por exemplo, doenças da medula óssea, deficiência de ferro e nefropatia (falta de eritropoietina) (2).

Deste modo, a contagem de reticulócitos permite avaliar a capacidade da medula óssea produzir eritrócitos e auxiliar no diagnóstico e etiologia da anemia.

2.2.2. Leucograma e Alterações leucocitárias

Leucograma

Os leucócitos incluem os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Estas células estão envolvidas na imunidade inata e adquirida do organismo desempenhando funções de defesa do mesmo contra agentes externos.

O leucograma é a análise quantitativa dos leucócitos, e em algumas situações é relevante a realização da contagem diferencial de cada população leucocitária (valor absoluto e/ou percentagem), sendo fundamental esta análise devido às diferentes funções que as células desempenham na defesa do organismo (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros analisados no Leucograma, valores de referência num adulto saudável e metodologia utilizada pela Sysmex XN-1500.

Leucograma		
Parâmetros	Valores de Referência	Metodologia
Leucócitos	4.0 – 10.0 ×10 ⁹ /L	Citometria de Fluxo
Neutrófilos	2.0 – 7.0 ×10 ⁹ /L	
Linfócitos	1.0 – 3.0 ×10 ⁹ /L	
Monócitos	0.2 – 1.0 ×10 ⁹ /L	
Eosinófilos	0.02 – 0.5 ×10 ⁹ /L	
Basófilos	0.02 – 0.1 ×10 ⁹ /L	

Alterações leucocitárias

Na avaliação do leucograma é importante ter em atenção as características fisiológicas do indivíduo, gravidez, género e idade.

A condição mais frequente é a leucocitose caracterizada pelo aumento de leucócitos em circulação. Em oposição, a leucopenia é a diminuição do número de leucócitos no sangue periférico. Para compreender qual a possível causa de tais acontecimentos é importante realizar a contagem diferencial de leucócitos.

A neutrofilia, aumento do número de neutrófilos é associada a infeções bacterianas, estados inflamatórios, hemorragias agudas, gravidez, stress e doenças mieloproliferativas. No entanto, a neutropenia é sugestiva de infeção ou doenças autoimunes.

A linfocitose, aumento de linfócitos em circulação é comum em infecções virais, doenças linfoproliferativas e reações de hipersensibilidade. A monocitose, aumento do número de monócitos, está associada a infecções virais ou fúngicas e doenças autoimunes.

A eosinofilia está frequentemente associada a reações alérgicas ou doenças parasitárias e a basofilia a alergias, leucemias e doenças inflamatórias crônicas.

Por vezes, podem ser detetados pelo equipamento leucócitos imaturos, os quais não devem aparecer no sangue periférico em condições fisiológicas normais. Estes leucócitos imaturos são frequentes em situações de sépsis ou neoplasias como, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica aguda e síndromes mielodisplásicas ou mieloproliferativas.

2.2.3. Trombocitograma e Alterações plaquetares

Trombocitograma

As plaquetas são fundamentais para avaliar a hemóstase do organismo. A hemóstase é um mecanismo que mantém a integridade vascular e preserva a integridade da circulação limitando a perda de sangue.

O trombocitograma é parte do hemograma que realiza a análise das plaquetas em circulação no sangue periférico, sendo fundamental estudar a contagem total de plaquetas assim como outros parâmetros, nomeadamente, volume plaquetar médio (VPM) e coeficiente de variação de plaquetas (PDW - *Platelet Distribution Width*) (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros analisados no Trombocitograma, valores de referência e metodologia utilizada pela Sysmex XN-1500.

Trombocitograma		
Parâmetros	Valores de Referência	Metodologia
Contagem de Plaquetas	150 - 450 $\times 10^9/L$	Impedância com Focagem Isoelétrica
Volume Plaquetar Médio (VPM)	8.5 – 12.0 fL	
Coeficiente de variação de plaquetas (PDW)	0.2 – 0.45 %	

Alterações plaquetares

As alterações no número de plaquetas são de elevado interesse clínico, pois elevado número de plaquetas (acima dos valores de referência) estão associados a diversas situações que podem aumentar o risco trombótico, nomeadamente, infeções, hemorragias, cirurgias e traumas, leucemia mieloide crónica e aguda, policitémia vera, entre outras patologias. Em oposição, a diminuição do número de plaquetas está associada a um aumento do risco de hemorragia, causada por situações de quimioterapia, alcoolismo, fármacos e coagulação intravascular disseminada.

2.2.4. Metodologias dos Contadores Hematológicos

O equipamento *Sysmex XN-1500* utiliza a metodologia de impedância com focagem isoeletrica, citometria de fluxo e método de sulfato lauril de sódio (5,6).

O método da impedância com focagem isoeletrica ou princípio de *Coulter* caracteriza-se pela medição de alterações de voltagem aquando da passagem das células uma por uma através de um campo elétrico, sendo estas previamente diluídas numa solução isotónica salina com condutividade elétrica. O número de impulsos gerados causados pelas alterações na voltagem, é diretamente proporcional ao número de células que atravessam o campo elétrico e a amplitude do impulso permite detetar o tipo de célula, eritrócito ou plaqueta(6). O hematócrito é determinado com base neste método, baseando-se na amplitude cumulativa do impulso provocado pelos eritrócitos e sendo considerado um volume percentual relativo de eritrócitos (4).

O método de sulfato de lauril de sódio é um método colorimétrico utilizado para determinar a concentração de hemoglobina na amostra. Deste modo, o equipamento utiliza um reagente que lisa os eritrócitos e de seguida adiciona sulfato lauril de sódio que se liga à hemoglobina e forma um complexo corado. Este complexo atravessa um feixe de luz e é detetado pelo equipamento através da medição da absorvância. A absorvância do complexo é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra (6).

A citometria de fluxo é outra metodologia utilizada pelo equipamento para contagem e diferenciação de leucócitos. Esta técnica utiliza um primeiro reagente que lisa os eritrócitos e plaquetas e um segundo reagente que aumenta a permeabilidade dos leucócitos à entrada de fluorocromos que se ligam ao material genético das

células, DNA ou RNA. Posteriormente, é emitido um laser semiconductor a 633nm (comprimento de onda) que incide sobre a amostra e consoante três ângulos, dispersão de luz frontal (FSC), dispersão de luz lateral (SSC) e fluorescência lateral (SFL), identifica as várias células sanguíneas através de diagramas de dispersão que compara os ângulos a pares (6).

A dispersão de luz frontal avalia o tamanho celular, a dispersão de luz lateral avalia a estrutura celular e a fluorescência lateral fornece informações relativamente à concentração de material genético presente no interior da amostra(6).

2.3. Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço de sangue periférico permite avaliar a morfologia, tamanho e número de células por observação ao microscópio ótico. Este possui elevado interesse clínico no diagnóstico de patologias ou monitorização de doentes com patologias hematológicas.

Por norma, é solicitado um esfregaço quando os resultados do hemograma estão anormais ou quando há suspeita de agregados plaquetares ou leucócitos imaturos. Contudo, apesar de ser sempre realizado o esfregaço como referido anteriormente, a sua observação apenas é realizada pelo patologista de serviço do polo HUC.

O módulo SP50 realiza o esfregaço e a coloração de *May-Grünwald-Giemsa* que permite observar as estruturas basófilas em tons azulados e as estruturas acidófilas em tons arroxeados.

2.4. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é um exame que sugere informações sobre o estado inflamatório do doente ou auxilia na monitorização de uma doença inflamatória.

A VS mede a velocidade de sedimentação dos eritrócitos no plasma durante o período de uma hora. A velocidade depende dos eritrócitos que são carregados negativamente e da concentração plasmática de proteínas que são carregadas positivamente, levando os eritrócitos a depositarem-se mais rapidamente na presença de proteínas.

Este exame utiliza uma amostra de sangue total colhida em EDTA-K3 que é realizado no equipamento VESMatic Cube 30, este realiza a homogeneização da amostra e aguarda 28 minutos para que ocorra a deposição dos eritrócitos.

2.5. Hemóstase

A Hemóstase é um processo fisiológico e complexo que mantém a integridade vascular e evita hemorragias, através do equilíbrio entre a formação e dissolução do coágulo. Este processo é regulado por três fases, hemóstase primária, hemóstase secundária e fibrinólise.

A hemóstase primária inicia-se com a formação do trombo plaquetar no local de lesão vascular, incluindo a vasoconstrição, adesão e agregação das plaquetas em associação com o fator *Von Willebrand*. A hemóstase secundária é o processo de formação do coágulo de fibrina, através da ativação da cascata da coagulação onde ocorre a ativação sequencial de proteínas circulantes, os fatores de coagulação, formando complexos que culminam na formação de trombina, indispensável para a transformação de fibrinogênio em fibrina (Figura 2). Por fim, a fibrinólise na dissolução do coágulo através da digestão da fibrina pelo plasminogênio.

