

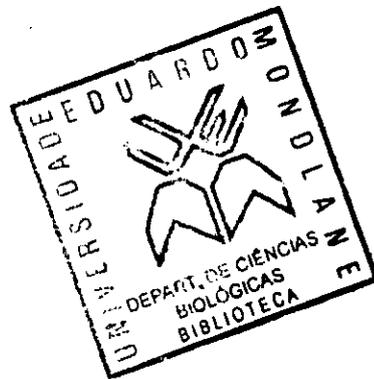
B10-38



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Culminação de Curso
(Estágio)

**RASTREIO DO VÍRUS DA HEPATITE B USANDO A TÉCNICA
ELISA E TESTES RÁPIDOS NO BANCO DE SANGUE DO
HOSPITAL CENTRAL DO MAPUTO**



Autora: Suzete Luisa José Dias

Maputo, Outubro de 2007



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Trabalho de Culminação de Curso
(Estágio)**

**RASTREIO DO VÍRUS DA HEPATITE B USANDO A TÉCNICA
ELISA E TESTES RÁPIDOS NO BANCO DE SANGUE DO
HOSPITAL CENTRAL DO MAPUTO**

Autora

Suzete Luisa José Dias

Supervisores

Dr^a. Sandra Silva

Dr. Joel Samo Gudo

Maputo, Outubro de 2007

Dedico este trabalho:

Ao meu esposo, Ricardo Lucas José Maria e aos meus pais, Pedro Fernando Dias e Lili Serafina José Dias, pelo amor, carinho, estímulo e ajuda incondicionais durante o meu percurso estudantil.

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração deste trabalho, recebi inspiração de DEUS e ajuda da minha família, amigos e colegas, por isso agradeço a DEUS, pela divina protecção e ajuda que me tem concedido e à Direcção do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, por ter permitido a realização do estágio.

Os agradecimentos se estendem

Ao Dr. Joel Samo Gudo, pelo inestimável apoio prestado ao longo dos anos de formação universitária e pela orientação prestados no período de estágio e na realização deste trabalho.

A dra. Sandra Silva, pela orientação, sugestões e críticas apresentadas.

Ao PhD. Florindo Mudender pela revisão do trabalho.

Aos dr. Nédio Mabunda, dra. Evelina Sambava e Tenório Chemane, pela orientação, conselhos preciosos e sugestões inestimáveis durante o estágio.

A todos funcionários do BSHCM.

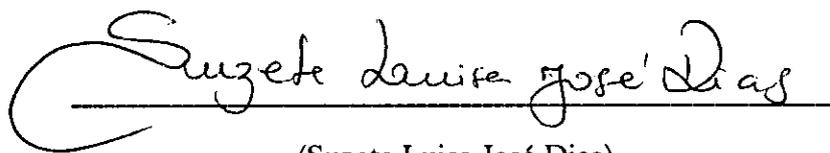
Não quero deixar de reconhecer o imensurável afecto e estímulo recebido dos meus familiares e amigos, incluindo mas não se limitando, a Lizete, Fernando, José, Lili, Ester, Luís, Gilberto, Francisco, Afonso e Sérgio. A eles o meu muito obrigado pelo apoio moral e material.

E por fim, mas não menos importante, meu sincero agradecimento a todos meus colegas que tiveram aulas comigo no Departamento de Ciências Biológicas e que me ajudaram a suportar o "stress" e contribuíram para um melhor ambiente de ensino-aprendizagem.

E a todos que directa ou indirectamente colaboraram para a concretização deste trabalho, muito obrigado!

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra, que este trabalho é da minha inteira responsabilidade, fruto do meu esforço e dedicação, e que a informação aqui contida reflecte só e somente só a realidade.



(Suzete Luisa José Dias)

Maputo, Outubro de 2007

RESUMO

O presente trabalho de culminação de curso constitui uma compilação de teorias e práticas adquiridas e desenvolvidas em forma de estágio, durante seis meses, no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, (BSHCM).

O estágio, teve como principal objectivo, o desenvolvimento de habilidades técnicas e práticas específicas para o processamento do sangue, com particular ênfase no rastreio do Vírus da Hepatite B (HBV) – tema do presente trabalho.

Para além da abordagem virada para o HBV, neste trabalho procura-se também evidenciar algumas técnicas rotineiras adoptadas no quotidiano das actividades desenvolvidas no BSHCM, como a produção de hemocomponentes, triagem de HIV e da Sífilis, tipagem sanguínea e testes de compatibilidade, e inclui algumas perspectivas críticas inerentes.

Com o estágio, foi possível concluir que parte da segurança transfusional, depende em grande parte dos processos realizados nos bancos de sangue, e da forma como os mesmos são realizados, facto que também se pretende demonstrar ao longo do trabalho.

Os objectivos do estágio foram plenamente atingidos, tendo permitido adquirir habilidades técnicas e práticas para a execução dos procedimentos rotineiros do banco de sangue, como também habilidades profissionais, incluindo o trabalhar em equipa

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO	2
1.1. Historial do Banco de Sangue.....	4
2. O PROGRAMA DE ESTÁGIO PREVIAMENTE DETERMINADO	6
2.1 OBJECTIVOS.....	7
3. APOIO CONCEDIDO AO ESTUDANTE POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O TEMA TRATADO NO ESTÁGIO	8
5. ÀS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO NO BSHCM	20
5.1 Recepção	20
5.2 Sala de Inquérito.....	20
5.3 Sala de Colheita.....	21
5.4 Tipagem Sanguínea (ABO e Rh D).....	21
5.5 Provas de Compatibilidades	23
5.6 Produção de Hemocomponentes	25
5.7 Serologia de HIV e HBV.....	27
5.7.1 Rastreio de HBV	27
5.7.1.1 Procedimentos para o uso da técnica ELISA	27
5.7.1.2 Procedimentos para o teste confirmatório.....	29
5.7.2 Rastreio de HIV.....	30
5.8 Triagem de Treponema pallidum e Determinação de Isohemolisinas e Isoaglutininas	31
6. PERSPECTIVAS CRÍTICAS SOBRE OS PROCESSOS DE TRABALHO DA UNIDADE DE ESTÁGIO	33
7. CONCLUSÃO	36
8. RECOMENDAÇÕES	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ADSM	-	Associação dos dadores de Sangue
BSHCM	-	Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo
CVM	-	Cruz Vermelha de Moçambique
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DNS	-	Direcção Nacional de Sangue
ELISA	-	Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
HCM	-	Hospital Central de Maputo
HBV	-	Vírus da Hepatite B
HBsAg	-	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HIV	-	Vírus de Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
MISAU	-	Ministério da Saúde
PNTS	-	Programa Nacional de Transfusão de Sangue
RCT	-	Teste Rápido Cassete
RPR	-	Rapid Plasma Reagin (Reagina Plasmática Rápida)
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
SSCV	-	Sociedade Suíça da Cruz Vermelha
STS	-	Serviço de Transfusão do Sangue

1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O estágio de culminação de curso realizou-se no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo (BSHCM), o qual é parte integrante do respectivo Hospital, que se encontra situado no bairro da Polana Cimento, na Avenida Agostinho Neto nº 1164, Cidade de Maputo.

O HCM, é um hospital de referência Nacional, sendo considerado o maior Hospital de Moçambique, no qual se encontram distribuídos vários serviços, incluindo, entre outros, os de Pediatria, Ginecologia, Urgências e Ortopedia, os quais em caso de necessidade, são abastecidos pelo Banco de Sangue do mesmo hospital.

O BSHCM tem como actividades principais a colecta e processamento do sangue (tipagem, triagem e produção de hemocomponentes), de modo a identificar e assegurar a existência de sangue seguro para transfusões. Este banco, tem igualmente efectuado acompanhamento médico dos seus dadores.

O BSHCM é dirigido por um Director de Serviço Hospitalar e está dividido em três (3) secções: A Secção de Administração, a Secção de Enfermagem e a Secção Técnica, (Fig. 1). Cada uma destas secções subdivide-se em outras subsecções de acordo com a especificidade do trabalho de cada secção, cujo objectivo final é a obtenção de um sangue seguro para a transfusão.

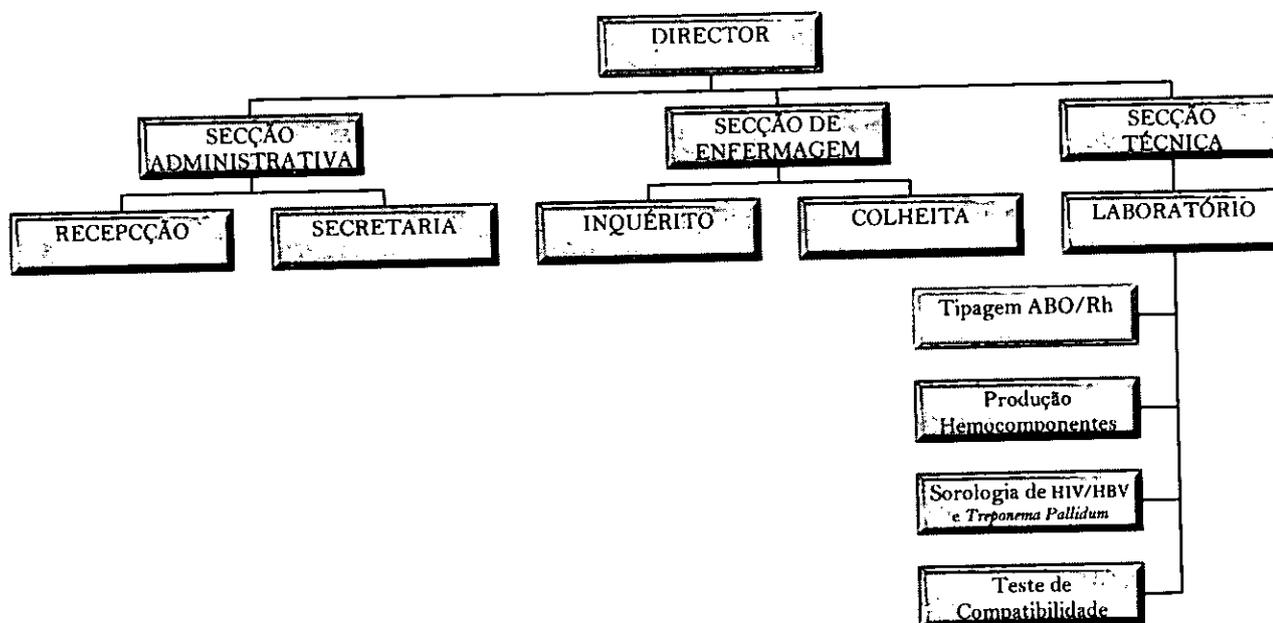


Fig. 1: O organograma do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo.
Fonte: Modificado de Mabunda, 2006

Breve descrição das secções do BSHCM

a. Secção Administrativa

Recepção e Secretaria – departamento responsável pela recepção e registo dos dadores e respectivos dados pessoais (nome, sexo, endereço, profissão, a causa da doação, e outros), para posterior elaboração de cartões de dador, pelo próprio departamento.

