



Faculdade de ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Curso: Licenciatura em Biologia e Saúde

Relatório de Estágio

**Teste de carga viral HIV (HIVVL) realizado no laboratório do centro de saúde da
Universidade Eduardo Mondlane (Lab. CS-UEM).**

Autor:

Rangel Carlitos Américo

Maputo, Dezembro de 2024



Faculdade de ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Curso: Licenciatura em Biologia e Saúde

Relatório de estágio

Local do estágio: Laboratório do Centro de saúde da Universidade Eduardo Mondlane (Lab. CS-UEM)

Tema:

Teste de carga viral HIV (HIVVL) realizados no laboratório do centro de saúde da Universidade Eduardo Mondlane (Lab. CS-UEM).

Supervisor no Laboratório:

dr. Airone Artur Ringuissa Lc.

Supervisor:

Dr. Armando Aurélio Mabasso Msc.

I. Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Universidade Eduardo Mondlane pela oportunidade que me concedeu de estudar em uma das suas faculdade e pela bolsa de estudos, agradeço também de coração aos docentes que me inspiraram deram o seu melhor para difundir o conhecimento que tenho hoje, agradeço aos colegas (Arfa Bachir, Ribeiro Pipino, Faruque Sumindila, Airone Ringuissa, Marques Adriano, Mateus Aini) que fizeram do período dos meus estudos o melhor de todos que tive, se tornaram parte da minha vida irmãos de pais diferentes companheiros da batalha árdua.

Agradeço a minha família em especial a minha mãe aos meus irmãos pela paciência e esperança que depositaram em mim, dizer que esse sentimento transmitido por vós foi como um combustível que me fazia ir em frente em todas as dificuldade do meu percurso, dizer que a minha é imensa pois tudo que fiz, faço e farei sempre será por minha família. Agradecer também ao centro de saúde da Universidade Eduardo Mondlane pela oportunidade que concedeu-me de realizar o meu estágio profissional e o aperfeiçoamento do meu conhecimento teórico. E a todos que talvez não mencionei cá, que directa e indirectamente tiveram um papel importante no meu percurso dizer muito obrigado por tudo e todo aprendizado que tive. Sem mais nada a declarar só me resta a dizer adeus e muito obrigado do fundo do meu coração, gratidão.

II.* **Declaração de honra*

Juro por minha honra que o conteúdo deste relatório de estágio foi por mim escrito e que toda informação adquirida em outras fontes foram devidamente citadas e declaro que toda informação contida neste documento é verdadeira.

III. Resumo

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública. A SIDA é uma doença causada pelo vírus de Imunodeficiência Humana (HIV em inglês). Indivíduos com SIDA possuem uma gama de manifestações clínicas desde agudas a graves, sendo estas últimas associadas a morte dos pacientes. Portanto, como forma de garantir a melhor eficácia do tratamento anti-retroviral é necessário uma monitoria periódica do paciente. Em 2013, a Organização Mundial da Saúde recomendou o uso de testes de carga viral como forma eficaz de monitoria destes pacientes com SIDA. A carga viral determina a taxa de adesão ao tratamento assim como a resistência do vírus aos fármacos.

O objectivo desse estágio foi de conhecer os testes de carga viral HIV (HIVVL) realizados no laboratório do centro de saúde da Universidade Eduardo Mondlane (Lab. CS-UEM), desde a recepção de amostras, triagem, cadastro no SIL (Sistema de informação laboratorial), armazenamento das amostras, processamento e emissão dos resultados, o equipamento usado em carga viral. Durante o período de Abril a Setembro de 2019 que estive a estagiar no Lab. CS-UEM, aprendi como usar os equipamentos essenciais na determinação da carga viral como o Cobas ampliprep e o Cobas taqman. O estágio foi muito útil porque permitiu que adquirisse a parte prática dos conhecimentos teóricos adquiridos durante as aulas. Contudo existem aspectos importantes a melhorar observado durante o período de estágio no monitoramento, sendo um dos principais o longo período de espera dos resultados, causando um atraso no atendimento do paciente, interacção entre o laboratório e o paciente sendo importante pois ajuda o paciente no seguimento do tratamento, assunto como a demora dos resultados os motivos.

IV. Siglas

CAP- Cobas Amplipep

CTM- Cobas TaqMan

SPU- Sample Processment Unit

DBS- Dried Blood Spot

SIL- Sistema de Informação Laboratorial

HIV- Human Immunodeficiency Virus

HIVVL- Human Immunodeficiency Virus Viral Load

CV- Carga Viral

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

LAB-UEM- Laboratório da UEM

CS-UEM- Centro de Saúde da Universidade Eduardo Mondlane

UAT-Unidade de Testagem e Aconselhamento

TARV- Tratamento Anti-retroviral

MISAU- Ministério da Saúde

SNS- Sistema Nacional de Saúde

SIDA- Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

PNAL- Programa nacional de Acreditação Laboratorial

DCL- Departamento Central de Laboratórios

DNAM- Direcção Nacional de Assistência Médica

FSR- Formulário de Solicitação de Resultado

Índice

I.	Agradecimentos	3
II.	Declaração de honra	4
III.	Resumo	5
IV.	Siglas.....	6
1.	Apresentação e caracterização da unidade de estágio	1
2.	Programa de estágio.....	2
3.	O apoio concedido ao estudante por parte da unidade de estágio.	3
4.	Revisão bibliográfica.....	4
5.	Actividades desenvolvidas	6
5.1.	Fase de Pré-análise/Pré-Analítica.....	6
5.1.1.	Recepção de amostras	6
5.1.2.	Triagem das amostras	7
5.1.3.	Cadastro das amostras de Carga Viral no sistema informático (SIL).....	7
5.1.4.	Conservação das amostras	8
5.2.	Fase de Análise/ Analítica.....	9
5.2.1.	Preparação das amostras para o processamento.....	10
5.2.2.	DBS (dried blood spot)	10
5.2.3.	Plasma.....	12
5.2.4.	Carregamento das amostras ao equipamento	13
5.3.	Fase pós-análise/pós-analítica	13
6.	Prespectivas Críticas.....	Error! Bookmark not defined.
09.	Referências Bibliográficas	18
Anexo: 01.....		20
Anexo: 02.....		21
Anexo: 03.....		22
Anexo: 04.....		23
Anexo: 05.....		24
Anexo: 06.....		25
Anexo: 07.....		26
Anexo: 08.....		27
Anexo: 09.....		28
Anexo: 10.....		29
Anexo: 11.....		30
Anexo: 12.....		31

Anexo: 13.....	32
Anexo: 14	33

1. Apresentação e caracterização da unidade de estágio

O centro de Saúde da Universidade Eduardo Mondlane (CS-UEM) localiza-se no campus principal Universitário, Av. Jullius Nyerere, próximo dos escritórios da Direcção dos Serviços Sociais e do complexo colmeia que sita no mesmo recinto das residências 6, 7 e 9.