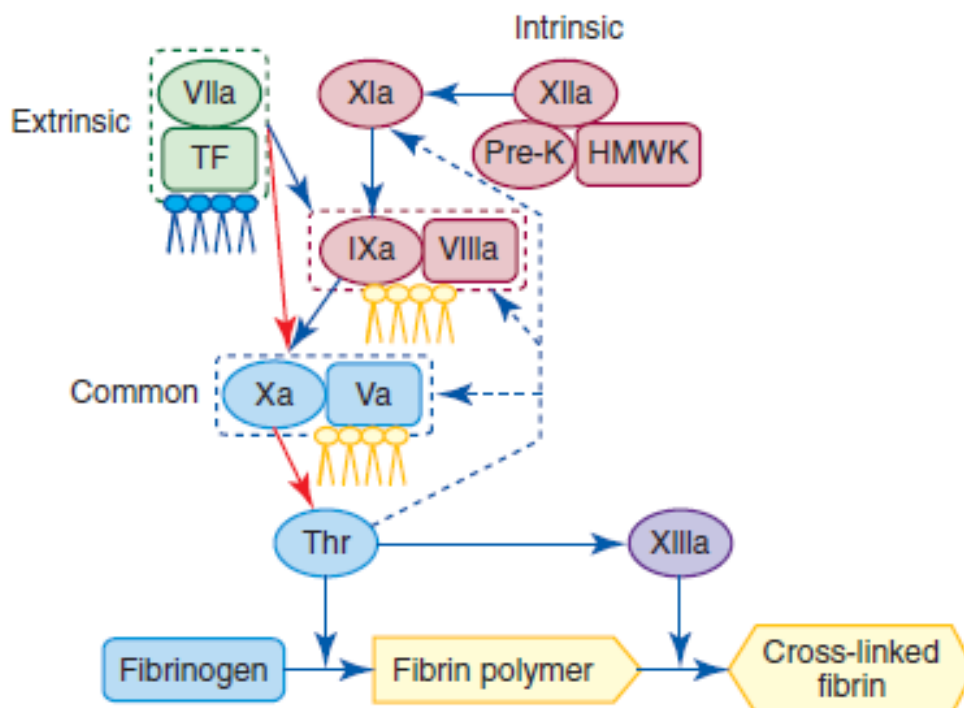


Figura 2: Diagrama esquemático simplificado da cascata da coagulação, com representação da via intrínseca e extrínseca(5).

Os testes de coagulação são de grande importância pois avaliam a função plaquetar e fatores de coagulação, auxiliam no diagnóstico de coagulação intravascular disseminada e deficiência vascular, efetuam um controle terapêutico de anticoagulantes e por fim, avaliam a função hepática pois os fatores (protrombina, V, VIII, X e fibrinogénio) são sintetizados no fígado.

Os principais parâmetros analisados são os tempos de coagulação, nomeadamente o Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) que avaliam o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina. As principais alterações destes parâmetros e respetivas causas podem ser observadas na Tabela 4. No entanto, neste laboratório são ainda avaliados outros parâmetros, nomeadamente, doseamento de Fibrinogénio (QFA), Anticoagulante Lúpico (ITL), D-Dímeros, Tempo de Trombina/Tempo de Reptilase e pesquisa de défices de fatores da cascata da coagulação.

Para realizar estes parâmetros deve utilizar-se plasma colhido em tubo de citrato de sódio, pois sendo o citrato um anticoagulante não ocorre a formação do coágulo e deste modo todos os intervenientes da cascata da coagulação estão disponíveis (após centrifugação) no plasma para serem avaliados. Todos os exames são realizados no equipamento ACL TOP 550 da *Werfen*.

2.5.1. Testes de avaliação da coagulação

Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina baseia-se na medição do tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de tromboplastina avaliando a via extrínseca.

Neste exame é utilizado um reagente que possui na sua composição fator recombinante de tecido humano em associação com fosfolípidos sintéticos, tromboplastina e íões cálcio que ativam a via extrínseca da cascata da coagulação. Assim, este tempo avalia os fatores II, VII, X, fibrinogénio e fator V e auxilia na monitorização de terapêuticas com anticoagulantes orais através da utilização do *International Normalized Ratio (INR)*.

O INR é calculado pelos laboratórios para diminuir as diferenças entre as metodologias e reagentes utilizados nos diferentes equipamentos. Esta fórmula utiliza o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) fornecido pela casa comercial.

$$\text{INR} = (\text{TP doente}/\text{TP indivíduos saudáveis})^{\text{ISI}}$$

Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

O TTPa avalia o tempo de coagulação, após ativação dos fatores de contacto, isto é, através da via intrínseca e comum. Este teste utiliza um reagente com ativador de contacto, fosfolípidos, tampão e cálcio proporcionando uma superfície de contacto ideal para o início da cascata da coagulação.

Deste modo, o TTPa permite a deteção de défices de fatores, nomeadamente, V, VIII, IX, X, XII, protrombina e fibrinogénio e a monitorização de doentes sob terapêutica anticoagulante com heparina.

Doseamento de Fibrinogénio

O fibrinogénio é doseado através da adição de plasma diluído com elevada concentração de trombina para quantificar o tempo de coagulação resultante. O tempo da formação do coágulo é inversamente proporcional à concentração do fibrinogénio, sendo o seu aumento um marcador útil na avaliação de doenças hepáticas, quadros inflamatórios e coagulação intravascular disseminada.

D-Dímeros

Os D-Dímeros são os produtos de degradação da fibrina. Geralmente, estão aumentados em eventos trombóticos ou coagulação vascular disseminada, podendo ser útil também na monitorização de terapêuticas trombóticas.

Anticoagulante Lúpico

O anticoagulante lúpico são autoanticorpos produzidos pelo sistema imunológico contra fosfolípidos e proteínas associadas a eles. Na pesquisa deste autoanticorpo utiliza-se dois testes, um teste de *screening*, denominado teste do veneno de víbora de Russel e um teste confirmatório caso o primeiro teste seja negativo, denominado teste de sílica.

O Anticoagulante Lúpico está aumentado em situações de inflamações, doentes HIV positivos e casos de Lupus Eritematoso Sistémico.

Tempo de Trombina/Tempo de Reptilase

Os tempos de trombina e reptilase avaliam a formação de fibrinogénio em fibrina, sendo o primeiro afetado pela heparina e o último não, pelo que é utilizado como confirmatório. Geralmente, estes testes são solicitados durante transplantes, sendo realizadas colheitas e posteriormente analisadas antes, durante e após a realização do transplante para monitorizar o processo de coagulação.

Pesquisa de défices de Fatores

Os fatores da cascata da coagulação são pesquisados com recurso a um plasma deficiente no respetivo fator que se pretende pesquisar. Se o plasma do doente possuir o fator em causa haverá correção dos tempos de coagulação, se tal não se verificar o doente apresenta défice do respetivo fator.

Os fatores XII, XI, IX e VIII apenas estão envolvidos na via intrínseca, o fator VII apenas está envolvido na ativação da via extrínseca e os fatores X, V e protrombina estão associados as duas vias fazendo parte da via comum.

Quando há défice de fator VIII provavelmente o diagnóstico é Hemofilia A, no caso de défice de fator IX o diagnóstico é a Hemofilia B.

Tabela 4: Aumentos de parâmetros que avaliam a função plaquetar e causas associadas.

Alterações da função plaquetar	Causas
TP ↑ (normal: 10 a 14 segundos)	Deficiência de fatores: II, V, VII, X Anticoagulantes orais
TTPa ↑ (normal: 25 a 37 segundos)	Deficiência de fatores: II, V, VIII, IX, X, XI, XII Grandes transfusões Tratamentos com heparina
TP e TTPa ↑	Deficiência de fatores: II, V e X Hepatopatia grave Anticoagulantes orais Coagulação Intravascular Disseminada

3. Bioquímica

A bioquímica é a ciência que se dedica ao estudo de parâmetros laboratoriais que permitem avaliar a função renal, hepática, pancreática, cardiovascular, lípica e equilíbrio eletrolítico. Os parâmetros químicos permitem acompanhar o estado de saúde do utente em situações de diagnóstico, tratamento, pré e pós-operatório e consultas de acompanhamento de patologias (“*follow-up*”).

O laboratório de urgência/rotina onde se insere o setor de bioquímica do polo HP receciona amostras de soro colhidas em tubo gel com ativador de coágulo, plasma colhido em tubos de heparina-lítio e transportados em gelo, líquido cefalorraquidiano (LCR), urina 24 horas, sumárias de urinas e contentores de fezes.

As amostras de soro e plasma são centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e colocadas no equipamento *Allinity c* ou *Allinity i* consoante a análise solicitada (Tabela 5). As amostras de LCR são também centrifugadas para doseamento de glicose, lactato, cloro e proteínas.

Tabela 5: Equipamentos utilizados no setor de Bioquímica, parâmetros avaliados, metodologias e amostras biológicas processadas.