No BSHCM são recebidos 3 tipos de dadores:

- **Dador voluntário (não remunerado):** dador que doa sangue voluntariamente, de forma regular ou irregular, sem receber qualquer forma de pagamento, (OMS Módulo 1, 1993 e Gudo, 2004).
- **Dadores familiares ou repositores:** os que doam sangue quando solicitados por um membro da sua família ou da sua comunidade, (OMS Módulo 1, 1993 e Gudo 2004).
- **Auto-Dador (Autólogos):** indivíduo que doa o seu sangue para depois ser transfundido de acordo com as indicações clínicas, de modo a suprir as suas necessidades em transfusão de sangue, quer seja total ou parcialmente (OMS Módulo 1, 1993 e Gudo, 2004).

b. Secção de Enfermagem

Sala de Inquérito – nesta subsecção avalia-se o estado de saúde dos dadores, seu historial médico, inquerindo o dador sobre assuntos relacionados com a sua saúde. O inquérito permite “decidir” sobre a aptidão do dador para efectivar a doação, podendo o mesmo ser rejeitado temporária ou definitivamente.

Sala de colheita – nesta sala faz-se a colheita do sangue do dador. Para tal, é necessário que *à prior* se registe o dador num caderno devidamente preparado para o efeito – o caderno de registo, e se prepare um saco de sangue e tubo com a identidade do dador onde será depositado o sangue colhido.

Os dados do dador são posteriormente registados num computador para efeitos de arquivo.

A colheita pode ser feita no banco de sangue do hospital ou por uma Brigada móvel em outras instituições ou locais públicos.

c. Secção Técnica

Laboratório – o laboratório é a subsecção responsável pela análise da qualidade do sangue com vista a identificar o tipo e se está livre de contaminações.

O sangue é analisado, seguindo o trajecto: Tipagem ABO/Rh, Produção de Hemocomponentes, Triagem de HIV e HBV, Triagem de Sífilis, Determinação de Isoaglutininas e Isohemolisinas e Provas de Compatibilidade.

1.1. Historial do Banco de Sangue

Segundo Gudo (em comunicação pessoal, 2006), dois períodos marcaram os serviços de transfusão de sangue em Moçambique: o Antes e o Pós Independência.

O Período Antes da Independência

Durante o período antes da Independência (período colonial), as transfusões de sangue apenas eram realizadas no Hospital Central Miguel Bombarda, na cidade de Lourenço Marques (actual HCM, cidade de Maputo), com base em doações familiares ou repositórias e doações remuneráveis. As doações não remuneráveis eram doações de elite, só os brancos podiam doar sangue.

Em 1957, foi criada a Associação dos Dadores de Sangue de Moçambique (ADSM).

O Período Pós Independência

Em 1975 após a independência, foi abolida a doação remunerável. Um acordo bilateral de cooperação entre o Governo de Moçambique e a Cooperação Suíça, para apoio na área de Saúde, foi estabelecido, em 1979, tendo culminado com o envio em

1980, de um consultor da Federação Internacional da Cruz Vermelha e Crescente Vermelho da Suíça, para uma primeira avaliação da situação transfusional.

A segunda avaliação foi efectuada em 1982, onde os resultados culminaram num acordo trilateral em 1983 entre o Ministério da Saúde (MISAU), Cruz Vermelha de Moçambique (CVM) e Sociedade Suíça da Cruz Vermelha (SSCV). Este acordo constituiu a primeira fase (1984-1985) e tinha como principais objectivos a criação do Programa de Sangue.

Neste mesmo período (1984), com apoio da SSCV, foi estabelecido o Programa Nacional de Transfusão de Sangue (PNTS) que era dirigido pela Secção de Laboratórios. A mobilização de dadores de sangue era feita em colaboração com a CVM. A testagem de sangue era apenas feita para Sífilis segundo constatou um consultor da OMS em 1986.

A segunda fase do acordo tripartido foi estabelecida entre o período de 1986-1987, e tinha como principais objectivos a melhoria da capacidade de realizar a Tipagem Sanguínea, aumento de número de doações e a redução da dependência do País em material importado para a transfusão de sangue.

A 30 de Novembro de 1988, foi aprovado pelo Conselho de Ministros o Decreto nº 14/88, instrumento que regula, desde então, a actividade de transfusão de sangue no País.

A terceira fase do acordo tripartido, foi assinada nos anos 1988 e 1990, e estabelecia a instalação dos Bancos de Sangue a nível das capitais provinciais e a introdução de despiste de HIV nas unidades de sangue.

Actualmente no BSHCM o despiste nas unidades de sangue é feito para HIV 1/2, Hepatite B e *Treponema pallidum* (Sífilis).

2. O PROGRAMA DE ESTÁGIO PREVIAMENTE DETERMINADO

O estágio teve início a 05 de Abril de 2006 e terminou a 31 de Outubro do mesmo ano, tendo sido em média de 4 horas/dia útil. A estagiária cumpriu um mínimo de 500hrs.

Tab. 1: Cronograma das actividades desenvolvidas durante o período de estágio.

Mês		PERÍODO																																											
		Abril				Maio				Junho				Julho				Agosto				Setembro				Outubro																			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4																
Semana																																													
Secção	Actividades																																												
Recepção	Recepção de dadores e abertura de fichas	■																																											
S. I.	Testes de pré-selecção					■																																							
S. de Colheitas	Colheita de sangue e registo do dador					■																																							
Laboratório	Tipagem ABO/Rh									■																																			
	Testes de Compatibilidade									■																																			
	Produção de Hemocomponentes													■																															
	Rastreio de HBV e HIV utilizando a técnica ELISA e testes rápidos																	■								■																			
	Triagem de Sfilis, determinação de Isohemolisinas e Isoaglutininas																									■																			

2.1 OBJECTIVOS

2.1.1 Geral

- Conhecimento prático das técnicas para o processamento do sangue, com especial ênfase no rastreio do Vírus da Hepatite B.

2.1.2 Específicos

- Conhecer, e saber executar testes para a triagem de HBV usando a técnica ELISA e testes rápidos;
- Adquirir habilidades técnicas para o rastreio de HIV e *Treponema pallidum*;
- Adquirir habilidades técnicas para a tipagem ABO/Rh, Provas de Compatibilidade e Produção de Hemocomponentes.

3. APOIO CONCEDIDO AO ESTUDANTE POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO

Todo o apoio necessário para a realização do estágio, foi concedido pela unidade de estágio. Tal apoio consistiu na disponibilidade do pessoal técnico-administrativo, que sempre esteve presente para a orientação na realização das actividades. O apoio facilitou a integração nas actividades regulares do laboratório. A estagiária teve acesso a material didáctico, livros, computador com internet para efeitos de pesquisa científica. Ela também teve facilidades e oportunidades de aplicar os conhecimentos adquiridos e capacidades adquiridas ao longo dos anos de formação.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE O TEMA TRATADO NO ESTÁGIO

• SANGUE

O sangue é um fluido complexo, que consiste de diferentes células sanguíneas, suspensas em um líquido amarelado, denominado plasma. Serve como um meio de transporte, levando todos os seus diferentes componentes aos diferentes órgãos do organismo, (OMS Módulo 3, 1993).

As células sanguíneas compreendem uma mistura de hemácias (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos), e plaquetas (trombócitos), (OMS Módulo 3, 1993 e Fischbach, 2005).

O plasma contém várias proteínas distintas, substâncias químicas, factores de coagulação, e numerosas substâncias metabólicas, (OMS Módulo 3, 1993).

Os Constituintes do Sangue

Eritrócitos ou Hemácias

São células sanguíneas produzidas na medula óssea, sob controlo da hormona renal eritropoietina. Quando maduras, as hemácias penetram na corrente sanguínea, na qual têm uma vida média de aproximadamente 120 dias antes de serem lisadas ou fagocitadas pelo sistema retículo endotelial, (OMS Módulo 3, 1993 e MISAU, 1996).

A principal função das hemácias é de transportar hemoglobinas, que por sua vez transportam o oxigénio dos pulmões para os tecidos. A concentração média de hemácias em um homem normal por milímetros cúbicos é de 5.200.000 (\pm 300.000), numa mulher normal é de 4.700.000 (\pm 300.000). Pessoas vivendo em altas altitudes, têm um número muito maior de glóbulos vermelhos, (Guyton & Hall).

Leucócitos ou Glóbulos Brancos

Pertencem a uma família de células nucleadas, consistindo de granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e agranulócitos (Linfócitos B, T e *natural killer*) e monócitos-macrófago. São produzidas na medula óssea e tecido linfóide. Apresentam um período de vida média muito curto, sendo de algumas horas no sangue circulante, e nos tecidos é de 2 a 3 dias, (OMS Módulo 3, 1993).