O centro é do nível 1 e presta serviços a comunidade universitária (estudantes, CTA, docentes e investigadores), a população que mora a redores do campus são beneficiados com os serviços dados pelo centro. Os serviços prestados pelo centro são: clinica geral, estomatologia, psicologia, radiologia, UATS e análises laboratoriais. O laboratório está separado por sectores, tendo um sector de colheita e recepção de amostras, sector de preparação, armazenamento e conservação de amostras, um sector de hematologia e bioquímica, sector de microbiologia e o sector da Biologia molecular.

O sector de Biologia molecular encontra-se no laboratório clínico do centro de saúde da Universidade Eduardo Mondlane (Lab. CS-UEM), o sector de Biologia Molecular ou como é também denominado internamente de Laboratório de biologia molecular, está equipado por duas (02) plataformas electrónicas que usam o princípio da reacção da polimerase em cadeia (*PCR*), sendo uma plataforma de extracção o *cobas aplied* e a de amplificação o *cobas TaqMan*. O laboratório disponibiliza de uma cabine de biossegurança, uma bancada de trabalho e um sistema informático de gestão laboratorial o DISA lab. O laboratório conta também com técnicos competentes para o uso dos equipamentos e sistemas do laboratório. O laboratório conta com um responsável do laboratório (chefe), um gestor de qualidade, gestor de biossegurança e um gestor de stock. Conta com dois administrativos e um agente de limpezas.

O sector de biologia molecular realiza testes de carga viral em amostras de pacientes em tratamento anti-retroviral (pacientes em TARV) vindo de vários centros da província de Maputo Cidade, sendo um laboratório de referência não realiza colheitas sendo assim só recebe amostras de Plasma e DBS (veja o anexo 03), para carga viral.

2. Programa de estágio

O programa de estágio foi dividido em três meses, com actividades semanais, desde a integração e avaliação de competências e a integração das actividades diárias até ao fim do estágio, a tabela abaixo indica o período e as actividades. Este programa é somente do sector de Biologia Molecular que é sector de interesse do estágio apesar de no período de estágio ter passado por vários outros sectores como a colheita de amostras para exames de Bioquímica e Hemograma e Urinálise, registo e cadastro das mesmas, sector de Hematoquímica e Parasitologia. O resto dos meses não indicados na tabela fora realizado actividades de rotinas.

Tabela 01: Programa do estágio

Mês	Actividades semanais
Abril	<u>Biologia Molecular:</u> Familiarização com o Sector de B. Molecular. Leitura da documentação relacionada (Treino e assinatura dos documentos); <i>Apenas leitura e acompanhamento.</i>
	<u>Biologia Molecular:</u> Acompanhamento das actividades: preparação de amostras/ reagentes/ controlos, calibração e manutenção dos equipamentos, registos, validação de resultados. <i>Apenas leitura e acompanhamento.</i>
	<u>Biologia Molecular:</u> Calibração e manutenção dos equipamentos; <i>Apenas leitura e acompanhamento.</i>
	<u>Biologia Molecular:</u> Validação de resultados; <i>Apenas leitura e acompanhamento.</i>
Maio	<u>Biologia Molecular:</u> Preparação de amostras. Prática.
	<u>Biologia Molecular:</u> Preparação de reagentes e controlos, Prática.
	<u>Biologia Molecular:</u> Calibração e manutenção dos equipamentos, registos, validação de resultados. Prática.
	<u>Biologia Molecular:</u> Processamento das amostras. Prática
	<u>Biologia Molecular:</u> Processamento das amostras. Prática

Junho	<u>Biologia Molecular:</u> Integração nas actividades de acordo com a descrição de tarefas, <i>Assinatura da descrição de tarefas, Inclusão nas escalas de Trabalho</i> <i>Realização das tarefas diárias até ao fim do estágio</i>
-------	--

3. O apoio concedido ao estudante por parte da unidade de estágio.

De uma forma, geral o centro de saúde da universidade Eduardo Mondlane deu o seu apoio ao estudante desde o início ao fim do seu estágio em quase tudo que foi necessário para realização do mesmo.

O apoio vindo por parte da unidade de estágio foi, a assistência técnica, por parte dos técnicos delegados pelo responsável do laboratório para a supervisão do estudante, apoio no material de biossegurança em suas actividades técnicas como batas, luvas, tocas, cobertores de sapatos entre outros, treinos internos, uso de equipamentos necessários no decurso do estágio, apoio técnico. O centro por sua vez deu apoio ao estudante no que diz respeito a alimentação, dando o pequeno-almoço.

O estudante tinha o direito por sua vez de participar em actividades internas do centro de saúde tais como, feiras de saúde, dias abertos e palestras, aumentando assim o seu conhecimento do âmbito clínico. O laboratório ofereceu ao estudante a oportunidade de exercer funções complementares que não interferissem no seu estágio tais como, gestão do stock, controle da temperatura interna do ambiente laboratorial, gestão de biossegurança e de riscos, gestão de qualidade que ajudou ao estudante ter mais conhecimento de gestão do laboratório de análises clínicas.

4. Revisão bibliográfica

A infecção por HIV possui uma gama de apresentações clínicas desde a fase aguda até a fase grave, sendo em indivíduos não tratados o seu período de incubação é em média de dez anos (Tanuri et al, 2013). Iguais a outras viroses, o HIV também é acompanhado de vários sintomas conhecidos em outras linguagens como Síndrome retroviral aguda ou SRA que podem se manifestar dentro de uma a três semanas, pois a exposição (Tanuri *et al*; 2013).

Segundo Tanuri e seus colaboradores apontam as adenopatias, faringites, mialgias e cefaleias sendo os principais sintomas que aparecem nas primeiras semanas e claro os danos psicológicos causados pelo medo que o indivíduo tem no processo do conhecimento do seu estado. A África é considerada o continente mais afectado pelo HIV/SIDA, sendo que de todas mortes pela infecção relatadas cerca de mais de 70% são da África subsaariana, em 2005 foi estimada uma prevalência de cerca de 8% (Joireman, 2006). Em países como Etiópia, África do Sul, Quênia e Nigéria pelo menos 2 milhões de pessoas estão infectadas, sendo em Botswana a cada 4 adultos 1 está infectado, infelizmente o género feminino é a maior parte da população infectada pelo HIV na África, sendo cerca de 83% vivendo com HIV na África subsaariana (Joireman, 2006). Porém a taxa de infecção pelo HIV não é igual em todos os países Africanos, a OMS divide o continente em regiões sendo a África austral com mais prevalência, tendo crescido em 20.3% em 1998 e cerca de 25% em 2002.