Equipamento	Parâmetro	Metodologia	Amostra Biológica
Allinity c	<ul style="list-style-type: none">• Amónia• Lactato	Espectrofotometria	Plasma (tubo de heparina-lítio)
	<ul style="list-style-type: none">• Albumina• AST e ALT• Gama-GT• Fosfatase Alcalina• Bilirrubina• Glicose• Azoto ureico• Creatinina• Proteínas Totais• Colesterol, LDH e HDL• Triglicerídeos• Lactato desidrogenase• Paracetamol	Espectrofotometria	Soro

	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas Totais • Creatinina • Microalbuminúria 	Espectrofotometria	Urina
	<ul style="list-style-type: none"> • Sódio, potássio, cloro, cálcio 	Potenciometria	Soro Urina
Allinity i	<ul style="list-style-type: none"> • Procalcitonina • Ferritina 	Quimioluminiscência	Soro
AutionMax SediMax	<ul style="list-style-type: none"> • Sumária de urina • Análise do sedimento urinário 	Fotometria de refletância, Microscopia	Urina
Testes rápidos	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de gravidez • Drogas de abuso • Pesquisa de açúcares redutores • Teste de sulfitos • Mononucleose infecciosa 	Imunocromatografia	Soro Urina
	<ul style="list-style-type: none"> • Pesquisa de vírus gastrointestinais (Norovírus e Rotavírus) 	Imunocromatografia	Fezes

Sendo estas amostras na sua grande maioria amostras pediátricas é importante ter em atenção que por vezes as colheitas podem ser difíceis, seja por maus acessos venosos ou dificuldade em estabilizar a criança. Como consequência, as amostras podem surgir hemolisadas, havendo um aumento nos valores séricos de potássio, LDH e ferro.

As análises menos frequentes, quando solicitadas pelo clínico são enviadas para o laboratório do polo HUC para serem realizadas.

4. Imunologia

A imunologia baseia-se na avaliação da resposta imunológica do organismo com o intuito de diagnosticar infeções ou patologias associadas ao sistema imunológico.

A eletroforese de proteínas séricas (proteinograma) é um dos exames mais solicitados, principalmente quando existem alterações significativas nas proteínas totais. O proteinograma baseia-se na separação das frações das proteínas séricas (albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas) por eletroforese capilar. O intuito deste exame é detetar a presença de bandas clonais que podem estar aumentadas em diversas situações como as exemplificadas na Figura 3.

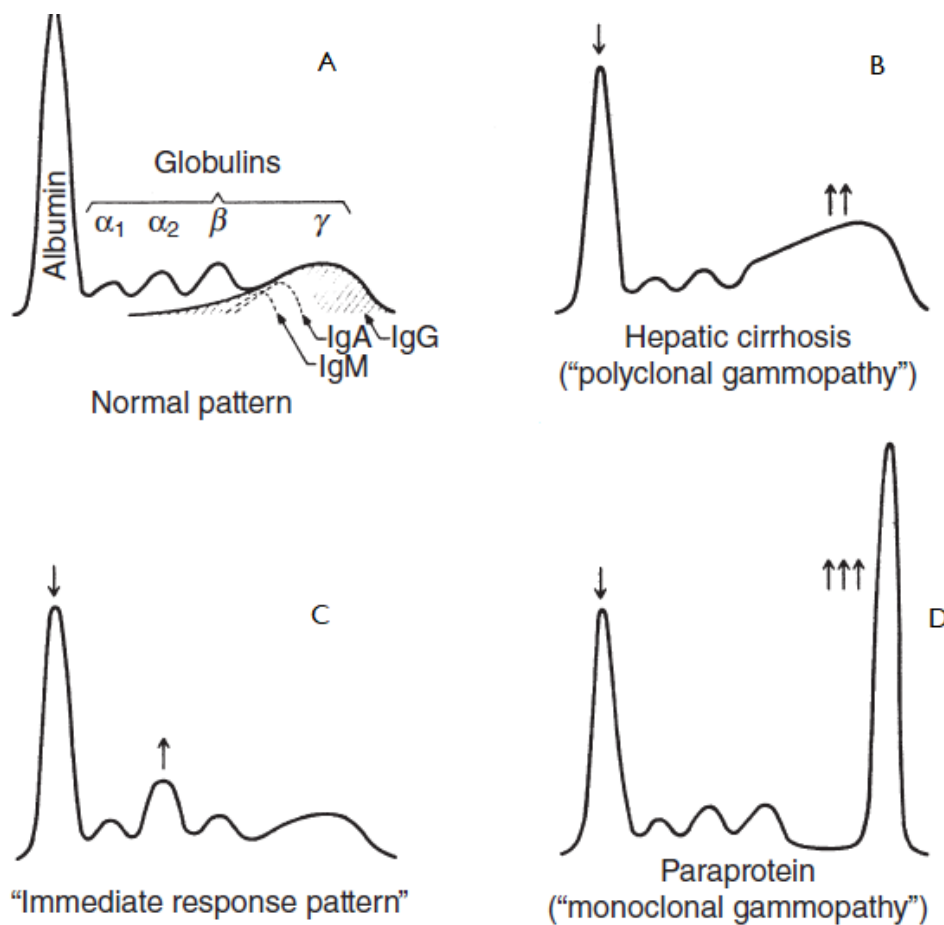


Figura 3: Eletroforeses de proteínas séricas. A: Eletroforese com padrão normal; B: Eletroforese sugestiva de cirrose hepática (gamapatia policlonal); C: Eletroforese com padrão inflamatório; D: Eletroforese sugestiva de paraproteinemia (gamapatia monoclonal). Adaptado (1)

No caso de haver um aumento acentuado em qualquer uma das globulinas, principalmente nas γ -globulinas, realiza-se uma imunofixação no equipamento *Hidrasys 2* (*Sebia*) para pesquisa e caracterização do tipo de imunoglobulina envolvida (IgG, IgA,

IgM, IgD e IgE e cadeias leves *kappa* e *lambda*). O objetivo desta análise é determinar a patologia ou gamapatia policlonal ou monoclonal presente.

No setor de imunologia do SPC-CHUC, no polo HUC, são utilizados vários equipamentos para fazer as análises imunológicas como descrito na tabela abaixo (Tabela 6), sendo as amostras realizadas no equipamento *Allinity* processadas no *Corelab*.

Tabela 6: Equipamentos utilizados no setor de Imunologia, metodologias, parâmetros avaliados e amostras biológicas processadas.

Equipamento	Metodologia	Parâmetros	Amostra Biológica
<i>Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia)</i>	Eletrforese capilar	Proteinograma de proteínas séricas	Soro
<i>Hidrasys 2 (Phadia)</i>	Imunofixação	Pesquisa e caracterização de bandas monoclonais	Soro Urina
<i>Allinity (Abbott)</i>	Turbidimetria	IgG, IgA, IgM, IgE, β 2-microglobulina, C3, C4, Ceruplasmina.	Soro
<i>BN ProSpec (Siemens)</i>	Nefelometria	Haptoglobina, α 1-antitripsina, cadeias livres κ e λ , Subclasses de IgG, ADNase, IgD	Soro Urina
<i>Optilite</i>	Turbidimetria	Complemento total (CH50), Subclasses de IgA, cadeias livres livres κ e λ	Soro
<i>Immuno Cap 250 (ThermoScientific)</i>	FEIA (Imunoensaio fluoroenzimático)	IgE específica, IgG específica alérgenos, Triptase	Soro

Por fim, existem também técnicas manuais para detecção de complemento 2 e/ou complemento 5 em amostras de soro por método de imunodifusão radial. O déficit destas proteínas está relacionado com doenças autoimunes ou infecções recorrentes.

5. Microbiologia

O laboratório de Microbiologia desempenha um papel importante no diagnóstico e controlo de doenças infecciosas, as quais podem ser provocadas por uma ampla variedade de microrganismos, entre eles, bactérias, vírus, parasitas ou fungos.

O setor de microbiologia do SPC-CHUC é constituído por subsectores, nomeadamente, bacteriologia, micobacteriologia, virologia, micologia e parasitologia. Durante o período de estágio tive a oportunidade de conhecer o funcionamento dos subsectores de bacteriologia, micobacteriologia no polo HUC e de virologia no polo HP.

A colheita e transporte de amostras biológicas para este setor deve ser realizada com o maior cuidado de modo a garantir a qualidade da amostra, uma vez que esta pode ser facilmente contaminada com a microbiota do doente na maioria das colheitas, deve ser representativa do local de infeção e deve ser colocada num recipiente adequado e estéril consoante o microrganismo que se pretende pesquisar.

Bacteriologia

A bacteriologia engloba o processamento de produtos biológicos com a finalidade de identificar as bactérias causadoras de infeção em amostras de urina, fezes, sangue, expectoração, aspirado e lavado brônquico, zaragatoa da nasofaringe, exsudato e aspirado de ferida, pus de abscesso, biópsia, exsudato vaginal e líquidos cefalorraquidiano, sinovial, peritoneal e pleural. Por vezes, devido ao contacto de próteses e pontas de cateter com os fluidos e tecidos corporais, estes podem também ser processados.

Na generalidade das amostras e após a sua receção, é realizado um esfregaço para coloração de Gram. O esfregaço permite avaliar a morfologia das bactérias e qualidade da amostra, permitindo fornecer informações e direccionar o estudo da infeção.