A função principal dos leucócitos é de garantir a imunidade inata ou inespecífica e adquirida ou específica por reconhecimento do próprio e do não próprio no organismo de um indivíduo, (OMS Módulo 3, 1993).

O real valor dos leucócitos é que a maioria deles é especificamente transportado para áreas seriamente infectadas e inflamadas, e provêm uma defesa rápida e potente contra agentes infecciosos. Os granulócitos e monócitos têm uma habilidade especial para "procurar e destruir" um invasor estrangeiro. Um Homem adulto tem cerca de 7.000 leucócitos por microlitro de sangue, (Guyton & Hall).

Plaquetas ou Trombócitos

Segundo OMS Módulo 3 (1993), plaquetas são pequenos fragmentos de células que são produzidas na medula óssea; contém enzimas e outras substâncias biologicamente activas. O tempo de vida média no sangue é de cerca de 10 dias, existindo cerca de 150000 a 500000 plaquetas/mm³ de sangue e diariamente cerca de 30000 são produzidas. As plaquetas estão envolvidas no processo de coagulação e fibrinólise, libertando substâncias em locais de lesão e combinam com factores de coagulação presentes no plasma produzindo fibrina.

Plasma

É um fluido amarelado que envolve as hemácias que não foram coaguladas. É composto de água em 91% e em 9% de outros componentes tais como factores de coagulação, proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, hormonas, sais inorgânicos principalmente o cloreto de sódio, alguns gases, e anticorpos diversos (OMS Módulo 3, 1993).

O Soro

O soro é um fluido que circunda as hemácias depois destas se terem coagulado, (OMS Módulo 3, 1993).

O sangue e seus produtos, são utilizados em uma série de propósitos, mas as três principais razões para a transfusão são: correcção da anemia; reposição do sangue perdido no sangramento durante uma cirurgia ou após um acidente; reposição de

outros componentes do sangue, tais como factores de coagulação (OMS Módulo 3, 1993).

As transfusões, entretanto, constituem uma via ideal para a transmissão de alguns agentes infecciosos do dador para o receptor do sangue, como os vírus da Hepatite (B e C), HIV, a bactéria que causa a Sífilis, o protozoário que causa a Malária, entre outros. Assim, como as transfusões não são uma prática médica isenta de riscos, a decisão do uso do sangue deve ser tomada pelos médicos, quando estes acreditam que os benefícios são maiores que o riscos, (OMS Módulo 2, 1993).

Segundo Alquézar (1995), a segurança da transfusão sanguínea depende de uma série de factores, que em conjunto podem proporcionar melhor qualidade do sangue e dos hemocomponentes a serem utilizados. Dentre esses factores, os mais importantes são, a selecção da população de dadores, a triagem clínica, a realização dos testes imunohematológicos, a triagem serológica e o uso racional do sangue e hemocomponentes (OMS Módulo 2, 1993 e Alquézar, 1995).

A rápida evolução do conhecimento sobre agentes etiológicos de doenças transmissíveis pelo sangue e o rápido desenvolvimento de metodologias mais sensíveis e específicas para detectar o estado de infecção, por esses agentes, faz com que a serologia em bancos de sangue se torne um tema extremamente complexo e de vital importância para a qualidade do produto final (Alquézar, 1995).

- **VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)**

A Hepatite B é definida como inflamação do fígado causada por uma infecção pelo Vírus da Hepatite B (HBV), que é um vírus DNA, da família Hepdnaviridae que foi descoberto em 1965. É a mais perigosa das hepatites e uma das doenças mais frequentes do mundo, (Murray *et al.*, 2004 e Rodrigues *et al.*, 1996).

Até ao momento, foram identificados cinco vírus da família Hepdnaviridae (A, B, C, D e E), causadores dos principais tipos de hepatites virais. Estes vírus apresentam diferenças importantes entre si, tanto no que diz respeito à estrutura, aos conteúdos dos ácidos nucleicos, às vias de transmissão e formas de inactivação, quanto à evolução clínica dos indivíduos infectados (Tabela 1) (Ferreira e Ávila, 1996).

Tabela 1: Principais características das hepatites por vírus

DOENÇAVÍRUS	Período de Incubação	Vias de transmissão	Infecção crónica	Triagem Serológica
Hepatite A (HAV)	4 semanas	Fecal-oral	Não	Não
Hepatite B (HBV)	1 a 6 meses	Parental, materno-fetal, sexual	Sim (= 5%)	Sim (HBsAg)
Hepatite C (HCV)	1 a 5 meses	Parental, materno-fetal, sexual	Sim (= 70%)	Sim (anti-HCV)
Hepatite D (HDV)	2 a 6 semanas	Parental	Sim	Não
Hepatite E (HEV)	6 semanas	Fecal-oral	Não	Não

O vírus da hepatite B apresenta tropismos teciduais e faixa de hospedeiros muito limitados, infecta o fígado, e em menor grau, os rins e o pâncreas apenas de seres humanos e chimpanzés, (Murray *et al.*, 2004).

As infecções determinadas pelos vírus da Hepatite B (HBV), C (HCV) e D (HDV) podem ser inaparentes ou sintomáticas, e estas por sua vez, podem evoluir para a forma aguda ou crônica. No caso do HBV a evolução para a cronicidade se correlaciona com o estado de portador do antígeno de superfície do vírus (HBsAg). As doenças hepáticas crônicas associadas com o HBV e o HCV consistem na hepatite crônica persistente ou activa, e estas podem evoluir para a cirrose ou para o hepatocarcinoma (câncer hepático), (Cura e Wendel, 1994).

Estrutura

O HBV é um vírus DNA envelopado, pequeno, que apresenta várias propriedades incomuns. O vírus contém vírion envelopado contendo genoma de DNA circular, pequeno, de filamento parcialmente duplo, de apenas 3.200 bases. Embora seja um vírus DNA, ele codifica uma transcriptase reversa e se replica através de um RNA intermediário, (Murray *et al.*, 2004).

A partícula viral infecciosa (vírion) tem 42nm de diâmetro, e é conhecida como 'partícula de Dane' em homenagem ao primeiro cientista a identificá-lo no soro das pessoas infectadas, (OMS Módulo 2, 1998 e Murray *et al.*, 2004).

No centro do vírion, está o núcleo do capsídeo de 27nm de diâmetro, que contém o ácido nucleico viral e a enzima DNA polimerase, fundamental ao sucesso da infecção pelo vírus, (OMS Módulo 2,1993 e Murray *et al.*, 2004).

Esta proteína do vírion, conhecida como antígeno de “superfície” do vírus da Hepatite B (HBsAg), é produzida em grandes quantidades pela célula infectada pelo vírus, (OMS Módulo 2,1993 e Murray *et al.*, 2004). O vírion contém adicionalmente, duas outras proteínas: antígeno “e” da Hepatite B (HBeAg) e antígeno do núcleo ou “core” (HBcAg), (OMS Módulo 2,1993).

Antígeno Austríaco HBsAg é um reconhecido complexo antigénico específico, associado com HBV, (Neomedic, 2004). O núcleo central contém o antígeno do núcleo e um envoltório que contém o antígeno de superfície, (Fischbach, 2005).

Replicação

A replicação do HBV é peculiar, primeiro porque o HBV possui um tropismo muito definido para o fígado. Seu pequeno genoma também necessita de economia, conforme ilustra o padrão de sua transcrição e tradução. Além disso, o HBV se replica através de um intermediário de RNA e produz e liberta iscas particuladas antigénicas (HBsAg), (Murray *et al.*, 2004).

A fixação do HBV aos hepatócitos é mediada pelas glicoproteínas HBsAg. O HBsAg liga-se à albumina sérica humana polimerizada e a outras proteínas séricas, podendo essa interação orientar o vírus para o fígado, (Murray *et al.*, 2004).

História natural da infecção pelo HBV

Segundo a OMS, citado por Rodrigues. *et al.*, (1996), mais de dois bilhões de indivíduos, dois em cada cinco habitantes da Terra, estão infectados pelo vírus da hepatite B, e esta doença é responsável por 1 a 2 milhões de óbitos por ano em todo o mundo. Estima-se que o número de portadores crônicos do vírus atinja 350 milhões.

O HBV transmite-se, segundo a OMS Módulo 2 (1993), por via parental, envolvendo um contacto directo com fluídos corporais, sendo as vias mais comuns as seguintes:

- contacto com sangue infectado, seja por exposição de feridas ao sangue infectado, como por agulhas, seringas ou estiletos contaminados usados, por exemplo, para injeção de drogas endovenosas, tatuagens, perfurações de orelhas, acupunctura ou escarificações rituais;
- contacto sexual;
- transmissão neonatal ou perinatal, em geral ao nascimento, por secreções cervicais;
- transfusão de sangue ou componentes sanguíneos infectados.

A severidade da infecção está relacionada a uma série de factores, um dos quais é o tamanho do inóculo infectante (a quantidade recebida do agente infeccioso), (OMS Módulo 2,1993).

• DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECCÃO

A infecção por HBV resulta no surgimento de vários marcadores serológicos, e um dos primeiros marcadores é o antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), (Neomedic 2005). O estado da infecção e a sua progressão podem geralmente ser determinados pela identificação dos marcadores presentes na amostra de soro, ou em amostras sequenciais, (Fig 2), (OMS Módulo 2,1993).