Moçambique sendo um país da África não se torna uma excepção no que diz respeito a infecção pelo HIV, constituindo um grande desafio para o país no seu todo e para o sistema sanitário nacional (Bastosk, 2010). Sendo o MISAU a entidade chave que rege todo o sistema nacional de saúde (SNS) vem tomando medidas para minimizar os impactos que o HIV proporciona no país (Bastosk, 2010).

Sendo um enorme desafio para o país e o Sistema nacional de saúde, o MISAU tem vindo a tomar medidas para acautelar o impacto da pandemia no país que na maioria das vezes acomete a população na idade reprodutiva, adolescentes e jovens (Bastos *et all* 2010). Para garantir a melhor eficácia do tratamento anti-retroviral é necessário uma monitoria periódica do paciente em tratamento para identificar a taxa de adesão do paciente ao tratamento e a necessidade de troca de linhagem de tratamento (OMS, 2019).

Foi recomendado em 2013 pela Organização Mundial da Saúde (OMS-WHO) o uso de testes de carga viral como forma eficaz de monitoria, para confirmar a não adesão por parte do paciente ao tratamento e a falência terapêutica (OMS, 2019). Comparando com os outros métodos de monitoria, foi constatado que a carga viral é um método rigoroso que indica falência no tratamento dos pacientes com HIV (OMS, 2019).

A carga viral não só determina a taxa de adesão ao tratamento mas também a resistência do vírus aos fármacos administrados ao paciente, a necessidade de troca da linha de tratamento sendo também necessário como medida de risco de transmissão vertical assim como horizontal (OMS, 2019). Carga viral (HIVVL- do inglês *HIV viral load*) é a determinação da quantidade de cópias do vírus no plasma do indivíduo infectado em tratamento, sendo importante para monitorar a evolução do tratamento do paciente, diferente do teste imunológico que mede o CD4, a carga viral tem suas vantagens sobre o CD4, pois além de ser o mais específico e sensível, a carga viral fornece a situação real do alvo do tratamento anti-retroviral, o HIV. O teste de Carga Viral tem como objectivo quantificar o número de cópias do HIV em pacientes já conhecidos como portadores do vírus do HIV, com o intuito de acompanhar a evolução da infecção, a eficiência, cumprimento do tratamento o surgimento de resistência a medicações anti-retrovirais utilizadas pelo paciente e aparecimento de falha terapêutica.

O Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV testes baseia no princípio da reacção em cadeia da polimerase, em tempo real. O sector de Biologia Molecular do Centro de Saúde da Universidade Eduardo Mondlane realiza os testes de carga viral usando a plataforma *Cobas Ampliprep* e *TaqMan*, sendo um sector de referência que recebe amostras referenciadas de vários pontos da Cidade de Maputo e do País.

De acordo com Zeh e seus colaboradores em sua pesquisa usando esse método e equipamento de análise as amostras podem ser Plasma, pois elas geralmente já vêm centrifugadas em tubos PPT contendo EDTA ou DBS (dried blood spot) que passam por etapas de bancada que são muito importantes para posterior etapa de extração, amplificação e detecção automatizada.

5. Actividades desenvolvidas

Desde o início ao fim do estágio, as actividades realizadas foram basicamente a recepção das amostras, triagem e preparo das amostras conservação das amostras, processamento das amostras e concluindo com a verificação, validação e emissão dos resultados.

Dentro do laboratório as actividades ou processos são divididos em três fases:

- Fase de Pré-análise/Pré-Analítica
- Fase de Análise/ Analítica
- Fase Pós-análise/Pós Analítica

5.1. Fase de Pré-análise/Pré-Analítica

5.1.1. Recepção de amostras

Esta fase compreende o procedimento para a recepção, triagem, digitação ou cadastro e conservação de amostras de Carga Viral do HIV. Diariamente os processos seguiam o mesmo algoritmo, as amostras recebidas eram plasma em tubo PPT e BDS.

No âmbito da recepção das amostras vestia em primeiro lugar o equipamento de protecção individual (EPI), que era bata descartável, toca, cobertores de sapatos e luvas sem pó que era a exigência para o manuseio das amostras. Amostras chegavam diariamente ao laboratório vindo de vários pontos (US) da província de Maputo Cidade e de outras províncias de todo território nacional acompanhado de um transportador em caixas térmicas contendo acumuladores de frio.

Após a chegada das amostras realizava a recepção seguindo os passos detalhados abaixo.

- Ainda na presença do motorista/transportador, verificava se o destino das amostras e os pedidos estão correctos.
- Verificava se as amostras eram destinadas ao Laboratório do CS da UEM, com pedidos de carga viral. Caso não estejam conforme, devolvia ao motorista para fazer chegar ao destino correcto.

- Verificava a quantidade das amostras se correspondiam ao indicado no protocolo (que era uma lista que indicava o número exacto das amostras que a US havia referenciado), e se o protocolo ou FSRs (requisição) se referiam as amostras recebidas.
- Quando conforme, preenchia o formulário de recepção de amostras, onde era escrito a data da recepção, proveniência, a quantidade das amostras, o nome e a assinatura do motorista e da pessoa que recebeu as amostras.

5.1.2. Triagem das amostras

Nesta etapa as amostras eram tríadas para se verificar os critérios de rejeição e aceitação, as amostras sem critério eram rejeitadas, contactava a US sobre a rejeição e o motivo que fez o laboratório rejeitar a amostra e pedia uma nova colheita. A triagem das amostras era feita respeitando a ordem de entrada das mesmas, priorizando sempre as amostras de plasma para assegurar a sua integridade. Os critérios de aceitação e rejeição estão descritos nos anexos de amostras válidas e inválidas.

5.1.3. Cadastro das amostras de Carga Viral no sistema informático (SIL)

As amostras eram cadastradas de duas formas diferentes dependendo de onde as amostras eram referenciadas se eram de uma US com um SIL ou não. No caso de não ter um SIL as amostras eram cadastradas manualmente colocando os dados um por um no sistema pelo facto de elas virem sem um código de barras pré-atribuído. No caso de ter um SIL na US as amostras vinham acompanhadas de códigos de barras onde toda a informação necessária estava contida, essas amostras eram cadastradas usando um leitor de códigos de barras e toda a informação era desse jeito passada para o sistema. As etapas eram feitas como descrito abaixo.

- Ligava o computador e fazia duplo click no ícone *Wxdisa* e de seguida abria-se o menu principal do sistema, devia assegurar que a tecla de maiúsculas está desactivada. Introduzia código individual de acesso ao *DISA*.
- Na janela a seguir no canto esquerdo continha uma barra onde vinha todas opções de acesso e Clicava na opção “Recepção de amostras” para o cadastro das mesmas
- Após abrir a janela da opção “Recepção de amostras” Clicava “Novo Registo” e introduzia a informação solicitada de acordo com a informação que constava

no FSR. Em caso de amostras que vinham com os códigos de barra já instituídos usava a pistola para o código de barras, assegurando que o cursor se encontra no campo de “Ref/NIT” no programa DISA. Devia também assegurar que a pistola esteja direccionada para o código certo.