Posteriormente, é realizada a cultura das amostras (primoculturas) nos meios de cultura preconizados pelo laboratório, tendo em atenção o tipo de amostra a ser processada e a morfologia observada na coloração de Gram. Estes meios de cultura são subseqüentemente incubados a um tempo e temperatura de incubação ótimos para o crescimento do microrganismo suspeito. Quando as amostras apresentam

crescimento de mais que um microrganismo é necessário realizar o seu isolamento, através da sua repicagem em novos meios de cultura.

Para realizar a identificação do microrganismo isolado o laboratório recorre a metodologia de espectrometria de massa *Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF). Esta técnica utiliza uma matriz de absorção de luz que é colocada sobre a colónia pura, as quais são sujeitas a feixe de luz de alta intensidade que provocam a ionização das proteínas presentes nos microrganismos. Os iões formados são submetidos a um campo eléctrico e separados com base na sua relação massa/carga, gerando um perfil espectral característico do microrganismo em questão. O perfil do microrganismo é comparado com a base de dados do software e geram-se várias correspondências, pelo que o perfil espectral com maior correspondência identifica o microrganismo presente na amostra.

Identificado o microrganismo é necessário realizar o teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) para direccionar a melhor terapêutica possível ao doente. Assim, a sua interpretação é realizada com base nas normas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para avaliar se o microrganismo é suscetível ou resistente a determinado antibiótico.

Micobacteriologia

As micobactérias são bacilos ácido-álcool resistentes do género *Mycobacterium*, sendo a espécie mais comum a *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela tuberculose. Esta micobactéria provoca infeção em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos (casos mais graves), afetando principalmente os pulmões.

As amostras biológicas mais frequentes neste subsector são as amostras do trato respiratório, como expetorações e aspirados broncoalveolares. Estas são sujeitas a coloração de *Ziehl-Neelsen* modificada para observação de micobactérias quando presentes e semeadas em meio de cultura, como por exemplo, o meio de *Löwenstein-Jensen*, onde as colónias de *Mycobacterium tuberculosis* apresentam uma morfologia muito típica. No entanto, antes de semear a amostra é necessário realizar a descontaminação e concentração da mesma para não haver interferência da microbiota do trato respiratório superior.

As micobactérias podem ainda ser identificadas por técnicas de biologia molecular.

5.1. Virologia – Biologia Molecular

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que necessitam dos mecanismos das células hospedeiras para a replicação do seu material genético (DNA ou RNA) e consequentemente produzir novos vírus. Estes são responsáveis por uma ampla diversidade de doenças infecciosas, sendo fundamental compreender as suas vias de transmissão e patogênese viral.

Os vírus possuem tropismo para um determinado tipo de células que associado à resposta do hospedeiro ditam a natureza das manifestações clínicas. Assim, a escolha apropriada da amostra biológica para o diagnóstico de infecção depende do tipo de vírus suspeito e do local anatómico afetado.

No laboratório de Virologia (polo HP) são processadas várias amostras biológicas, nomeadamente, plasma, urina, fezes, medula óssea, LCR, humor aquoso, biópsias, lavados broncoalveolares, zaragoas de lesão, nasofaríngeas, orofaríngeas e genitais, sendo apenas analisadas por técnicas de Biologia Molecular.

O plasma é a amostra biológica mais solicitada para análise e deve ser colhido em tubo gel com anticoagulante EDTA K2, a urina não deve conter ácido bórico e as zaragoas devem ser transportadas em meio de transporte vírico.

5.1.1. Vírus com Importância Clínica

A relevância clínica dos vírus está associada à sua capacidade de causarem doença, a qual pode variar dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da epidemiologia do vírus. Deste modo, ao eleger os métodos complementares de diagnóstico, o laboratório tem em consideração estes fatores para identificar e compreender a presença e o impacto destes agentes infecciosos.

O laboratório pesquisa vírus de várias famílias, nomeadamente, *Orthoherpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Retroviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Hepeviridae*, entre outras famílias que são descritas de seguida.

Família Orthoherpesviridae

Todos os vírus da família *Orthoherpesviridae*, vírus com envelope, de cápside icosaédrica e genoma de dsDNA, após a infecção primária persistem no hospedeiro num estado de latência, podendo reativar-se e desencadear novas infecções (Tabela 7).

Tabela 7: Família *Orthoherpesviridae*, Subfamília, Género, Espécie, Transmissão e Local de Latência dos vírus.

Subfamília	Género	Espécie	Transmissão	Latência
Alphaherpesvirinae	<i>Simplexvirus</i>	<i>Herpes simplex 1</i> (HSV-1)	Contacto com mucosas ou locais da pele lesionadas	Gânglios nervosos sensitivos
		<i>Herpes simplex 2</i> (HSV-2)		
	<i>Varicellavirus</i>	<i>Vírus Varicella-Zoster</i> (VZV)	Inalação de partículas virais	
Betaherpesvirinae	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus Humano (CMV)	Contacto com fluidos corporais, transfusões ou transplante de órgãos	Leucócitos
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvírus Humano 6 (HHV-6)	Contacto com saliva	
Gammaherpesvirinae	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (EBV)	Contacto com saliva ou objetos contaminados	

A deteção dos vírus CMV, EBV, HHV-6 é de grande importância em casos de imunossupressão, principalmente em recetores de transplante, uma vez que a infecção pode levar à rejeição do enxerto ou até complicações mais graves como encefalites ou meningites.

A pesquisa de CMV e VZV é relevante em casos de infecção congénita durante a gravidez, podendo levar a problemas no desenvolvimento do feto ou até à morte fetal.

Qualquer um destes vírus associado a outra patologia ou imunossupressão envolve elevada probabilidade de morbilidade ou mortalidade.

Família Polyomaviridae

Os vírus da família *Polyomaviridae* são vírus sem envelope, de cápside icosaédrica e genoma de dsDNA (Tabela 8), sendo vírus de enorme importância em doentes imunocomprometidos.

Tabela 8: Família *Polyomaviridae*, Género, Espécie, Transmissão e Locais de Latência dos vírus.

Género	Espécie	Transmissão	Latência
<i>Polyomavirus</i>	Vírus BK (BKV)	Não está bem documentada, no entanto supõe-se que pode ser através da via respiratória ou oral (7)	Células epiteliais tubulares renais(7)
	Vírus John Cunningham (JCV)	Suspeita-se que a transmissão ocorra por entrada pela orofaringe (8)	Células progenitoras hematopoiéticas, linfócitos B, células renais(9)

Família *Retroviridae*

Os vírus HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana 1) e HIV-2 (Vírus da Imunodeficiência Humana 2) pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*, sendo vírus envelopados esféricos, com cápside em forma de cone truncado e genoma de ssRNA com intermediário dsDNA (transcrevem informação genética de RNA para DNA).

Estes vírus são causadores de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), no entanto, apresentam algumas diferenças entre si, nomeadamente, na genética, na resposta ao tratamento, na distribuição geográfica e principalmente na patogénese viral. O HIV-1 é mais comum, os doentes possuem cargas virais mais elevadas e está mundialmente distribuído. O HIV-2 caracteriza-se por cargas virais mais baixas relativamente aos doentes HIV-1 e é endémico na África Ocidental, contudo a sua prevalência em Portugal deve-se aos ex-combatentes de guerra quando do seu regresso e à imigração das regiões endémicas para Portugal, especificamente da Guiné-Bissau (10).

Relativamente aos seus modos de transmissão, ambos incluem o contacto sexual desprotegido, contacto com sangue contaminado e transmissão vertical.

A identificação destes vírus é de extrema importância, pois permite direccionar o tratamento mais adequado ao doente, melhorando a sua qualidade e vida e diminuindo o risco de transmissão.

Família *Picornaviridae*

Os vírus da família *Picornaviridae* são vírus desprovidos de envelope com cápside icosaédrica e genoma de RNA (Tabela 9). Geralmente, a transmissão ocorre por via

fecal-oral ou respiratória, podendo causar infeções assintomáticas ou condições que variam desde constipações e febre até infeções graves no coração e sistema nervoso central (11)

Tabela 9: Família Picornaviridae, Género, Espécie e Genoma dos vírus.

Família	Género	Espécie	Genoma
Picornaviridae	<i>Enterovirus</i>	Enterovírus Humano A, B, C e D	RNA
		Rinovírus Humano	RNA
	<i>Parechovirus</i>	Parechovírus Humano	RNA

Famílias Hepdanaviridae, Flaviviridae, Kolmioviridae, Hepeviridae

Os vírus da Hepatite B, C, D e E pertencem respetivamente às famílias Hepdanaviridae, Flaviviridae, Kolmioviridae, Hepeviridae. Estes vírus têm tropismo para os hepatócitos e podem causar hepatites virais (Tabela 10).

O vírus da Hepatite A não é realizado pois é um vírus endémico em países com poucas condições sanitárias, não tendo grande impacto clínico em Portugal.