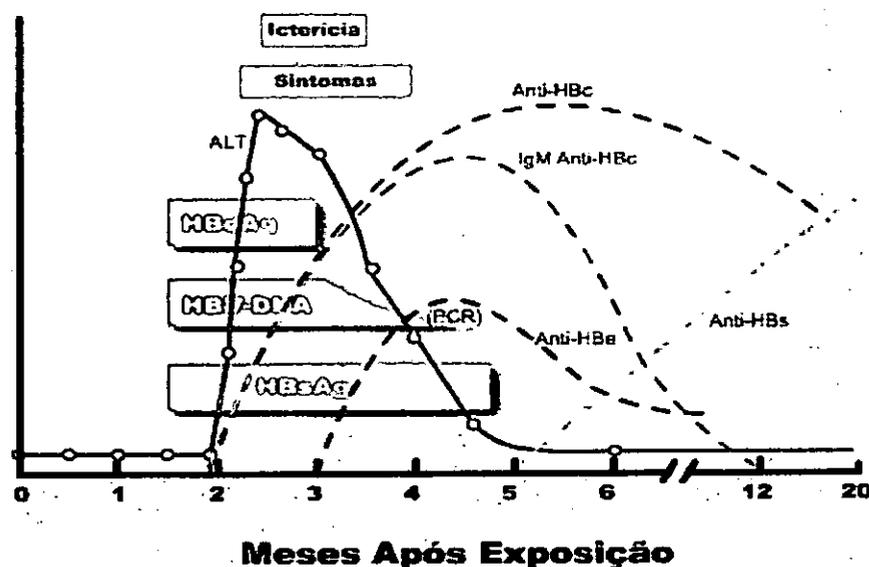


Fig. 2- Acontecimentos serológicos associados com a evolução típica da Hepatite B aguda.

Fonte: Marinho e Agostinho, 2002

A triagem serológica do sangue do dador, para a identificação da presença deste antígeno no soro de unidades de dadores nos Bancos de Sangue, reduziu acentuadamente o risco de aquisição do vírus a partir do sangue ou de hemoderivados contaminados, (Murray *et al.*, 2004 e Neomedic, 2005).

Segundo Ferreira e Ávila (1996), o diagnóstico laboratorial das hepatites por vírus baseia-se em três pontos principais,:

Testes Serológicos – são os chamados “Marcadores Imunológicos”, que correspondem a fracções antigénicas dos próprios vírus ou aos diversos tipos de anticorpos produzidos pelo organismo contra o agente infectante nas diferentes fases da infecção.

Técnicas de Biologia Molecular – são técnicas que permitem a identificação com alto grau de sensibilidade de ácidos nucleicos (ADN ou ARN), desses vírus no sangue ou tecidos de indivíduos infectados. Estas podem ser Hibridização e Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).

Estas técnicas têm sua maior utilização na confirmação diagnóstica da infecção viral em casos duvidosos, na caracterização de soros de referência e principalmente no surgimento de pacientes com formas crónicas submetidos a tratamento.

Métodos Bioquímicos – são exames que permitem avaliar o tipo e o grau de comprometimento hepático e servem como indicadores tanto da evolução natural da infecção para a cura bioquímica ou para a cronicidade, quanto para monitorar a eficácia terapêutica de medicamentos.

A detecção do antígeno nuclear (HBcAg), do antígeno do envoltório (HBsAg) e do antígeno de superfície (HBsAg), ou de seus anticorpos correspondentes constitui avaliação serológica ou Plasmática da Hepatite B, (Fischbach, 2005).

Assim, o diagnóstico laboratorial de HBV no BS é baseado na serologia viral realizada em amostras séricas de indivíduos infectados. Há ‘Kits’ específicos para testes dos principais marcadores infecciosos do HBV, (OMS Módulo 2, 1993).

Testes serológicos

Testes serológicos ou imunoenaios, são técnicas usadas para a detecção e quantificação de antígenos e anticorpos, (Ferreira e Ávila, 1996).

Os testes serológicos podem utilizar reagentes marcados ou não-marcados (Ferreira e Ávila, 1996).

Nos ensaios com reagentes marcados, estes amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção. Os marcadores comumente utilizados são os radioactivos, enzimáticos, fluorescentes e quimioluminescentes, (Ferreira e Ávila, 1996).

Os ensaios com reagentes não-marcados, como precipitação e aglutinação, possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se formem grandes complexos, antígenos-anticorpos, (Ferreira e Ávila, 1996).

Os testes serológicos podem ser, segundo Cura e Wendel, (1994), de três tipos:

a) Hemaglutinação indireta (HAI)

Utiliza hemácias tratadas com ácido tânico, recobertas com anticorpos anti-HBs de alta pureza, produzidos por animais. Para evitar reações cruzadas não específicas, utilizam-se controles internos de hemácias sensibilizadas com imunoglobulinas provenientes do animal, imunizado para produção do anticorpo.

b) Radio Imuno Ensaio (RIA)

Neste teste seguem-se os mesmos passos do teste de ELISA, excepto que, no lugar de utilizar enzima, usa-se um radioisótopo, e a leitura é efetuada em contador gama. Os ensaios com reagentes marcados, como o radioimunoensaio e enzimaimunoensaio amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção. Os marcadores comumente utilizados são os radioactivos, enzimáticos, fluorescentes e quimioluminescentes,

c) Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima (ELISA/EIA)

Este teste é geralmente do tipo sanduíche, com revelação enzimática, utilizando um anticorpo monoclonal (anti-HBs) ligado a uma fase sólida (poço, esfera plástica), que capta o HBsAg presente no soro. A seguir, acrescenta-se um anticorpo (anti-HBs) policlonal marcado com enzima (peroxidase, fosfatase alcalina) e promove-se o

desenvolvimento da cor, através da adição de substrato cromogénico. A leitura pode ser visual, entretanto, recomenda-se a utilização de espectrofotómetro.

Testes serológicos para triagem de dadores de sangue, devem apresentar alta sensibilidade, evitando ao máximo a presença de resultados falso-negativos.

Os testes de HAI devem possuir sensibilidade de detectar de 10-20 ng/ml de HBsAg, e os testes de RIA e ELISA, de 1,0 ng/ml, (Cura e Wendel, 1994).

Actualmente, a grande maioria dos testes utilizados na triagem serológica são métodos por enzimaensaio (EIA/ELISA), que podem ser bem padronizados, fornecendo o resultado final de forma objetiva por leitura em aparelhos, e permitem que os processamentos possam ser automatizados, (Alquézar, 1995).

As técnicas imunoenzimáticas são baseadas na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas e permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico, (Ferreira, e Ávila, 1996).

Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima (ELISA/EIA)

O Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima (ELISA) ou ensaio imuno enzimático (EIA), é um método quantitativo em que a reacção antígeno-anticorpo é monitorada por medida da actividade enzimática, (Ferreira, e Ávila, 1996).

A técnica ELISA é um procedimento de ensaio imunoenzimático cujo nome resulta da associação das iniciais de sua denominação inglesa (*enzyme linked immuno sorbent assay*), (Cura e Wendel, 1994).

Desempenha um papel muito importante no laboratório clínico, pois, além da elevada sensibilidade, apresenta as vantagens de utilizar reagentes estáveis, estar livre das exigências de trabalhar com radioisótopos e poder ser adaptado tanto a testes simples como à automação sofisticada, (Ferreira, e Ávila, 1996).

O termo ELISA foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlman em 1971 e identificava um ensaio heterogéneo diferente dos métodos enzimáticos até então utilizados, que envolviam colorações imuno-histoquímicas pela técnica de imunoperoxidase, (Ferreira, e Ávila, 1996).

Miles e Hales, em 1968, apresentaram o conceito de enzimaensaio heterogêneo, mas o emprego de conjugados enzimáticos em imunoensaios foi relatado independentemente, por Engvall e Perlman e por Van Weemen e Schuurs em 1971, (Ferreira, e Ávila, 1996).

Este teste foi desenvolvido como uma alternativa ao radioensaio para a detecção de antígenos e de anticorpos. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da actividade enzimática como da imunológica do anticorpo, (Ferreira, e Ávila, 1996).

Segundo a OMS Módulo 2 (1993), pode-se considerar 3 tipos de EIA:

- a. EIA tipo antiglobulina: é a forma mais simples de EIA, em que qualquer anticorpo viral presente em uma amostra se liga ao antígeno viral imobilizado e é detectado por um anticorpo anti-humano marcado com uma enzima.
- b. EIA competitivo: é um ensaio um pouco mais complexo, porém amplamente usado, em que o anticorpo natural, que pode estar presente numa amostra a ser analisada, compete com um anticorpo específico marcado com uma enzima pelas áreas de ligação do antígeno imobilizado.
- c. EIA tipo sanduíche: é um tipo altamente específico de EIA, em que um anticorpo viral na amostra analisada se liga ao antígeno viral imobilizado, e então é detectado por um antígeno viral livre marcado com uma enzima.

Os EIA podem, de acordo com a OMS Módulo 2 (1993), ser usados para detectar tanto antígenos como anticorpos. São apresentados de duas maneiras que se baseiam nos mesmos princípios, mas diferem sobre a forma como o antígeno viral está imobilizado:

- sobre a superfície de microcavidades de poliestireno, apresentação de microplacas com 96 poços;
- sobre uma pequena pérola de poliestireno, de aproximadamente 4mm de diâmetro: apresentação de 20 ou 60 poços.

O BS do HCM, usa para a identificação do HBV, o teste Healthase HBsAg ELISA.

Healthase HBsAg ELISA

O teste HBsAg ELISA é um teste usado para a determinação qualitativa do antígeno de superfície de Hepatite B (HBsAg) no soro ou plasma humano, (Neomedic, 2005).

Esta técnica, tem sido um sucesso como método de rotina no rastreio de HBsAg em dadores de risco (MISAU, 1996).

Princípio do teste

HBsAg EIA é um imuno-ensaio de fase-sólida simultânea tipo sanduíche, que emprega um anti-HBsAg específico: um imobilizado no fundo do poço da microplaca e outro combinado com *Horseradish Peroxidase (HRP)*, como solução conjugada. Durante o ensaio, o HBsAg existente na amostra reagirá com os anticorpos para formar “anticorpo-HBsAg-anticorpo-HRP” imuno-complexo. Depois de aberto, o material é lavado durante o procedimento do ensaio, o substrato é aplicado para indicar o resultado do teste, (Neomedic, 2005).