- Após o scan ou a introdução manual da informação certificava que todos os campos necessários estão correctamente preenchidos se estivesse conforme, salvava informação clicando no salvar dados. O programa automaticamente emitia o código de barra a partir de uma impressora zebra (ver *anexo 02*).
- Após a impressão da etiqueta contendo o código de barra da impressora zebra colava a etiqueta na amostra (no tubo ou no cartão DBS), devia sempre ter o cuidado de não tocar na amostra e de não fechar a informação contida no cartão DBS (nome e NID).
- Colocava as amostras em saco plástico chamado *ziplock* em conjunto de 21 no máximo se fosse DBS ou em suportes se fosse plasma (ver anexo).

5.1.4. Conservação das amostras

Conservava as amostras após a triagem, dependendo do tipo de amostras a conservação seguia procedimentos diferentes. Para mostras de DBS não necessitava de tratamento prior para sua conservação. Contudo, não permaneciam a temperatura ambiente por tempo superior a 15 dias após a colheita. Para amostras de plasma era necessário verificar se vieram previamente centrifugadas das unidades sanitárias, se for o caso não era necessário qualquer tipo de preparação antes da sua conservação, portanto, eram directamente conservadas no congelador a temperaturas $\leq -20^{\circ}\text{C}$, até a sua testagem. Contudo, caso estas não tivessem sido previamente centrifugadas nas unidades sanitárias, o laboratório centrifugava as amostras a 3500 rpm durante 10 minutos e posteriormente conservava nas mesmas condições até a testagem

Para verificar se a amostra estava devidamente centrifugada o era observado se o gel do tubo ppt está entre o plasma e os elementos sólidos do sangue (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas), uma separação nítida, se a amostra não estivesse devidamente centrifugada, o gel não separava os componentes do sangue.

5.2. Fase de Análise/ Analítica

Esta fase compreendia a fase do processamento das amostras ou fase de bancada como era designando internamente, esta fase também incluía as manutenções, calibrações dos equipamentos e garantia de qualidade.

Diariamente após a entrada no laboratório de processamento das amostras, antes das actividades era realizada a descontaminação das bancadas usando as soluções de limpezas: álcool, hipoclorito e água destilada. Após a descontaminação das bancadas e dos materiais, seguia-se o processo de manutenção dos equipamentos (o analisador *CAP/CTM*) como descrito abaixo.

- Para começar era pressionado o botão "*main switch*" para ligar cada um dos equipamentos o *CAP* e o *CTM*, após ligarem de seguida era Ligado o computador conectado ao equipamento.
- Era Seleccionado e aberto o programa *Amplilink*, acedia ao programa digitando o seu nome e a senha pessoal e de seguida realizava a manutenção do equipamento.
- Para o equipamento *COBAS AmpliPrep* manutenções eram feitas diariamente e periodicamente e registadas no formulário de manutenções.
- Na barra de ferramentas na parte superior do programa *Amplilink*, era clicado na seta para baixo e seleccionada de seguida o equipamento *COBAS AmpliPrep*
- Era Seleccionado de seguida a função *Service Due* para verificar as acções a executar na manutenção. Seleccionava a acção *daily maintenance* e clicava "*perform*".
- Após a acção seguia as instruções dadas pelo sistema para realizar a manutenção que eram, primeiro certificar que não há nenhum consumível dentro do equipamento e se a porta principal está correctamente fechada, de seguida abria a porta e fazia a limpeza de toda superfície interna do equipamento, das agulhas e das torres de inicialização e de lavagem.
- Após terminar fechava a porta principal e clicava em *finish* no sistema do computador, assim o equipamento era reinicializado automaticamente e desse jeito concluía a manutenção.

5.2.1. Preparação das amostras para o processamento

Antes de qualquer trabalho com amostras o técnico devia estar totalmente equipado devidamente como era exigido pelo manual de biossegurança do laboratório de biologia molecular. Bata descartável, luvas sem pó, tocas, máscara e cobertores de sapato. Abaixo está descrito o passo a passo do manuseio das amostras

5.2.2. DBS (dried blood spot)

- As amostras de DBS eram contanto um pouco diferente, era sangue total em tubo com EDTA impregnado em círculos anteriormente picotados para um cartão e deixava-se por um tempo para secar a temperatura ambiente, a picotagem dos círculos ajudava na retirada dos mesmos para a eluição em tubos de amostras.
- Preparava a quantidade de amostras necessárias consoante o número de racks que iria ser processado (21 amostras por cada rack).
- Preparava 3 tubos falcons, identificado cada um dos tubos com o nome da solução: *Hipoclorito de Sódio 0,5%*, *Água destilada* e *Etanol 70%*, a data da preparação e as iniciais do técnico que preparou.
- Colocava os tubos no suporte apropriado e em cada um dos tubos adicionado a respectiva solução até perfazer cerca $\frac{1}{4}$ do volume total do tubo, com exceção do tubo que contem a água destilada que deve possuir um volume maior (cerca de metade do volume total do tubo) pela natureza do seu efeito.
- Colocava um papel toalha na bancada, em frente às soluções de desinfecção, para secar a pinça que era usada durante o corte das amostras (retirada dos círculos do cartão).
- Colocava um rack de *s-tubes* vazio na bancada, abria uma embalagem de *clips* que contém códigos de barras (24 clips por embalagem) e encaixava os clips no rack nas posições 4 à 24, reservava as posições 1, 2 e 3 do rack de *s-tubes* para os *clips* dos controlos *HPC*, *LPC* e *NC*, respectivamente.

- Abria uma embalagem de *s-tubes* (24 *s-tubes* por embalagem), e colocava os *s-tubes* em todas as posições do rack de *s-tubes*.
- Retirava a etiqueta de código de barras que estava junto a amostra no *ziplock* e colava na folha de trabalho (ver *anexo 02*), seguindo a sequência dos códigos das amostras. Reserva as primeiras três posições da folha de trabalho para os controlos *HPC* (na posição 1), *LPC* (na posição 2) e *NC* (na posição 3).
- Removia a amostra do *ziplock* tendo o cuidado de não tocar nos círculos de sangue com os dedos e evitava pousar a amostra sobre qualquer superfície da bancada.
- Retirava do rack o *s-tube* correspondente a amostra e com o auxílio da pinça previamente descontaminada removiam círculo do DBS para o interior do *s-tube*. Escolhia o círculo com melhor qualidade e tentava sempre que possível manter tanto o DBS, o tubo e a tampa presos sobre a mesma mão.
- O círculo recortado devia estar completamente encostado à parede do *s-tube* de modo a permitir a passagem da ponta de *SPU*, durante a pipetagem no processo de extracção.
- Fechava o *S-tube* e devolvia para o *Rack*.
- Antes de prosseguir para outra amostra, descontaminava a pinça da seguinte forma: mergulhava a pinça por cerca de 3 segundos em cada uma das seguintes soluções, respeitando a ordem hipoclorito de sódio à 0,5%, água destilada e, por fim, mergulhava na solução de etanol a 70%. Posteriormente, retirava a pinça do etanol e deixava secar sobre o papel toalha até estar completamente seco.
- Prosseguia com o procedimento até cortar todas amostras que desejava processar.
- Após o corte das amostras passava para a fase da eluição que é uma forma de tornar o sangue seco em forma líquida usando uma solução o *PBS*
- Em uma *CBS*, Ligava a lâmpada da *CBS* e certificava que a *CBS* está desinfetada. Observava no painel da *CBS* se o fluxo atingiu a estabilidade e premia o botão para ligar a corrente do vórtex.
- Verificava se as pipetas estavam devidamente desinfetadas e calibradas