Tabela 10: Família, Género, Espécie, Genoma, Transmissão e Tipo de infeção dos vírus causadores de Hepatites virais.

Família	Género	Espécie	Genoma	Transmissão	Tipo de infeção
Hepadnaviridae	<i>Orthohepadnavirus</i>	Vírus da Hepatite B (HBV)	DNA	Contacto com fluidos corporais infetados	Hepatite Aguda ou Crónica
Flaviviridae	<i>Hepacivirus</i>	Vírus da Hepatite C (HCV)	RNA	Contacto com sangue infetado	Hepatite Aguda ou Crónica
Kolmioviridae	<i>Deltavirus</i>	Vírus da Hepatite D (HDV)	RNA	Contacto com fluidos corporais infetados	Hepatite Crónica
Hepeviridae	<i>Orthohepevirus</i>	Vírus da Hepatite E (HEV)	RNA	Ingestão de água ou alimentos contaminados. Na Europa, principalmente através do consumo de carne de porco e javali mal cozinhados	Hepatite Aguda e raramente evolui para cronicidade

Famílias Adenoviridae, Coronaviridae, Orthomyxoviridae e Paramyxoviridae

Atualmente são pesquisados vários vírus respiratórios nomeadamente, Adenovírus (B, C e E), Coronavírus, Vírus Influenza, Vírus Sincicial Respiratório (RSV) entre outros (Tabela 11).

Tabela 11: Família, Vírus, Genoma e Transmissão dos vírus causadores de infecções respiratórias.

Família	Vírus	Genoma	Transmissão
Adenoviridae	Adenovírus B, C e E	DNA	Aerossóis com partículas virais
Coronaviridae	SARS-CoV-2 OC43 NL63 229E HKUI	RNA	
Orthomyxoviridae	Vírus Influenza A Vírus Influenza B	RNA	
Paramyxoviridae	Vírus Sincicial Respiratório	RNA	

5.1.2. Técnicas Moleculares

5.1.2.1. Isolamento e purificação de Ácidos Nucleicos

O isolamento de ácidos nucleicos virais presentes nas amostras biológicas é vulgarmente conhecido como “extração”, sendo um método essencial para eliminar as substâncias que eventualmente podem interferir com a *Polimerase Chain Reaction* (PCR), permitindo isolar os ácidos nucleicos DNA e RNA virais.

Esta técnica baseia-se na afinidade das partículas de sílica (carregadas positivamente) pelos ácidos nucleicos (carregados negativamente). Deste modo, a extração de ácidos nucleicos virais passa por várias fases, nomeadamente a lise celular para libertar o material genético, a ligação das partículas de sílica ao material genético e posteriores lavagens sucessivas para que sejam eliminadas as restantes substâncias.

Por fim, a purificação de ácidos nucleicos utiliza um tampão de eluição com características iónicas que permitem separar os ácidos nucleicos das partículas de sílica, resultando na libertação e solubilização do material genético numa suspensão, o eluído.

No laboratório existem dois equipamentos o *EZ-1 Advanced XL* e o *EZ2 Connect*, ambos da *Qiagen* que permitem a extração e purificação de forma automática dos ácidos nucleicos virais.

5.1.2.2. Amplificação por *PCR real time*

Após o isolamento e purificação, os ácidos nucleicos são amplificados e detetados por técnicas de *PCR*. Este procedimento permite amplificar de forma exponencial sequências específicas de material genético, seja DNA ou cDNA (DNA complementar), *in vitro*. O cDNA é o resultado da transcrição inversa de RNA, sendo neste caso, a reação de amplificação denominada de *RT-PCR (Reverse Transcriptase - PCR)*.

A *PCR* é um conjunto de reações cíclicas que consiste em três etapas principais, a desnaturação, o *annealing* e a extensão. A desnaturação é a etapa onde ocorre um aumento de temperatura até aproximadamente 94°C, para que ocorra a separação da dupla cadeia de DNA. O *annealing* e extensão é onde ocorre uma diminuição da temperatura possibilitando a ligação dos *primers* e sondas à sequência alvo que se pretende amplificar e a síntese de cadeias complementares, havendo um aumento de temperatura até cerca dos 72°C.

A *PCR real time* é uma variante da *PCR* que permite visualizar a reação à medida que esta ocorre, devido à utilização de sondas que se ligam especificamente à cadeia de DNA ou *Syber Green* que se ligam inespecificamente à dupla cadeia de DNA.

Existem vários tipos de sondas, entre elas, as sondas de hibridização, os *molecular beacons*, os *primers scorpion* e as sondas de hidrólise (comercialmente designadas por *TaqMan*). As sondas de hidrólise são as mais utilizadas no laboratório e o seu princípio baseia-se na utilização de uma sonda marcada com um fluorocromo, o *Reporter*, na extremidade 5', e uma molécula, o *Quencher*, na extremidade 3'. Na ausência de amplificação do fragmento que se pretende detetar, a sonda permanece intacta e não existe emissão de fluorescência, uma vez que é inibida pelo *Quencher*. Quando há presença do produto amplificado, a sonda é clivada pela enzima DNA polimerase e ocorre separação do *Reporter* e do *Quencher*, como consequência, a emissão de

fluorescência pelo *Reporter* é captada e lida pelo equipamento. A fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado.

Neste laboratório, esta é uma técnica utilizada para pesquisa de vários vírus, nomeadamente, CMV, EBV, BKV, HSV1/2, VZV, HHV-6, Adenovírus, Enterovírus, HIV-1, HIV-2, JCV, Hepatite D e E, entre outros.

Os ácidos nucleicos virais podem ser detetados em sistemas automáticos fechados, como o *Cobas 6800 (Roche Diagnostics)* e o *FilmArray Torch (Biomeriéux)* ou sistemas abertos, nomeadamente, os equipamentos *CFX96 System (Biorad)*, *7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* e *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* que existem no laboratório e requerem intervenção do operador.

De modo a garantir a confiança dos resultados são utilizados controlos, positivo e negativo, e em alguns protocolos também se utiliza um controlo interno para avaliar a eficácia da extração e/ou amplificação.

5.1.2.3. Sistemas automáticos

Cobas 6800 (Roche Diagnostics)

A deteção e quantificação das cargas virais de HBV, HCV, HIV-1, CMV, EBV e BKV é um teste laboratorial que avalia a replicação viral. Deste modo, é muito importante para avaliar a progressão da infeção e a eficácia da terapêutica.

No laboratório de Virologia, a deteção dos ácidos nucleicos destes vírus é realizada no equipamento *Cobas 6800 (Roche Diagnostics)*. Este equipamento é um sistema fechado automático que possui quatro módulos, nomeadamente, o módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. As amostras entram no equipamento e são pipetadas para placas de processamento, assim como os controlos. De seguida, no módulo de processamento é utilizado um reagente que provoca lise celular e aplicadas as partículas de vidro magnéticas que se ligam aos ácidos nucleicos das amostras. Posteriormente, são realizadas lavagens por meio da utilização de ímanes. Por fim, o equipamento coloca um tampão de eluição de modo a obter os eluídos. Estes são pipetados na placa de amplificação e posteriormente é adicionada a mastermix, sendo a placa transferida para

o módulo analítico. O último módulo é onde ocorre a amplificação e a detecção, podendo ser utilizados simultaneamente até cinco canais de detecção diferentes, permitindo a análise de fluorescências em reações multiplex de PCR em tempo real (12).

O equipamento *Cobas 6800* utiliza três controles, negativo, positivo baixo e positivo alto para cada tipo de vírus analisado.

Painéis *FilmArray* (Biomérieux)

Os painéis *FilmArray* são testes de diagnóstico *in vitro* destinados à detecção e identificação simultânea de ácidos nucleicos de bactérias, vírus e fungos em amostras respiratórias, gastrointestinais e LCR.

A metodologia baseia-se na utilização de uma bolsa descartável, que armazena os reagentes necessários para lise celular, extração do material genético, purificação e amplificação. A bolsa é colocada no equipamento *FilmArray Torch*, e este inicia a lise celular com recurso a esferas magnéticas que efetuam uma lise mecânica das membranas celulares e consequente purificação de todos os ácidos nucleicos presentes na amostra através de um íman retrátil que captura ou liberta as esferas magnéticas durante as lavagens. Posteriormente, os ácidos nucleicos purificados são misturados com os reagentes de PCR e é iniciado o PCR *nested multiplex*.

Primeiramente, o equipamento efetua uma PCR *multiplex* e de seguida, efetua uma nova PCR *multiplex* a partir dos produtos de amplificação da primeira PCR.

Por fim, uma câmara capta imagens de fluorescência emitida pelo corante *LCGreen Plus* (incorporado nas cópias de DNA à medida que são criadas durante o ciclo de PCR) e verifica se existem sequências amplificadas para algum dos vírus, gerando um resultado.

5.1.2.4. Teste de Resistência aos antirretrovirais para HIV-1

Um dos principais objetivos do tratamento para os indivíduos portadores de HIV-1 é a supressão da replicação viral, que conseqüentemente torna as cargas virais indetetáveis e origina uma recuperação imunológica, diminuindo as complicações inerentes à infecção.