O surgimento da cor azul nos poços da microplaca indicam um resultado reactivo HBsAg. A ausência da cor indica resultado não reactivo, (Neomedic, 2005).

Os testes de triagem com resultados reactivos indicam a possibilidade de que o dador esteja infectado, mas somente após realização dos testes suplementares (confirmatórios), pode-se então considerar a amostra como positiva. Se apenas os resultados dos testes de triagem são positivos, a amostra é considerada como reactiva (isto é, não se pode afirmar que amostra é positiva para HBV apenas com os resultados positivos dos teste de triagem, é necessária a realização de teste confirmatório). Toda amostra reactiva deve ser repetida, pelo menos, com o mesmo teste de triagem, (Cura e Wendel, 1994).

Os testes EIA podem apresentar resultados falso-positivos, por isso procedimentos mais específicos devem ser utilizados posteriormente para confirmar os resultados, (Murray *et al.*, 2004).

O BS do HCM usa o teste *Rapid Cassette Test (RCT) For HBsAg (Serum/Plasma)* para confirmar os resultados do HBsAg ELISA.

Teste Rápido Cassette (RCT) para HBsAg (Soro/Plasma)

RCT para HBsAg, é um teste da esfera imunocromatográfica efectuado para determinar a qualidade de HBsAg no soro ou plasma humano, (Neomedic, 2004). Este teste utiliza ambos, convencional e monoclonal, anticorpos para identificar HBsAg no soro ou plasma de forma selectiva, (Neomedic, 2004).

Princípios do teste

O instrumento imunocromatográfico contém um jogo único de cores-conjugadas e anticorpos mono e policlonal imobilizados usados para produzir um modelo visual distinto indicando a presença de HBsAg, na amostra teste em aproximadamente 10 min, (Neomedic, 2004).

No procedimento de testes, a amostra do soro é permitida migrar através da área absorvente. Se HBsAg estiver presente, aparece a banda da cor conjugada do anticorpo, formando um complexo anticorpo-antígeno. Enquanto a reação da mistura continua a seguir através da membrana teste, o complexo liga-se ao anticorpo anti-HBsAg na zona do teste (T) da membrana, e produz uma banda cor de rosa. Um conjugado solto liga-se aos reagentes imobilizados na zona de control (C), produzindo uma banda cor de rosa, demonstrando a devida performance do teste, (Neomedic, 2004).

O principal propósito da triagem de sangue é o de assegurar que o estoque do sangue disponível esteja livre de agentes infecciosos da melhor forma possível, detectando qualquer agente infeccioso que possa estar presente antes que o sangue seja destinado para transfusão, (OMS Módulo 2, 1993).

A triagem serológica tem um significado estratégico especial, pois a partir de um determinado momento, é o único procedimento que vai validar ou não, a utilização do hemocomponente (Alquézar, 1995).

5. AS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO NO BSHCM

Para a realização do estágio, a estagiária iniciou a sua aprendizagem na recepção, a seguir foi à sala de inquérito, depois à sala de colheita. Depois de entrado no laboratório passou pelo sector de tipagem sanguínea, seguindo-se de prova de compatibilidade, produção de hemocomponentes, serologia de HIV e HBV, triagem de sífilis e determinação de Isohemolisinas e isoaglutininas. Por fim voltou a serologia de HIV e HBV onde terminou o seu estágio.

As actividades desenvolvidas durante o período de estágio são abaixo discriminadas, de acordo com o cronograma do estágio previamente determinado.

5.1 Recepção

Durante as quatro primeiras semanas do estágio (mês de Abril), o trabalho efectuado na recepção, foi de atendimento aos dadores, registo dos seus dados pessoais e arrumação das fichas. Recebidos os dadores, abre-se uma ficha que permite o melhor controle. Esta, contém dados pessoais do dador (como nome, sexo, idade, endereço, outras doacções, tipo de doação, entre outras) que são posteriormente computarizados. O dador deve apresentar a mesma ficha na sala de Inquérito e de colheita, em todas doações, para que sejam preenchidos outros dados.

5.2 Sala de Inquérito

Nas 2 semanas seguintes (mês de Maio), a estagiária aprendeu e realizou a pré-triagem dos dadores. Esta é a sala onde se faz a pré-seleção dos dadores de sangue. Os dadores entram e entregam a ficha recebida na recepção. Avalia-se o estado de saúde dos dadores, medindo a tensão arterial, o peso da pessoa, o nível de hemoglobina e preenche-se a ficha. Depois, analisa-se se existem sinais de alguma doença e inquire-se ao dador sobre assuntos relacionados com a sua saúde, usando as perguntas de exclusão temporária e definitivas (vide Anexo 2). Deste inquérito "decidi-se" se o dador está ou não apto para doar, podendo-se rejeitar temporária ou definitivamente.

5.3 Sala de Colheita

Durante três semanas (finais de Maio e início de Junho), o estágio foi realizado na sala de colheita. É aqui onde se colhe o sangue do dador.

O dador entrega a ficha previamente preenchida pelo enfermeiro da sala de inquérito. Regista-se os dados do dador num caderno de registo, e se prepara um saco e tubo com a identidade do dador onde será depositado o sangue. Depois regista-se os dados num computador.

Colhe-se o sangue do dador para um saco de 500ml e um tubo, usando a prática habitual de colheita. Depois da colheita, aconselha-se o dador a usar da boa prática de higiene (lavar as mãos) e a passar para outra sala onde lhe é servido um lanche.

Na brigada móvel, a colheita é processada do mesmo modo, mas o sangue é guardado num colman (caixa isotérmica), que possui um acumulador de gelo.

O saco e o tubo contendo o sangue, são entregues ao laboratório para a posterior análise.

Da sala de colheita, as unidades de sangue são levadas para o laboratório onde é analisado seguindo a seguinte ordem: tipagem sanguínea, produção de hemocomponentes, triagem de HBV e HIV, triagem de sífilis, determinação de isohemolisinas e isoaglutininas e prova de compatibilidade. No entanto, a ordem que se segue é seguindo o cronograma do estágio que foi desenhado pelo Dr. Joel Samo Gudo.

5.4 Tipagem Sanguínea (ABO e Rh D)

O estágio neste sector decorreu durante 3 semanas (mês de Junho).

O sangue que é colhido na sala de colheita é levado directamente para este sector. Registam-se os dados do dador no caderno do movimento diário. Determina-se o grupo sanguíneo efectuando a tipagem directa (testes em tubos de ensaios), que consiste na identificação da presença de antígenos nos eritrócitos do paciente ou dador, usando reactivos compostos de anticorpos conhecidos por anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D; para determinação dos grupos sanguíneos ABO e Rh D.

Segundo a OMS Módulo 2 (1993), o sangue é classificado como sendo do tipo **A**, **B**, **AB** ou **O**. Esta classificação teve origem na descoberta de 2 antígenos eritrocitários distintos, ao se analisar as hemácias, denominando-se assim antígeno **A** e **B**. No grupo **ABO**, é possível que as hemácias tenham um destes antígenos na sua superfície, ambos ou nenhum deles, sendo assim, as células que têm o antígeno **A** ou **B**, pertencem ao grupo **A** ou **B**, respectivamente. As células que têm os antígenos **A** e **B**, pertencem ao grupo **AB** e os que não possuem nenhum antígeno, pertencem ao grupo **O**, que no início era assinalado como o número zero (0) e as pessoas leram "O".

De maneira análoga, existem dois anticorpos distintos no soro, um deles que reage aglutinando especificamente as células do grupo **A**, é chamado **anti-A**, e o outro que reage especificamente com células do grupo **B**, denominado **anti-B**, (OMS Módulo 2, 1993).

Segundo a OMS Módulo 2 (1993), a presença de anticorpos **anti-A** e **anti-B** no soro, difere de acordo com os antígenos **AB** presentes nas hemácias, sendo assim:

- indivíduos cujas hemácias tenham o antígeno **A** (grupo **A**), apresentam **anti-B** no seu soro;
- indivíduos cujas hemácias tenham o antígeno **B** (grupo **B**), apresentam **anti-A** no seu soro;
- indivíduos cujas hemácias tenham os antígenos **A** e **B** (grupo **AB**), não apresentam nem **anti-A** e nem **anti-B** no seu soro;
- indivíduos cujas hemácias não tenham os antígenos **A** e **B** (grupo **O**), apresentam **anti-A** e **anti-B** no seu soro;

Assim, para se determinar o grupo sanguíneo de um indivíduo, fazem-se dois tipos de teste, onde um demonstra a presença do antígeno nas hemácias (tipagem de célula ou directa), e o outro demonstra a presença do anti-soro no soro (tipagem reversa). Desse modo, se os testes mostram a presença de um antígeno **A** nas células e o **anti-B** no soro, estar-se-á certo que a tipagem está correcta. Contudo, se as células mostram a presença do antígeno **B**, e o soro **anti-B**, deve-se estar alerta para um erro na tipagem, devendo ser necessário a repetição dos testes, (OMS Módulo 2, 1993).

O sangue é também classificado em grupos (positivo e negativo), pela presença ou ausência de um antígeno de superfície das hemácias, que foi encontrado primeiramente no macaco *Rhesus*, denominado Factor Rh, (Calvante, 2006).

O sistema Rh tem seis genes denominados de C, c, D, d, E e e; também apresenta 5 antígenos, denominados C, c, D, E e e. Esses genes são transmitidos em conjunto de 3, sendo cada um deles transmitido por um dos pais, sendo Cde, cDE, cde e assim por diante, (OMS Módulo 2, 1993).

Assim, o sangue Rh negativo não possui o antígeno D na superfície, e o Rh positivo o possui. A incidência destes grupos varia de acordo com a raça, pois trata-se de um factor hereditário, (Calvante, 2006).