- Assegurava que o balde de lixo não está cheio.
- Transferia uma quantidade da solução de *PBS* do frasco original para um tubo falcon de forma a evitar contaminar ou perder grandes volumes de *PBS* e levava para dentro da *CBS* juntamente com os racks das amostras. O rack das amostras devia estar numa posição confortável para pipetagem.
- Acoplava à pipeta a uma ponta com filtro de 1000uL. Transferia 1000µl da solução de *PBS 1X* estéril com o pH 7,4 para cada *S-tube* onde se encontrava as amostras, tendo a atenção de abrir e fechar um *S-tube* de cada vez para evitar possíveis contaminações e tinha também a atenção para não tocar a ponta da pipeta nos tubos ou em outro objecto.
- Repetia o passo com todos os *s-tubes* contendo amostras *DBS* tendo o cuidado de não tocar o *s-tube* com a ponta da pipeta, podendo assim usar a mesma ponta e trocava quando passar para o próximo rack.
- Deixava as amostras *DBS* incubar em *PBS* por pelo menos 30 minutos mas não mais de 24horas.
- Observava se havia formação de bolhas nos *s-tubes*. Se houvesse, retirava dando golpes suave com o dedo no *S-tube* para eliminá-las.
- Após isso carregava as amostras para o analisador.

5.2.3. Plasma

Para amostras de plasma o procedimento é um pouco menos complexo porem devia se ter mais cuidado no manuseio por se tratar de amostras frescas diferente do *DBS* pós é mais susceptível a contaminação, derrames, podia também em caso de não cumprimento das normas de biossegurança contaminar o técnico que está a manusear o espécime. Por essa razão o manuseio dessas amostras frescas eram de extrema importância verificar se o técnico não tinha nenhuma lesão na região das mãos. De salientar que toda a actividade com plasma era realizado numa *CBS*.

- Retirava as amostras da geleira onde estavam conservadas a uma temperatura em torno de 2° a 8° C para a bancada em suportes de tubos ppt (plasma preparation tube).

- Deixava por 30min a temperatura ambiente para equilibrar a temperatura com o ambiente antes do seu manuseio;
- Após o equilíbrio térmico, levava as amostras à cabine de biossegurança.
- Na cabine com uso a uma pipeta automática retirava um volume de 1100µl ao tubo de amostra até completar as respectivas 21 amostras a partir da posição 4 no rack.
- Homogeneizavas vigorosamente com auxílio de um vortex.
- Após a homogeneização a amostra já podia ser carregada ao equipamento

5.2.4. Carregamento das amostras ao equipamento

Tanto o *DBS* assim como o plasma o modo de carregamento era o mesmo, antes de carregar as amostras ao equipamento em racks de amostras num conjunto de 21 amostras, era preciso colocar os controlos de qualidade que eram uma amostra contendo partículas virais como o caso de controlos positivos e uma amostra negativa sem nenhuma partícula viral, os controlos eram entregues ao laboratório pelos provedores e vinha junto com os kits do reagente principal.

As amostras após todos os preparos eram carregados ao equipamento nas suas respectivas posições no equipamento referentes as amostras, posições *F*, *G* e *H*. Após o carregamento carregavam o botão *start* no sistema *amplilink* e o equipamento iniciava o processo de extracção e depois ia para a amplificação.

5.3. Fase pós-análise/pós-analítica

- Após o término da amplificação do DNA extraído, o resultado já estava disponível
- Aceitava o resultado usando o software *amplilink* a partir do painel principal na janela de resultados, se estiver tudo conforme sem nenhuma falha e rejeitava-se estiver não conforme
- Após aceitar, os resultados era automaticamente exportado por um sistema de interface (*SIL*) o *DISA instrument* do software *amplilink* para o *DISA lab*

- E o resultado saía automaticamente em formato físico em uma impressora
- Após a impressão, verificava os resultados, se os controles passaram com o auxílio de uma planilha o *Levy-Jennings*.
- Após os controles passarem validava os resultados no *DISAlab* para que estejam disponíveis aos seus respectivos remetentes (US remetentes) e se não passassem os controles, era repetido o procedimento de processamento das amostras.
- Após todo esse procedimento, todo o processo laboratorial estava terminado.

6. Perspectivas Críticas

Baseando no decurso de todo estágio diria que adquiri experiências teórico-prático no que diz respeito aos processos laboratoriais desde a colheita ao processamento das amostras e conservação das mesmas, gostei de ter participado em actividades complementares que aguçaram mais o meu conhecimento sobre a gestão laboratorial e ter participado em feiras de saúde promovidas pela instituição, foi importante também para mim estar em treinos de rotina internos no que diz respeito a biossegurança e gestão de qualidade e gestão de risco.

De uma forma breve dizer também que houve dificuldades no processo todo, principalmente pelo facto de ter que estar no laboratório e ao mesmo tempo ter que estar na sala de aula. Posso dizer que tirei o máximo do conhecimento dos instrutores no local do estágio, foi bom pois a paciência deles foi muito importante para o meu aprendizado. Dizer que as actividades realizadas foram satisfatórias e diria que com sucesso adquiri conhecimentos práticos importantes para minha vida profissional, De tudo dizer que os processos do local de estágio foram dinâmicos e o esperado, nada foi surpresa visto que quase tudo realizado no sector já havia sido por mim aprendido na sala de aula.

Apesar do teste de carga viral ter se verificado eficiente na monitoria do tratamento anti-retroviral (Tarv), tem se verificado discrepâncias nos resultados de pacientes examinados com métodos diferentes. Havendo assim a necessidade de padronização deste método em todo território nacional.

Uso de equipamentos mais específicos e mais sensíveis possíveis na detecção do ARN viral.

7. Conclusão

O teste de carga viral tem importância na decisão clínica do paciente em tratamento anti-retroviral (TARV), em outra abordagem o objectivo de se realizar o teste de carga viral é de controlar grau de supressão viral do paciente, para fins de monitorar a adesão do paciente ao tratamento, possíveis falências terapêuticas e resistências a anti-retrovirais.