A terapia com fármacos antirretrovirais (*cART – Combination Antiretroviral Therapy*) pretende inibir algumas etapas importantes do ciclo de vida do vírus, sendo utilizados fármacos inibidores da enzima transcriptase inversa (análogos ou não análogos dos nucleósidos) inibidores da integrase, inibidores da protease ou inibidores de fusão. O tratamento *standard* tem por base a administração de dois análogos de nucleósidos da transcriptase inversa e um não análogo de nucleósidos ou um inibidor da integrase. No entanto, muitas vezes estes fármacos não têm o efeito desejado devido às mutações virais que desencadeiam resistências aos fármacos.

O HIV-1 apresenta uma grande variabilidade genética, característica que advém da alta taxa de erros induzidos pela transcriptase inversa no momento da transcrição, pois esta enzima não tem atividade exonucleotídica 3'-5', ou seja, não possui a capacidade de eliminar os nucleótidos incorporados incorretamente durante a replicação viral. Este facto associado à elevada taxa de replicação do vírus, leva à formação de *quasispecies* (variantes genéticas do vírus). Estas mutações virais afetam principalmente os genes que têm a função de codificar as enzimas do HIV, sendo as enzimas o alvo principal da terapia antirretroviral.

A determinação laboratorial de resistências é realizada através da sequenciação, por metodologia de *Sanger*, das regiões codificantes das enzimas protease, transcriptase inversa e integrase presentes no genoma do HIV. Esta técnica consiste na síntese de cadeias complementares truncadas (terminação da cadeia) a partir do segmento de DNA de cadeia desconhecida, devido à utilização de uma DNA polimerase com capacidade de incorporar 2'-3'-didesoxinucleotidos (ddNTPs), marcados com fluorescência. Estes são análogos dos nucleótidos normais mas que não possuem o grupo OH na posição 3', conseqüentemente, não permitem a formação de uma ligação com outro nucleótido, resultando numa cadeia truncada.

O procedimento inicia-se com o isolamento e purificação do RNA viral, seguida de transcrição inversa e amplificação por PCR. De seguida, realiza-se uma eletroforese

em gel de agarose dos produtos da PCR, utilizando azul de bromofenol como corante e um transiluminador para visualizar as bandas. A eletroforese é útil para verificar a existência ou não de contaminantes e determinar a necessidade de diluição das amostras, através de comparações com o marcador de peso molecular. A diluição apenas é realizada após a purificação com *ExoSap*.

Posteriormente, realiza-se uma purificação enzimática dos produtos de PCR com *ExoSap* para remover excesso de *primers* e nucleótidos não incorporados. Em seguida, realiza-se a sequenciação, com utilização de *primers* e ddNTP's, que são incorporados aleatoriamente, produzindo segmentos de tamanhos diferentes. Por fim, procede-se à purificação com isopropanol das sequências e à sua detecção automática, através de uma eletroforese capilar. A detecção faz-se no equipamento 3130 *Genetic Analyser*, onde as amostras vão migrar do sentido negativo para o positivo, através de um polímero. Cada base possui um fluorocromo que emite fluorescência a um determinado comprimento de onda, diferente em todas as bases, e estas são detetadas por um laser, através dos fluorocromos incorporados. O equipamento procede à “sequenciação”, formando um gráfico denominado eletroferograma.

A sequência obtida é posteriormente comparada com uma sequência de referência do vírus e, através de uma base de dados, a *HIV database Stanford University*, é gerado um relatório que nos informa das mutações da sequência, bem como dos níveis de resistência aos diversos fármacos.

Deteção de Vírus Neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC

Raquel Costa ^{1,2}; Ana Vaz¹; Célia Morais¹; Lurdes Correia¹; Ana Matos²; João Pereira-Vaz¹

1 –Laboratório de Virologia, Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

2-Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal

Resumo

Introdução

Os vírus neurotrópicos encontram-se entre os principais agentes etiológicos de meningites e/ou encefalites infecciosas. Estas infeções dependem da virulência do vírus, assim como do estado imunológico e idade do hospedeiro. O diagnóstico imediato da infeção é essencial devido à rápida progressão, associada a uma elevada taxa de complicações neurológicas e mortalidade.

Objetivo

Avaliar a prevalência de vírus neurotrópicos em diferentes grupos etários, num hospital de referência da região centro de Portugal.

Material e métodos

Foram testadas por PCR em tempo real, um total de 3562 amostras de LCR de indivíduos com suspeita de infeção do SNC, colhidas entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2023. A deteção de ácidos nucleicos foi realizada para vários vírus neurotrópicos, nomeadamente, Vírus Herpes Simplex (HSV) 1 e 2, Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6), Vírus Varicela-Zoster (VZV), Enterovírus (EV), Parechovírus Humano (HPeV) e Citomegalovírus Humano (CMV).

Resultados

Os ácidos nucleicos virais foram detetados em 7% (239/3561) das amostras de LCR. Do total de amostras positivas, o vírus que registou a maior prevalência foi o EV com

35%, seguindo-se o VZV (28%), HHV-6 (14%), HSV-1 (10%), CMV (5%), HSV-2(4%) e HPeV (4%).

Nos grupos etários ≤ 2 Anos e 3-18 Anos o EV foi o mais prevalente. No grupo populacional 19-65 Anos foram mais prevalentes o EV e o VZV. Na população >65 Anos foi mais prevalente a infeção por VZV, seguida de HSV-1 e HHV-6.

Relativamente aos diferentes grupos etários, na população ≤ 2 Anos foi encontrada uma prevalência de infeção de 20%, na de 3-18 Anos de 13%, na de 19-65 Anos de 5% e na >65 Anos de 5%.

Ao longo dos anos a testagem aumentou, à exceção do ano 2020 que se manteve constante e do ano 2023 que apenas existem dados referentes a 2 meses. No entanto, não se verificou um aumento da taxa de deteção na mesma proporção.

Discussão e Conclusão

Os dados apontam uma predominância de meningites/encefalites causadas por EV nos grupos etários ≤ 2 Anos, 3-18 Anos e 19-65 Anos. A elevada prevalência de EV na população pediátrica pode estar relacionada com a transmissão fecal-oral e inalação de aerossóis que facilmente ocorre nestas idades.

A prevalência de VZV encontrada para o grupo etário >65 Anos pode estar relacionada com a diminuição da eficácia do sistema imunológico.

A metodologia de PCR em tempo real permite um rápido diagnóstico de meningites/encefalites infecciosas melhorando o prognóstico clínico.

Introdução

As infecções no Sistema Nervoso Central (SNC) são uma emergência médica que exige um diagnóstico imediato devido à rápida progressão da infecção, associada a uma elevada taxa de complicações neurológicas e mortalidade. (13,14)

Os vírus neurotrópicos encontram-se entre os principais agentes etiológicos de meningites e/ou encefalites infecciosas.

A meningite é definida como uma inflamação das meninges caracterizada por febre, dor de cabeça e rigidez do pescoço. A encefalite é a inflamação do parênquima cerebral associada a disfunção cerebral com alteração do estado mental. A meningoencefalite envolve a inflamação das meninges e do parênquima cerebral (13,15). Estas infecções dependem da virulência do vírus e da sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, da idade e do estado imunológico do hospedeiro, pois doentes crónicos ou imunocomprometidos têm maior risco de desenvolver complicações mais graves. (16,17)

O diagnóstico destas infecções envolve a análise de líquido cefalorraquidiano (LCR) por reação em cadeia de polimerase (PCR) em associação com exames imagiológicos e a avaliação abrangente do histórico do doente, nomeadamente, estado imunológico, história clínica, local de residência, viagens recentes.(15)

Os agentes virais mais comuns são os da família *Orthoherpesviridae* (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV e HHV-6), vírus de DNA que estabelecem latência em diferentes células e os da família *Picornaviridae* (enterovirus e parechovirus)(15).

Os vírus herpes simplex (HSV) originam infecções por HSV-1 que geralmente ocorrem no início da infância e manifestam-se principalmente como lesões orais, enquanto o HSV-2 está associado principalmente a lesões genitais associadas à atividade sexual. O HSV está distribuído mundialmente estando a sua reativação associada a febres, lesões, exposição a radiação ultravioleta, stress emocional, irregularidades hormonais e alterações do sistema imunológico. (18)

O vírus varicela-zoster (VZV) frequentemente causa infecções na infância (varicela) estabelecendo latência nos gânglios sensoriais e podendo originar na idade adulta o herpes-zoster, inclusive em indivíduos imunocompetentes. A disseminação do VZV ocorre por inalação de aerossóis de partículas virais, tendo este vírus uma distribuição mundial. (13,18)

O citomegalovírus humano (CMV) está distribuído mundialmente, sendo que a transmissão materna de CMV pode resultar numa infeção congénita com sequelas graves. A infeção do SNC por CMV em imunocompetentes é rara, no entanto, em doentes imunocomprometidos comporta-se como um patogénico oportunista.