Para o resultado Rh D negativo – D^o, efectua-se um teste de confirmação do resultado, de modo a apurar a efectividade do resultado. Este teste de confirmação permite evitar a transfusão de hemácias Rh D positivas em indivíduo Rh D negativo, prevenindo assim a aloimunização por incompatibilidade na transfusão de um produto sanguíneo.

Depois da identificação do grupo sanguíneo, o sangue é levado a sala de produção de hemocomponentes, mas a explicação que se está efectuando é seguindo o trajecto do estágio.

5.5 Provas de Compatibilidades

Neste sector, o estágio decorreu durante o mês de Julho.

Aquando dos pedidos de Sangue pelas diferentes unidades do HCM, o médico do paciente que necessita de sangue, envia uma amostra do sangue do referido paciente juntamente com uma ficha de requisição, preenchida com a devida clareza e precisão, para a realização de provas de compatibilidade.

Prova de Compatibilidade, é o conjunto de procedimentos necessários realizar antes que o sangue possa ser definido como compatível. O propósito deste teste é de garantir que não haja anticorpos presentes no soro do paciente que reajam contra as células do dador após a transfusão, (OMS Módulo 2, 1993).

Assim, para a realização da prova de compatibilidade, recebe-se as amostras dos pacientes que devem vir em tubos devidamente identificados, juntamente com a ficha de requisição do produto sanguíneo (onde se pode requerer concentrado de glóbulos vermelhos, plasma ou plaquetas), e contém alguns dados do paciente.

Durante a recepção do formulário de requisição, confirmam-se os dados do formulário com os dados do tubo. Se os dados não corresponderem pede-se uma nova amostra.

A realização dos testes de compatibilidade envolve, segundo a OMS Módulo 2 (1993), o estudo Imuno-hematológico:

1. A execução da tipagem ABO e RhD na amostra de sangue do paciente.
2. Execução de uma pesquisa de anticorpos irregulares, sempre que possível.
3. A execução da prova final de compatibilidade – a prova cruzada, que é o teste entre o soro do paciente e as hemácias do dador.

Nota-se que o grupo sanguíneo do sangue a ser usado já é conhecido, mas para se entregar para a transfusão é necessário que se execute uma nova tipagem para confirmar a já efectuada.

Realiza-se a prova cruzada entre as hemácias do dador para o caso de concentrado de glóbulos vermelhos (CGV) e confirmação do grupo sanguíneo para o plasma fresco congelado (PFC) e concentrado de plaquetas (CP).

A prova cruzada deve ser realizada em tubos à temperatura ambiente, para detectar a incompatibilidade ABO, e a 37°C, para detectar anticorpos IgG, utilizando-se, se possível o teste indirecto de antiglobulina. Se não for possível, pode-se usar a técnica da adição de albumina.

Etiquetam-se os resultados compatíveis e armazena-se numa geleira.

A execução do teste de compatibilidade é necessária, pois é possível que um paciente que seja compatível para o sistema ABO e Rh do dador, reaja fortemente contra este sangue após a transfusão, pela existência dentre outros factores de outros anticorpos. Nesse caso, pessoas com mesmo grupo ABO e Rh D podem ser incompatíveis.

5.6 Produção de Hemocomponentes

Nas 2 semanas seguintes (mês de Agosto), o estágio foi realizado neste sector.

A produção de hemocomponentes é feita por meio de uma centrífuga refrigerada específica, usando sangue doado no mesmo dia com vista a garantir maior tempo de vida de cada componente. Os hemocomponentes são obtidos através de duas centrifugações seriadas do sangue total.

Apartir do sangue total que é sangue de um dador saudável e apto, colhido adequadamente em um recipiente contendo solução anticoagulante preservadora, quando mantidos em condições ótimas de preservação, obtêm-se Concentrado de Hemácias, Concentrado de Plaquetas, Plasma Fresco Congelado e Crioprecipitado, (Gudo, 2004).

O concentrado de hemácias é preparado a partir de uma unidade de sangue total, através da remoção de 200 a 250 ml de plasma. É composto por hemácias, plasma, leucócitos e plaquetas.

Para a sua obtenção deve-se pesar e equilibrar cada unidade, depois centrifuga-se pelo tempo e velocidade especificados, coloca-se em um expressor e exprime-se o plasma para dentro da bolsa satélite acoplada, (Razouk & Reiche, 2004).

O sangue total e o concentrado de hemácias devem ser sempre armazenados numa temperatura entre +2°C e +6°C. Podem ser utilizados durante 35 dias no caso de se utilizar a solução anticoagulante-preservadora CPDA-1 e 21 dias para CPD (Citrato-Fosfato-Dextrose).

Estes, são usados para o aumento da massa eritrocitária e do volume plasmático, enquanto que o concentrado de plaquetas é usado para tratamento ou prevenção de sangramentos devido a trombocitopénias, (Razouk & Reiche, 2004)..

Concentrado de plaquetas é o componente retirado de uma unidade de plasma rico em plaquetas, contendo 60 a 70% das plaquetas do sangue total fresco que lhe deu origem. É Obtido a partir da centrifugação do sangue em rotação leve.

Depois, exprime-se o plasma rico em plaquetas para dentro de uma das bolsas satélites e sela-se o tubo entre as hemácias e o plasma.

A seguir centrifuga-se mais uma vez o plasma rico em plaquetas em rotação pesada e exprime-se a maior parte do plasma sobrenadante para a bolsa satélite. Este concentrado é armazenado a temperatura de 20 a 24°C, em agitação contínua e tem validade de 5 dias, (Verrastro, 1996).

O plasma fresco congelado constitui um produto secundário frequente da produção de eritrócitos concentrados e de concentrados de plaquetas. Para a sua obtenção segue-se os mesmos procedimentos usados para obtenção de concentrado de plaquetas.

É armazenado a -30°C ou menos, por até um ano. Pode ser descongelado em Banho Maria entre 30 a 37°C ou por um equipamento específico. Após descongelado pode ser armazenado a 4°C até 24hs. É usado em pacientes com sangramento e deficiência dos factores de coagulação, (Verrastro, 1996).

O fraccionamento do sangue total traz como vantagens o uso optimizado em relação ao aproveitamento e eficácia, aumento do tempo de validade de todos os componentes sanguíneos, além de diminuir consideravelmente o risco da reacção transfusional, (Gudo, 2004).

5.7 Serologia de HIV e HBV

O estágio nesta secção decorreu durante 7 semanas. 4 semanas durante o final de Agosto e início de Setembro, e as restantes três nos finais de Outubro, coincidindo com o final do estágio.

5.7.1 Rastreio de HBV

5.7.1.1 Procedimentos para o uso da técnica ELISA

Para se efectuar este procedimento usam-se materiais providenciados pelo kit- **Healthease (HBsAg EIA)** e amostras contidas no tubo, colhidas na sala de colheita usando da boa prática de colheita e guardadas na geleira a 6-8°C (geralmente no dia anterior). Tiradas as amostras da geleira, centrifuga-se a 3500 Rpm/min, durante 5min, permitindo assim que haja uma separação entre o plasma e o concentrado de hemácias e a seguir arruma-se seguindo a ordem crescente do número de dador.

Levam-se as amostras para o sector de Serologia de HIV e HBV e protocolam-se as mesmas. Enquanto isso, retira-se o Kit- **Healthease (HBsAg EIA)** da geleira e colocam-se os reagentes do mesmo de modo a estabilizar a temperatura ambiente. De acordo com Neomedic (2004), é importante controlar o kit antes de se usar, evitando assim usar reagentes que estejam fora do prazo. Também não se deve usar reagentes que provêm de kits que diferem no número do lote.

Depois de protocoladas as amostras, prepara-se a solução de lavagem, usando uma solução concentrada (tampão), fornecido pelo Kit, diluindo-se assim 25ml de solução e 475ml de água destilada perfazendo assim 500ml de solução de lavagem.

Depois de retirada a microplaca da embalagem, coloca-se directamente (sem pré-lavagem da placa), sucessivamente usando a pipeta monocal:

- 50µl de control negativo nos poços 1B, 1C e 1D.
- 50µl de control positivo nos poços 1E e 1F.
- 50µl de control interno negativo e positivo nos poços 1G e 1H, respectivamente.
- 50µl do soro das amostras dos dadores (uma em cada poço, excluindo os que contêm os controles).

- 50µl do conjugado (um anticorpo anti-HBs policlonal marcado com enzima) em todos poços excepto no A1, usando a pipeta multicanal.

Em seguida, cobre-se a microplaca com uma película autocolante, pressionando bem sobre toda a superfície de forma a ficar uniforme, para evitar evaporação. Daqui, ela é colocada numa incubadora seca durante 60 minutos a 37°C.

Findo o período de incubação, retira-se a película autocolante e faz-se 5 ciclos de lavagem no lavador automático.

Depois tira-se a placa do lavador e certifica-se que nenhum líquido permanece no poço depois da lavagem final, para isso limpa-se com papel absorvente.

Nota-se que a lavagem imprópria da placa, pode conduzir a resultados errados.

A seguir adiciona-se 50µl da solução corante A e 50µl da solução corante B em cada poço, usando a pipeta multicanal e volta-se a cobrir a placa com uma película autocolante e leva-se a incubar a microplaca a 37°C por 15 minutos.

Depois de tirada a placa da incubadora retira-se a película auto-colante e adiciona-se 50µl de solução de paragem (2M de solução de Ácido Sulfúrico) a cada poço e gentilmente fecha-se o poço.

Leva-se a microplaca ao leitor de microplaca e lê-se a densidade óptica a 450nm (único comprimento de onda) ou 450nm & 630 nm como referência (duplo comprimento de onda).

A seguir protocola-se os resultados.