O laboratório faz testagem de carga viral desde 2018 usando o protocolo da OMS adaptado ao laboratório, sendo um laboratório de referência não faz colheitas, mas sim recebe amostras pré colhidas das unidades sanitárias a redores da cidade e província de Maputo e também são referenciadas amostras vindo de todas províncias do país. Segundo a OMS são usados amostras de sangue total impregnado em um cartão filtro chamado *DBS* e o plasma que é adquirido após a centrifugação do sangue total para a realização dos testes de carga viral, o laboratório realiza esses testes usando os dois tipos de amostras.

Desde o início ao fim do estágio foi processado cerca de 10 000 amostras de *DBS* e cerca 8 000 de plasma, tendo quase 75% delas com carga viral suprimida pois a maior parte dos resultados emitidos eram *not detected* ou menor que *400cp/ml*.

No âmbito da importância do estágio em relação a minha formação dizer que como profissional de saúde foi muito benéfico pra mim pois visto que fiz um curso relacionado a saúde e laboratório de análise clínicas me será benéfico na minha vida profissional. Já sendo o fim do estágio espero conseguir aplicar meus conhecimentos adquiridos na minha carreira profissional, sem mais nada a declarar digo obrigado a instituição por me conceder essa oportunidade de aprender.

8. Recomendações

De forma resumida dizer que os aspectos a ser melhorado sector de estágio São muito mais relacionados aos processos técnicos:

- O primeiro ponto seria que o estagiário devia ter uma descrição de actividades que lhe guiasse em quase todas actividades referente ao seu estágio
- Recomendo a criação de um workshop de debate científico baseado no assunto do estágio e nas actividades
- No fim do estágio, o estagiário poderia beneficiar-se de um certificado de competência que diz ter realizado um estágio na instituição indicada e as actividades a qual ele e competente
- A nível nacional, pode-se optimizar a rede de testagem de modo a alcançar mais utentes com necessidade desses serviços.
- Optimizar o rede de recolha de amostras de modo que cheguem aos locais de testagem a tempo e hora.
- Garantir treinos de todos técnicos que colhem as amostras no que diz respeito as boas práticas de laboratório, principalmente aos transportadores das amostras pós sendo um grupo não ligado a questões de saúde ou clínica devem ter mais atenção a eles.
- Pode-se determinar o melhor tipo de amostras a ser usado em testes de carga viral, amostras sem muitas exigências de armazenamento, transporte e conservação.

09. Referências Bibliográficas

1. Amilcar tanuri, a. V. (2013). Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos. Brasília.
2. Cordeiro, m. R., & crespó hirta, r. D. (2019). Métodos de diagnóstico molecular e controlo terapêutico da hepatite c. São paulo: rbac.
3. Joireman, s. F. (2006). *Hiv/aids in africa*. (d. S. Keller, ed.)
4. Ministros, c. D. (2004). Plano estratégico nacional de combate ao hiv/sida. Maputo.
5. Oms, o. M. (2019). Kit de ferramentas de diagnóstico molecular do vih para melhorar o acesso aos testes de carga viral e diagnóstico precoce pediátrico. Genebra.
6. Peterson. (2008). Performance of a novel human immunodeficiency virus (hiv) type 1 total nucleic acid-based real-time pcr assay using whole blood and dried blood spots for diagnosis of hiv in infants. (2008). *Journal of clinical microbiology*, 46, 1-5.
7. Quadros, k. A., campos, c. R., soares, t. E., & de rezende e silva, f. M. (2016). Perfil epidemiológico de idosos portadores de hiv/aids atendidos no serviço de assistência especializada. Minas gerais: recom.
8. Resende, l. M., viana, l. D., & vidiga, p. G. (2009). *Protocolos clínicos dos exames laboratoriais*. Minas gerias.
9. Roche. (2014). *Cobas taqman anayizer*. New jersey.
10. Rui bastosk, .. R. (2010). Guia de tratamento anti-retroviral e infecções oportunistas no adulto adolescente e grávida. Maputo.
11. Soares, r. M. (2011). Papel da carga viral celular na imunodeficiência hiv/sida: contributo do estudo da infecção pelo hiv-2. Lisboa.
12. Sousa, a. M. (2007). A epidemia pelo hiv/aids e suas repercussões sobre a saúde da população moçambicana. Rio de janeiro: escola nacional de saúde pública.
13. Stevens, w., erasmus, l., moloi, m., taleng, t., & sarang, s. (2008). *Journal of clinical microbiology*, 46, 1-5.
14. Tecnologia hospitalar e laboratorial, t. (2017). Manual resumido; cobas ampliprep, cobas taqman, amplilink. Maputo.
15. Wersom, e. S., da motta, l. R., maria, l. B., franchini, m., & junio, o. D. (2013). *Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo hiv*. Brasília.
16. Zeh, c., ndiege, k., inzaule, s., achieng, r., williamson, j., chang, j. C.-w., et al. (2017). Evaluation of the performance of abbott m2000 and roche cobas ampliprep/cobas

taqman assays for hiv-1 viral load determination using dried blood spots and dried plasma spots in kenya. Plos one , 1-4.



Figura 01: Baldes de despejo de lixo



Figura 02: Borrifadores de soluções de limpeza



Figura 03: Chuveiro lava olho

Anexo: 01



Figura 04: Folha de trabalho



Figura 05: Impressora Zebra



Figura 06: Pinças

Anexo: 02



Figura 07: Amostra de DBS

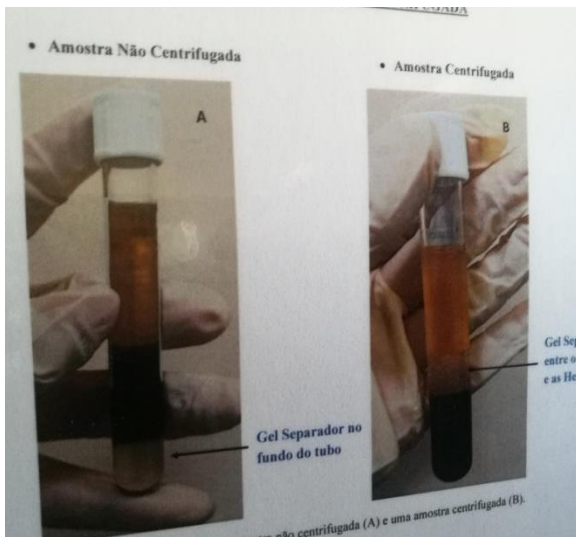


Figura 08: Amostra de Plasma

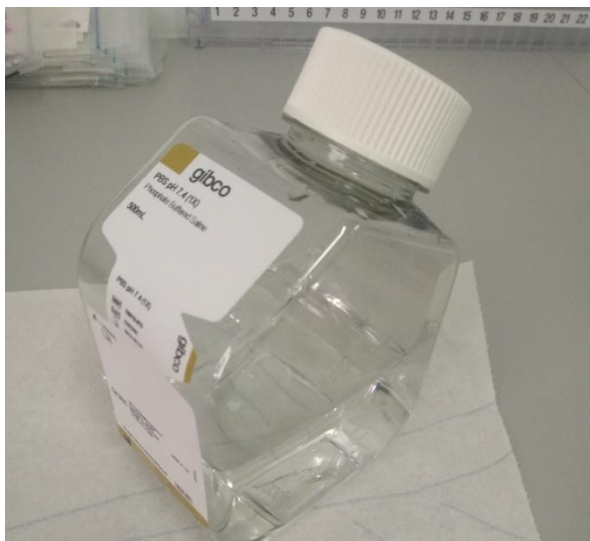


Figura 09: Solução de eluição (PBS)