O vírus herpes humano 6 (HHV-6) causa infeção na maioria dos casos antes dos 2 anos de idade, no entanto casos graves de infeção do SNC ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Este vírus tem uma distribuição mundial. (13,19)

Os enterovírus e o parechovírus humano são vírus de RNA de géneros diferentes. No entanto, em ambos os casos, a maioria das infeções ocorrem em crianças devido à transmissão por via fecal-oral ou inalação de aerossóis com partículas virais (13).

Em Portugal, as prevalências destas infeções não estão devidamente documentadas(15). Assim, é essencial compreender as prevalências em diferentes grupos etários com o objetivo de direcionar a pesquisa do agente viral, possibilitando a sua identificação com maior brevidade e instituindo o tratamento antiviral mais adequado, de modo a melhorar o prognóstico clínico.

Material e Métodos

1. Amostragem

Este estudo baseou-se na obtenção de dados epidemiológicos para realização de uma análise retrospectiva no período compreendido entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2023 num hospital de referência da região centro de Portugal.

A amostragem incluiu 3562 amostras de LCR de indivíduos com suspeita de infeção do SNC obtidas em contexto de urgência ou internamento hospitalar.

Os critérios de inclusão compreenderam todos os indivíduos que manifestaram sinais e/ou sintomas neurológicos.

Os dados foram obtidos a partir da base de dados do laboratório e de forma totalmente anónima.

2. Colheita e preparação das amostras

A colheita das amostras foi realizada através de punção lombar no doente, efetuada por um clínico especializado. Subsequentemente, o LCR foi colocado num contentor estéril e enviado ao laboratório para ser analisado.

3. Deteção e identificação de ácidos nucleicos

Todas as amostras foram testadas por PCR em tempo real com recurso a painéis multiplex BioFire® FilmArray® (bioMérieux) específico para meningites/encefalites.

Foram pesquisados ácidos nucleicos dos Vírus Herpes Simplex (HSV) 1 e 2, Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6), Vírus Varicela-Zoster (VZV), Enterovírus (EV), Parechovírus Humano (HPeV) e Citomegalovírus Humano (CMV) (18,20).

4. Análise dos dados

Os dados foram organizados e submetidos a análise estatística utilizando o Microsoft Office Excel. A análise estatística baseou-se na aplicação de estatística descritiva.

Resultados

Para uma amostragem total de 3562 amostras de LCR de suspeita de infecção do SNC, foram detetados ácidos nucleicos virais em 7% (n=239) (Tabela 12).

Relativamente aos diferentes grupos etários, na população ≤ 2 Anos foi encontrada uma prevalência de infecção de 20%, na de 3-18 Anos de 13%, na de 19-65 Anos de 5% e na >65 Anos de 5%, representado na Tabela 12. Das 239 amostras positivas, 58,6% eram de pacientes do sexo masculino.

Tabela 12: Distribuição da amostragem de indivíduos com ou sem infecção viral (PCR) pelos diferentes grupos etários e respetiva prevalência.

Grupo Etário	S/ Infecção viral (PCR)	C/ Infecção viral (PCR)	Total	Prevalência de infecção
≤ 2 Anos	231	56	287	20%
3 - 18 Anos	235	35	270	13%
19 - 65 Anos	1658	89	1747	5%
> 65 Anos	1199	59	1258	5%
Total	3323	239	3562	

Do total de amostras positivas, os vírus que registaram maior prevalência foram os EV com 35%, seguindo-se o VZV (28%), HHV-6 (14%), HSV-1 (10%), CMV (5%), HSV-2 (4%) e HPeV (4%) (Tabela 13).

Nos grupos etários ≤ 2 Anos e 3-18 Anos os EV foram o agente viral mais prevalente.

No grupo populacional 19-65 Anos foram mais prevalentes o EV e o VZV.

Na população >65 Anos foi mais prevalente a infecção por VZV, seguida de HSV-1 e HHV-6 (Tabela 13).

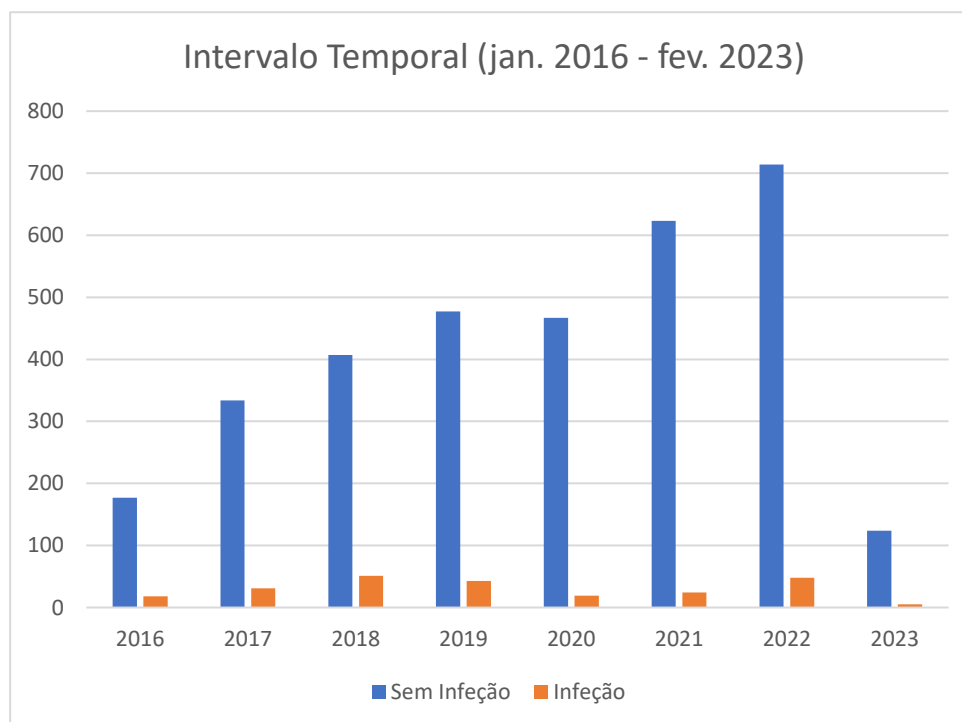
Foram detetadas co-infecções em 8 amostras, sendo na sua maioria infecções HHV-6 e EV.

Tabela 13: Vírus detetados em amostras de LCR de indivíduos com suspeita de infecção no SNC.

Grupo Etário	HSV-1	HSV-2	EV	VZV	HHV-6	HPeV	CMV
≤ 2 Anos	0	2	33	1	12	10	0
3 - 18 Anos	2	0	29	4	2	0	0
19 - 65 Anos	6	3	21	21	5	0	6
> 65 Anos	18	5	1	43	16	0	7
Total	26 (10%)	10 (4%)	84 (35%)	69 (28%)	35 (14%)	10 (4%)	13 (5%)

Ao longo dos anos a testagem aumentou gradualmente, à exceção do ano 2020 que se manteve constante e do ano 2023 que apenas existem dados referentes a 2 meses. No entanto, não se verificou um aumento da taxa de deteção na mesma proporção (Figura 4).

Figura 4: Intervalo temporal (janeiro de 2016 a fevereiro de 2023) das amostras de LCR de suspeita de infecção do SNC.



Discussão e Conclusões

O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de infeções do SNC causadas por vírus neurotrópicos e a sua distribuição pelos diferentes grupos etários, com base na análise de amostras de LCR por metodologia de PCR em tempo real com recurso a painéis multiplex BioFire® FilmArray®.

Os resultados demonstraram uma taxa de deteção de ácidos nucleicos virais de 7% sugerindo uma relevância clínica significativa. Este valor não é inesperado, pois em todo o mundo o agente etiológico de um número significativo de infeções no SNC permanece desconhecido (15).

Segundo os resultados obtidos, os enterovírus foram os agentes virais mais prevalentes (35%) de todas as amostras positivas, estando este facto em concordância com um estudo prévio realizado nos EUA(15,17).

A distribuição dos vírus neurotrópicos variou entre os diferentes grupos etários. Nos grupos etários ≤ 2 anos e 3-18 anos, os enterovírus foram os mais prevalentes, o que é consistente com a transmissão fecal-oral e a exposição a aerossóis, comuns em ambientes escolares e creches (13). No grupo populacional 19-65 anos, além dos enterovírus, o VZV também foi significativamente encontrado. Essa faixa etária pode refletir a ocorrência de reativação do VZV em adultos que podem levar a herpes-zoster durante a vida adulta. Na população com mais de 65 anos, a infeção por VZV foi a mais prevalente, seguida por HSV-1 e HHV-6. Esses resultados podem estar relacionados ao processo de imunossenescência com consequente declínio da imunidade neste grupo etário.

A utilização de painéis multiplex de PCR permitiu uma rápida obtenção dos resultados com um reduzido volume de amostra, tornando-se uma ferramenta de diagnóstico muito útil. Contudo, num estudo em norte americano, as taxas de deteção aumentaram ao longo dos anos o que não se verificou no presente estudo. Esta diferença pode ser devido a diferenças epidemiológicas dos vírus ou limitações do presente estudo, nomeadamente, devido à falta de análise dos dados relativos a outros vírus causadores de infeções no SNC como o EBV, JCV, entre outros.