Cálculo dos Resultados e Interpretação dos resultados

Como Absorvância = Control Negativo = NCx, então:

$$NCx = (NC1 + NC2 + NC3)/3$$

$$\text{Valor do Cut-off} = 0.100 + NCx$$

Assim:

- Serão consideradas reactivas (positivas), as amostras cujos valores da Absorvância (NCx) são maior ou igual ao valor do Cut off.

- Serão consideradas não reactivas (negativas), as amostras cujos valores da Absorvância são menor que valor do Cut off.

Os resultados reactivos são confirmados pelo teste rápido.

5.7.1.2 Procedimentos para o teste confirmatório

Segundo Cura & Windel (1994), um resultado do teste positivo não implica necessariamente, a existência do HBV, já que os testes de ELISA podem ter resultados falso-positivos.

Assim, todas as amostras reactivas (positivas) no teste ELISA, são submetidos ao teste confirmatório. O teste aqui usado é o **Teste Rápido Cassette (RCT) para HBsAG (Soro/Plasma)**.

A primeira etapa para a confirmação é a retirada do kit (RCT For HBsAG Soro/Plasma) da geleira à temperatura ambiente para que estabilizem.

A seguir:

- Remove-se o instrumento do teste da embalagem e coloca-se numa superfície plana.
- Enumeram-se as membranas em ordem crescente.
- Segura-se o conta-gotas verticalmente e adiciona-se exactamente 4 gotas do soro ou plasma ao poço do exemplar (kit), marcado por "S".
- Adiciona-se duas gotas de solução tampão.
- Depois de 10 min lê-se os resultados.

Interpretação dos Resultados

- a. **Positivo** – aparecem 2 bandas cor de rosa: uma na região do teste (T) e outra na região do controlo (C). Um resultado positivo indica a presença de HBsAg ≥ 1 mg/ml.

- b. **Negativo** – aparece 1 banda cor de rosa, na região do controlo (C) e nenhuma banda na região do teste (T). Um resultado negativo indica que HBsAg não foi detectado.
- c. **Inválido** – Não se distingue nenhuma banda de cor visível na região do teste, nem na região do controlo, ou existe uma banda visível apenas na região do teste e não na região do controlo. O teste que é invalidado devido a deterioração do mesmo ou por ter sido usado um procedimento inapropriado, deve se repetir com um novo instrumento do teste.

No fim da triagem, descartam-se todas as bolsas de sangue HBV positivas.

5.7.2 Rastreio de HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), é um vírus RNA pertencente à família Retroviridae. Este vírus, é transmitido por via sexual, sanguínea e perinatal. Há dois tipos de vírus descritos (HIV-1 e HIV-2), sendo que o tipo 1 é o mais comum.

A triagem de HIV no BSHCM é feita em simultâneo com a do HBV, usando semelhantemente a técnica ELISA, e do mesmo modo confirmada com testes rápidos.

Segundo Cura e Wendel (1994), os primeiros testes ELISA a serem desenvolvidos, ainda se baseiam em lisados virais (quer dizer, os antígenos utilizados nestes testes são obtidos do próprio HIV, que é cultivado em células).

Estes testes são conhecidos como de primeira geração e têm excelente sensibilidade mas, geralmente, sua especificidade é pouco satisfatória (há muitos resultados falso-positivos).

As provas de ELISA desenvolvidas posteriormente introduziram o uso de antígenos preparados por engenharia genética (antígenos recombinantes) ou por síntese química (peptídeos sintéticos), denominadas respectivamente métodos de 2ª e 3ª geração, (Cura e Wendel, 1994).

Estes testes são igualmente sensíveis, mas mais específicos, se comparados com os testes de 1ª geração. Os fundamentos técnicos dos testes sorológicos empregados na

triagem de anticorpos anti-HIV são similares àqueles descritos para os outros agentes infecciosos, (Cura e Wendel, 1994).

Ainda que os testes utilizados para detectar os anticorpos anti-HIV sejam extremamente sensíveis, específicos e reproductíveis, nenhum é 100% infalível. Portanto, é necessário que os testes de triagem tenham sensibilidade maior que 99,7% e, pelo menos, 97% de especificidade.

Os soros repetidamente reactivos, devem ser analisados com testes suplementares. Para tal, devem ser escolhidos os mais específicos para confirmação do diagnóstico. Os testes mais usados nos bancos de sangue são o Western-blot, Imunoensaio lineares (LIA) e Imunofluorescência indireta, (Cura e Wendel, 1994).

5.8 Triagem de *Treponema pallidum* e Determinação de Isohemolisinas e Isoaglutininas

Durante 3 semanas o estágio foi realizado neste sector.

Depois de efectuada a triagem de HBV e HIV, o sangue é levado a testar a existência do agente causador da Sífilis (*Treponema pallidum*) e a determinação de Isohemolisinas (Imunoglobulinas da classe IgG) e Isoaglutininas (anticorpos do grupo ABO). A Sífilis é essencialmente uma doença venérea, sexualmente transmitida, embora também possa ser transmitida por contacto directo com lesões das mucosas ou de membranas.

O agente causador da Sífilis (a bactéria *Treponema pallidum*), é um membro da classe conhecida como espiroquetas que apresentam um tipo de parede celular flexível, gram negativa, composta por uma membrana externa, uma camada de peptidoglicano e uma membrana interna citoplasmática. A membrana externa contém as proteínas antigénicas da bactéria.

A serologia é o principal método de diagnóstico laboratorial. Existem dois grupos de testes disponíveis: os testes não específicos (testes não treponémicos) e os específicos (testes treponémicos), (Cura e Wendel, 1994).

O BSHCM utiliza o teste Reagina Plasmática Rápida (RPR), um tipo de teste não específico (não treponêmico), que possui uma substância denominada cardiopina que contém micropartículas de carvão.

Este antígeno (RPR), detecta um anticorpo contra o *T. Pallidum* denominado reagina que está presente no soro dos doentes de sífilis. A reagina co-aglutina com as micropartículas de carvão formam grumos pretos, quando a reacção é positiva, cujo tamanho depende do título da amostra.

A reacção negativa apresenta uma coloração cinzenta homogénea, permanecendo assim inalterada. Como nenhum dos testes utilizando cardiopina é muito específico, a presença de anticorpos não específicos, podem levar a reacções falso-positivas.

A determinação de Isoaglutininas e de Isohemolisinas (prova reversa), é feita do mesmo modo que é realizado na Tipagem ABO/Rh.

6. PERSPECTIVAS CRÍTICAS SOBRE OS PROCESSOS DE TRABALHO DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O estágio não foi realizado com o objectivo de identificar erros, mas ao longo da realização do estágio, verificaram-se algumas situações que pela sua relevância a estagiária julga importante incluir neste relatório.

1. Durante o estágio, foi possível notar que depois de colhido, o sangue é levado para o laboratório para efeitos de determinação do grupo sanguíneo e a seguir a produção de hemocomponentes e só depois (normalmente no dia seguinte), é que se realiza a triagem dos agentes infecciosos.

Este trajecto parece pouco razoável pois a produção de hemocomponentes é feita antes de se saber se o sangue é viável, i. é, só se sabe da viabilidade do sangue, depois de produzidos os respectivos hemocomponentes.

Caso se verifique que determinado sangue não é viável, recolhem-se todos os hemocomponentes previamente produzidos, e devidamente conservados, para serem inutilizados.

O descarte dos hemocomponentes inviáveis é feita pela identificação do número do dador, e ao longo deste processo alguns destes podem não ser descartados por esquecimento. Esta tarefa e o risco envolvido, podem ser evitados se a produção de hemocomponentes for feita após a realização da triagem dos agentes infecciosos.

2. A prova de compatibilidade é um conjunto de procedimentos necessários realizar antes que o sangue possa ser definido como compatível. Este teste é executado para garantir que não há anticorpos presentes no soro do paciente que reajam contra as células do dador após a transfusão, impedindo assim que hajam reacções adversas.

Esta prática envolve uma série de etapas que devem ser seguidas para garantir a credibilidade e segurança necessárias para uma transfusão eficaz. Para o efeito, existe uma lista de procedimentos de rotina a disposição dos técnicos envolvidos nesta actividade (Anexo 1).

Os procedimentos podem no entanto segundo a OMS -Módulo 2 (1993), ser encurtados em caso de emergência, situação em que a prova pode terminar após a leitura na etapa imediata de centrifugação, se não se encontrar nenhuma aglutinação.

Porém, alguns técnicos envolvidos na actividade de realização de testes de compatibilidade de rotina no BSHCM, não concluem a realização dos respectivos testes e por vezes reduzem o período de incubação. A redução do período de incubação pode, às vezes, ser perigosa pois limita a identificação de anticorpos IgG, facto que pode contribuir para uma reacção transfusional.

Ao longo do período de estágio, verificou-se que por diversas vezes o teste de Coombs, que deve ser feito para validar ou invalidar todo teste, não é realizado, não se identificando deste modo a presença ou não de anticorpos irregulares no soro do dador.

A não realização de todo o teste pode implicar a transfusão de sangue incompatível e provocar uma reacção transfusional que pode levar a morte do receptor.

3. Foi igualmente notável, a negligência de alguns técnicos envolvidos no processo de realização dos testes de compatibilidade, pois estes testes não são imediatamente efectuados quando solicitados pelos médicos. O pessoal não parece se importar muito com o fato de haverem doentes esperando pelos resultados e pelo sangue, tratando muitas vezes dos seus assuntos pessoais em detrimento das actividades da instituição.

4. Os vírus de hepatite B e C (HBV e HCV) são passíveis de transmissão por transfusão sanguínea.

Segundo a OMS- Módulo 2 (1993), o HCV que pode também ser adquirido por uso de drogas injectáveis, é a causa mais comum de hepatite pós transfusional, respondendo por cerca de 90% dos casos em países desenvolvidos. Por isso a sua triagem nos bancos de sangue é fundamental e é feita pela maioria dos laboratórios do mundo.