Anexo: 03



Figura 10: Tubos epindorfes



Figura 11: Suporte de amostras de plasma



Figura 12: Suporte de tubos epindorfe



Figura 13: Pontas de pipetas



Figura 14: K-tip



Figura 15: K-tube

Anexo: 05



Figura 16: Rack de SPU



Figura 17: Rack de Reagente



Figura 18: SPU

Anexo: 06



Figura 19: SPU no Rack



Figura 20: S-tube



Figura21: Papel de limpeza

Anexo: 07



Figura 22: Pipetas em seu suporte



Figura 23: Analisador CAP

Anexo: 08



Figura 24: Reagente de lavagem interno



Figura 25: Analisador CTM

Anexo: 09



Figura 26: Tanque de despejo (esgoto)



Figura 27: Amostras descartadas (DBS)



Figura 28: Kits de reagente principal

Anexo: 11



Figura 29: controis interno de Qualidade



Figura 30: Amostras no Rack

Anexo: 12

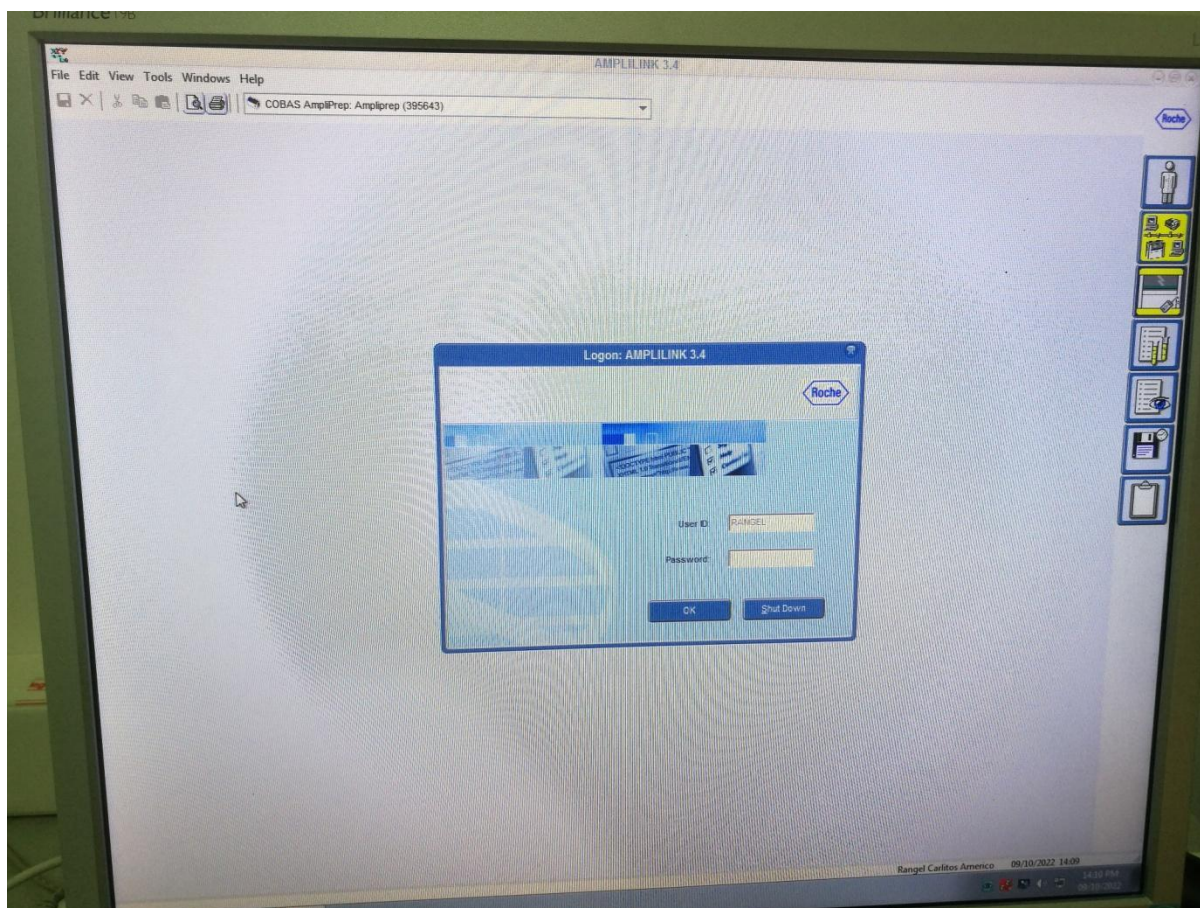


Figura 31: SIL, *Amplilink*

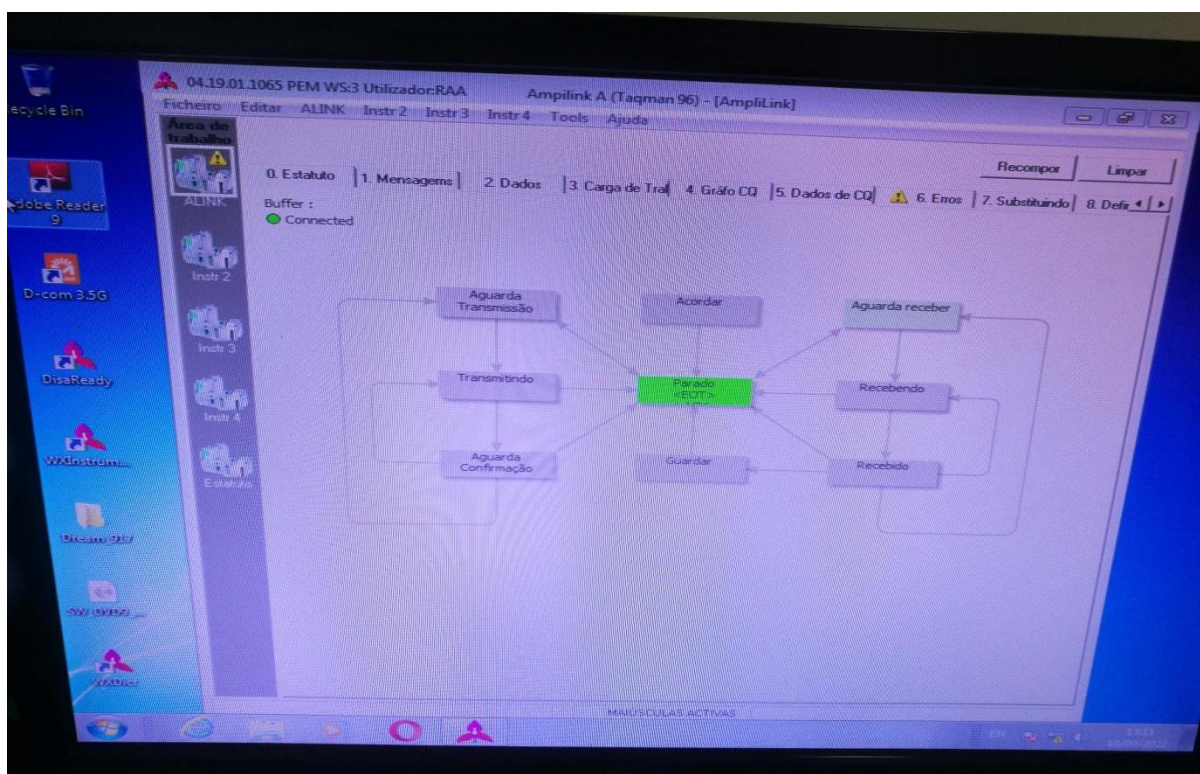


Figura 32: SIL, *DISA*

Anexo: 13

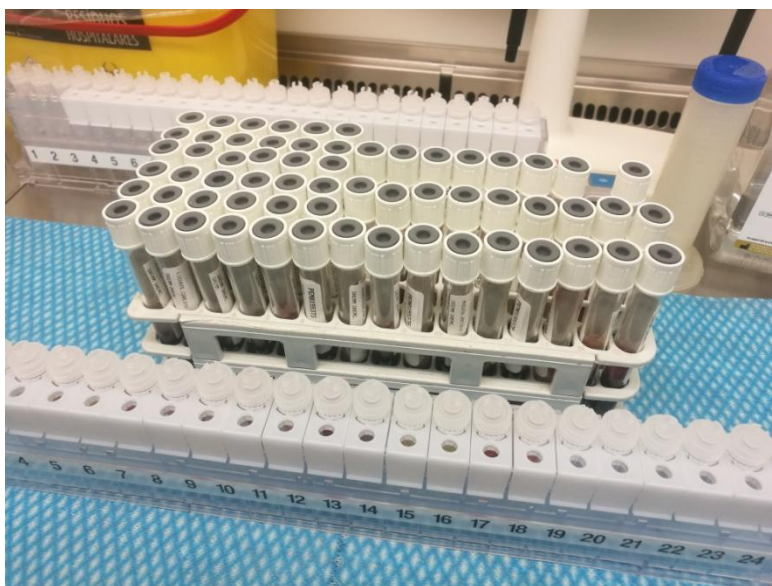


Figura 33: Amostras de Plasma

em tubo PPT

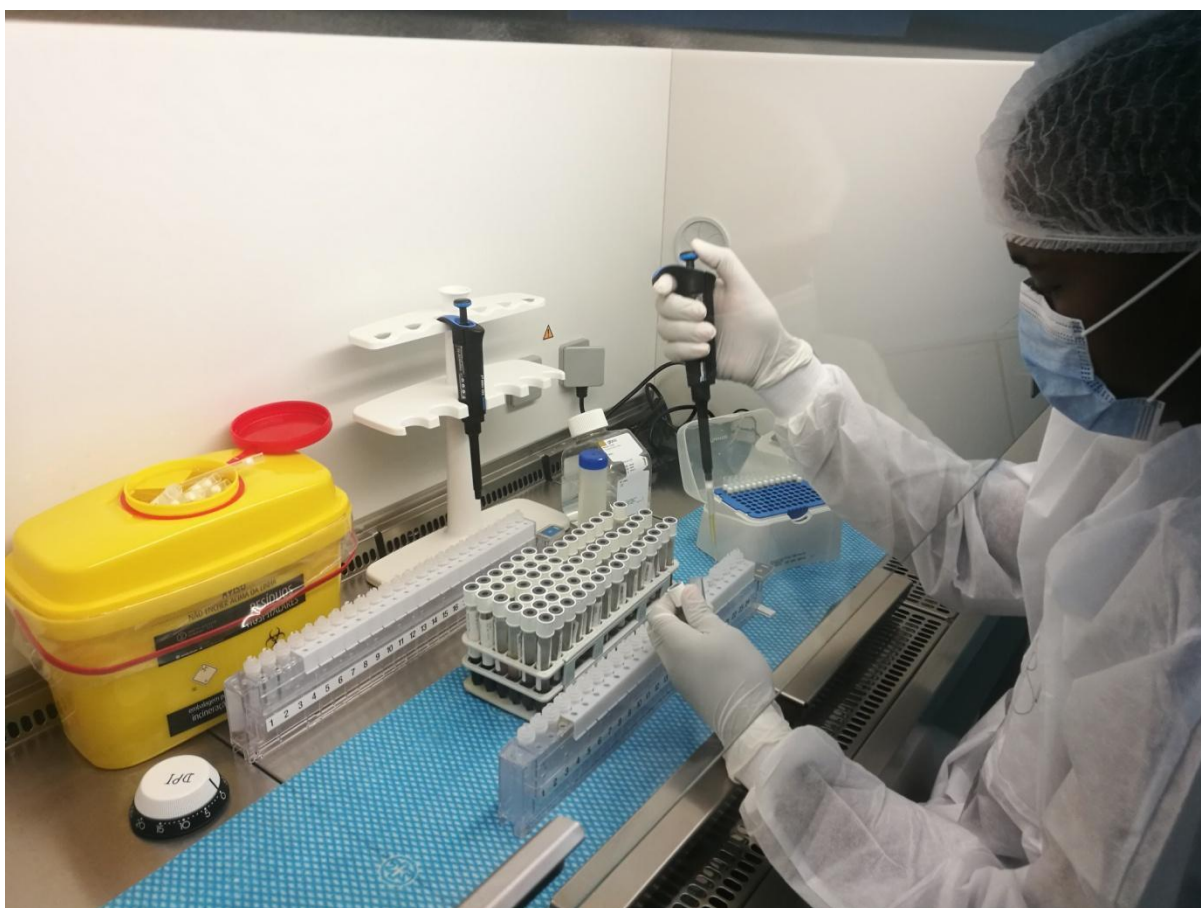


Figura 34: Processo de Pipetagem de Amostras de Plasma

Anexo: 14