Outras limitações referentes ao respetivo estudo devem ser consideradas, tais como, a amostragem não ser representativa de toda a população portuguesa, pois as amostras são de doentes de um único hospital.

Relativamente ao aumento da testagem ao longo do tempo, este pode dever-se às melhorias de automação e dos protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de ácidos nucleicos virais.

Ao longo dos anos a testagem aumentou gradualmente, à exceção do ano 2020 que se manteve constante e do ano 2023 que apenas existem dados referentes a 2 meses. No entanto, não se verificou um aumento da taxa de deteção na mesma proporção

Em conclusão, a compreensão das prevalências em diferentes grupos etários é importante para direccionar a pesquisa e identificação do agente viral, de modo a obter resultados mais rápidos e instituir a terapêutica antiviral mais adequada, visando a redução de complicações e mortalidade. Estudos adicionais são necessários para uma melhor caracterização epidemiológica dessas infeções em Portugal.

Publicação: Durante a elaboração deste trabalho, foi ainda submetido e aceite na forma de poster no Congresso “Pandemias na Era da Globalização e X Congresso Nacional de Virologia” em maio de 2023 (Figura 5)

Figura 5: Poster intitulado “Deteção de vírus neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC”

Pandemias na Era da Globalização

Deteção de vírus neurotrópicos em indivíduos com suspeita de infeção no SNC

Raquel Costa¹; Ana Vaz¹; Célia Morais¹; Lurdes Correia¹; Ana Matos²; João Pereira-Vaz¹

1 – Laboratório de Virologia, Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal
2- Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal



ID:49

Introdução

Os vírus neurotrópicos encontram-se entre os principais agentes etiológicos de meningites e/ou encefalites infecciosas. Estas infeções dependem da virulência do vírus assim como, do estado imunológico e idade do hospedeiro. O diagnóstico imediato da infeção é essencial devido à rápida progressão, associada a uma elevada taxa de complicações neurológicas e mortalidade.

Objetivo

Avaliar a prevalência de vírus neurotrópicos em diferentes grupos etários, num hospital de referência da região centro de Portugal.

Metodologia

Foram testadas por PCR em tempo real, um total de 3561 amostras de LCR de indivíduos com suspeita de infeção do SNC, colhidas entre janeiro de 2016 e fevereiro de 2023. A deteção de ácidos nucleicos foi realizada para vários vírus neurotrópicos, nomeadamente, Vírus Herpes Simplex (HSV) 1 e 2, Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6), Vírus Varicela-Zoster (VZV), Enterovírus (EV), Parechovírus Humano (HPeV) e Citomegalovírus Humano (CMV).

Resultados

Os ácidos nucleicos virais foram detetados em 7% (239/3561) das amostras de LCR. Do total de amostras positivas, o vírus que registou a maior prevalência foi o EV com 35%, seguindo-se o VZV (28%), HHV-6 (14%), HSV-1 (10%), CMV (5%), HSV-2 (4%) e HPeV (4%). Nos grupos etários ≤2 Anos e 3-18 Anos o EV foi o mais prevalente. No grupo populacional 19-65 Anos foram mais prevalentes o EV e o VZV.

Na população >65 Anos foi mais prevalente a infeção por VZV, seguida de HSV-1 e HHV-6. Relativamente aos diferentes grupos etários, na população ≤2 Anos foi encontrada uma prevalência de infeção de 20%, na de 3-18 Anos de 13%, na de 19-65 Anos de 5% e na >65 Anos de 5%.

Grupo Etário	S/ Infeção	C/ Infeção	Total	Prevalência de infeção
≤ 2 Anos	231	56	287	20%
3 - 18 Anos	235	35	270	13%
19 - 65 Anos	1658	89	1747	5%
> 65 Anos	1199	59	1258	5%
Total	3323	239	3562	

Grupo Etário	HSV-1	HSV-2	EV	VZV	HHV-6	HPeV	CMV
≤ 2 Anos	0	2	33	1	12	10	0
3 - 18 Anos	2	0	29	4	2	0	0
19 - 65 Anos	6	3	21	21	5	0	6
> 65 Anos	18	5	1	43	16	0	7
Total	26 (10%)	10 (4%)	84 (35%)	69 (28%)	35 (14%)	10 (4%)	13 (5%)

Conclusões

Os dados apontam uma predominância de meningites/encefalites causadas por EV nos grupos etários ≤2 Anos, 3-18 Anos e 19-65 Anos. A elevada prevalência de EV na população pediátrica pode estar relacionada com a transmissão fecal-oral que facilmente ocorre nestas idades. A prevalência de VZV no grupo etário >65 Anos pode estar relacionada com a diminuição da eficácia do sistema imune. A metodologia de PCR em tempo real permite um rápido diagnóstico de meningites/encefalites infecciosas melhorando o prognóstico clínico.



Pandemias na Era da Globalização – 10º Congresso & VI Congresso Nacional de Virologia
Hotel Vila Galé Coimbra – 10, 11 e 12 de maio 2023

Conclusão

O mestrado de Análises Clínicas demonstrou ser um complemento fundamental para o meu percurso laboral, despertando curiosidade e interesse por áreas que até então tinha interesse.

No SPC-CHUC tive a oportunidade de ver as realidades de dois hospitais de referência, o HUC e o Hospital Pediátrico, que apresentam distintos fluxos de trabalho e populações em estudo que requerem diferentes acompanhamentos.

No laboratório tive a oportunidade de observar a aplicação de tecnologias emergentes com conseqüente aumento da fiabilidade, reprodutibilidade e robustez dos resultados. Contudo, apesar da automatização das técnicas é necessária conhecer os fundamentos teóricos para detetar e corrigir eventuais erros, assim como interpretar os resultados com espírito crítico, rigor, exatidão.

O período de estágio contribui para compreender as diferentes áreas das Análises Clínicas e da importância de as correlacionar, de modo a garantir aos clínicos a confiança nos resultados e o auxílio na tomada da decisão clínica, e também compreender os profissionais de saúde das áreas de Análises Clínicas necessitam de acompanhar a constante mudança e evolução.

Bibliografia

1. McPherson RA, Dalton Professor HB, Pincus MR. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods 22 nd EDITION. 2011.
2. Hoffbrand A., Moss P. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. 2013.
3. Kaushansky K, Lichtman MA, T.Prchal J, M.Levi M, W.Press O, J.Burns L, et al. Williams Hematology. 9th Editio.
4. Rodak B, Fritsma G, Keohane E. Hematology - Clinical Principles and Applications. Vol. Fourth Edition. 2012.
5. Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematology: Clinical principles and applications. 4th Editio. Elsevier. 2007. Available from: <https://degruyter.com/view/j/labm.2007.31.issue-6/jlm.2007.040/jlm.2007.040.xml>
6. Almeida S. Princípios tecnológicos Sysmex da série XN e suas aplicações clínicas. 2018.
7. Lamarche C, Orio J, Collette S, Senécal L, Hébert MJ, Renoult É, et al. BK Polyomavirus and the Transplanted Kidney: Immunopathology and Therapeutic Approaches. Vol. 100, Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 2276–87.
8. Cortese I, Reich DS, Nath A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and the spectrum of JC virus-related disease. Vol. 17, Nature Reviews Neurology. Nature Research; 2021. p. 37–51.
9. Keykhosravi S, Khosravi M, Shenagari M, Hasan-alizadeh E, Mosadegh M, Noori Goodarzi N, et al. Determining host factors contributing to the reactivation of JC virus in kidney transplant recipients. Virol J. 2022 Dec 1;19(1).
10. Barin F, Cazein F, Florença L. Prevalence of HIV 2 and HIV 1 group O infections. 2007;
11. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. Journal of General Virology. 2017 Oct 1;98(10):2421–2.
12. Roche. Guia de utilizador - cobas ® 6800/8800 Systems.
13. Bystritsky RJ, Chow FC. Infectious Meningitis and Encephalitis. Vol. 40, Neurologic Clinics. W.B. Saunders; 2022. p. 77–91.

14. Hatanpaa KJ, Kim JH. Neuropathology of viral infections. In: Handbook of Clinical Neurology. Elsevier B.V.; 2014. p. 193–214.
15. Dupuis M, Hull R, Wang H, Nattanmai S, Glasheen B, Fusco H, et al. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. J Med Virol. 2011;83(12):2172–81.
16. Burrell C, Howard C, Murphy F. Fenner and White's Medical Virology. Vol. Fifth Edition, Fenner and White's Medical Virology. Elsevier; 2017.
17. Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: A review. Vol. 398, Journal of the Neurological Sciences. Elsevier B.V.; 2019. p. 176–83.
18. Biomérieux. BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel - Instruções de utilização. 2022.
19. Venkatesan A, Murphy O. Encefalite Viral.
20. Biomérieux. BioFire FilmArray Torch - Manual do operador. 2022.