Porém durante o estágio no BSHCM, observou-se que este banco não realiza a triagem de HCV, realizando de forma rotineira apenas a do HBV.

Segundo Cura e Wendel (1994), 80% do HCV evolui para uma hepatite crónica diferentemente de HBV em que apenas 5% evolui para a cronicidade. Assim, a não realização de HCV pode estar a contribuir para o aumento da disseminação desta doença por meio de transfusões sanguíneas.

5. O trabalho efectuado pelo banco de sangue é negativamente afectado pelo deficiente equipamento existente no banco de sangue, especificamente o computador onde se fazem os registos do dador, e a máquina de escrever para fazer cartões.

O equipamento deficiente torna moroso o trabalho, fazendo com que os dadores tenham que constantemente se dirigir ao banco de sangue para o levantamento dos cartões, pois os mesmos demoram a ficar prontos.

Quando o computador não funciona por falta de sistema, os dados são conservados em papéis provisórios para efeitos de posterior inserção no computador, e enquanto isso não acontece os dados podem ser perdidos pois não têm um lugar específico de arquivo, agravado pela demora no restabelecimento do sistema.

7. CONCLUSÃO

O estágio realizado no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, permitiu a estagiária obter conhecimentos práticos das técnicas usadas para o processamento do sangue, com especial ênfase no rastreio do Vírus da Hepatite B, onde conheceu, compreendeu e aprendeu a executar testes para a triagem de HBV usando a técnica ELISA e testes rápidos.

Esta aprendizagem permitiu a estagiária compreender o que já tem sido dito por vários autores, que a técnica ELISA, desempenha um papel muito importante no laboratório clínico, pois, além da elevada sensibilidade, apresenta as vantagens de utilizar reagentes estáveis, ser aplicável a um grande número de amostras, estar livre das exigências de trabalhar com radioisótopos, ter custos relativamente baixos e poder ser adaptado tanto a testes simples como à automação sofisticada. É importante sublinhar porém que a técnica por si só não garante a inexistência dos agentes infecciosos nas unidades de sangue, pois ela pode dar resultados falso-positivos, sendo necessário para tal, confirmar o seu diagnóstico usando testes rápidos que sejam altamente específicos.

Também foi possível através do estágio adquirir habilidades técnicas para o rastreio de HIV e *Treponema pallidum*, para a tipagem ABO/Rh, Provas de Compatibilidade e Produção de Hemocomponentes.

Este período de prática pré-profissional foi muito gratificante, pois permitiu adquirir e consolidar conhecimentos teóricos, práticos, habilidades profissionais, tendo a estagiária aprendido a necessidade da capacidade do trabalho em equipe, a importância da boa execução de técnicas do Laboratório e principalmente a relevância dos serviços do BS no processo da transfusão sanguínea.

Permitiu ainda reconhecer a importância e a relevância das actividades desenvolvidas por um banco de sangue, sendo importante ressaltar o entendimento de que não é somente o rastreio dos agentes infecciosos e a prova de compatibilidade que garantem uma transfusão segura, mas também todos os processos que antecedem a realização dos respectivos testes, desde a triagem dos doadores a separação dos hemocomponentes e a maneira como estes processos são realizados.

8. RECOMENDAÇÕES

A selecção de dadores representa uma tarefa indispensável para a segurança transfusional, por isso recomenda-se maior cuidado no processo de selecção dos mesmos e cumprimento das normas, efectivando o historial médico de cada dador.

Para se evitar erros e má execução dos testes, recomenda-se que haja manutenção periódica dos equipamentos usados rotineiramente.

A doação de reposição não reduz o risco de transmissão de doenças, pois, os dadores repositores podem ser, em certas ocasiões menos seguros, pelo facto de não serem verdadeiramente voluntários e poderem ter motivos fortes para serem relutantes a revelarem informações que os excluam da doação. Assim sendo, recomenda-se que não se encorajem esses tipos de doações. Por outro lado, recomenda-se que haja um tratamento privilegiado aos dadores voluntários, incentivando deste modo a doação voluntária, dado que é a que menos risco apresenta.

Como a garantia de qualidade é um processo essencial para que os laboratórios possam fornecer resultados exactos e precisos, de modo a que sejam prestados os melhores cuidados aos doentes, recomenda-se a execução de um Programa de Controlo de Qualidade Externo dos serviços de Imuno-Hematologia, geridos pelos responsáveis dos laboratórios de imuno-hematologia visando a padronização dos testes e a diminuição dos erros, indo ao encontro do seu principal objectivo – a segurança transfusional.

Recomenda-se também que haja um controlo de qualidade interno (supervisão), de modo a evitar erros negligenciais; e que tanto o pessoal técnico, responsável pela execução dos procedimentos de diagnóstico e controlo de qualidade, como o pessoal de apoio que realiza as tarefas de limpeza e manutenção sejam competentes, e conheçam claramente seu papel na equipe de trabalho, assim como o papel do conjunto do laboratório.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alquézar, A. S. (1995). Triagem Serológica em Unidades Hemoterápicas, Google, [<http://www.hemonline.com.br>], consultado a 05 de Maio de 2007.
- Calvante, T.A. (2006). O Sangue e seus Derivados. [www.hemonline.com.br] Consultado a 15 de Maio de 2007.
- Cura E. e S. Wendel (1994). Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serologia de los Bancos de Sangre. OPAS, Washington D.C.
- Ferreira, A. W., e S. L. M, Ávila (1996), Diagnóstico Laboratorial, "Avaliação de Métodos de Diagnóstico das Principais Doenças Infecciosas e Parasitárias e Auto-Imunes". Correlação Clínico-Laboratorial", pg 17-20, 37-39, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.
- Fischbach, F.T. e M.B. Dunning III (2005). Manual de Enfermagem: 'Exames Laboratoriais e Diagnóstico', 7 edição, pg 25 e 305, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.
- Gudo, J.S. (2004). Normas Sobre a Prática Clínica Transfusional em Moçambique, 12 e 13pp, MISAU-DNS, Maputo.
- Gudo, J. S. (2006). Comunicação pessoal. Director do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo.
- Guyton, A.C., J.E. Hall (2005). Textbook of Medical Physiology, 11ª edição. 418 – 430pp. Elsevier.com.
- Ministério da Saúde - Banco de Sangue (1996), Manual de Imunohematologia, 142pp, MISAU, Maputo- Moçambique.
- Murray, P.R., K.S. Rosenthal., G.S. Kobayashi e M.A. Pfaller (2004). Microbiologia Médica, 4 edição, 560-564pp, Editora Guanabara Koogan.
- Neomedic (2004). Rapid Cassette Test for HBsAG (Serum/Plasma), "Healthease", NHBC V1, South Africa

- Neomedic (2005). HBsAg EIA , "Healthease", NHBEIA V2, South Africa.
- OMS- STS. (1993). "Sangue e Produtos Sanguíneos Seguros"; Triagem para HIV e outros Agentes Infecciosos, Modulo 2, S/Edição, pg 15-21 , Editora OMS, Genebra.
- OMS- STS. (1993), "Sangue e Produtos Sanguíneos Seguros"; Sorologia dos Grupos Sanguíneos, Modulo 3, S/Edição, pg 26; 37, Genebra, Editora OMS.
- Razouk, F. H. e E.M. Reiche (2004). Characterization, Production and Indication of the principal blood components, Vol.26. no.2 Rev. Bras. Hematol. Hemoterp, 126-134.
- Razouk, F. H. e E.M. Reiche (2004). Characterization, Production and Indication of the principal blood components, Vol.26. no.2 Rev. Bras. Hematol. Hemoterp, 126-134.
- Rodrigues, D., L.F. Bricks., R. Resegue (1996), Hepatite B: Imunização Universal, 18 (2):83-90, 1996
- Verrastro, T., T. Lorenzi, N. Wendel (1996).Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. São Paulo.Ed. Atheneu, 237-293.

ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO PARA AS PROVAS DE COMPATIBILIDADE

- PROVA DE COMPATIBILIDADE ROTINA (MAIOR)

Teste no tubo

Material: - Soro do doente
- Suspensão do dador }lavado 1 vez
- Suspensão do doente }lavado 1 vez
- Soro de Coombs
- Albumina a 30%

Procedimentos

- Marcar 2 tubos- teste 1 e teste 2
- Pôr no tubo 1: 2 gotas do soro do doente
1 gota de suspensão do dador
3 gotas de Albumina
- Pôr no tubo 2 (auto-control):
2 gotas do soro do doente
1 gota de suspensão do doente
3 gotas de Albumina
- Misturar bem e levar a centrifugar a 30`LOW
- Ler e observar, se for negativo
- Incubar a 30-40 min em Banho Maria a 37°C
- Centrifugar a 30`LOW
- Ler e observar, se for negativo
- Lavar 3 vezes com soro fisiológico
- Juntar 2 gotas de soro Coombs
- Centrifugar a 30`LOW
- Observar

Fazer Coombs- control, se for negativo, o teste é inválido

- PROVA DE COMPATIBILIDADE ROTINA COM LISS (MAIOR)

Teste no tubo

Material: - Soro do doente
- Suspensão do dador } lavado 1 vez
- Suspensão do doente } lavado 1 vez
- Soro de Coombs
- LISS

Procedimentos

- Marcar 2 tubos- Tubo control (1) e Tubo teste (2)
- Pôr no tubo 1: 2 gotas do soro do doente
1 gota de suspensão do dador
5 gotas de LISS
- Pôr no tubo 2 (auto-control):
2 gotas do soro do doente
1 gota de suspensão do doente
5 gotas de LISS
- Misturar bem e levar a centrifugar a 30``LOW
- Observar, se for negativo
- Incubar a 10 min em Banho Maria a 37°C
- Centrifugar a 30``LOW
- Observar, se for negativo
- Lavar 3 ou 4 vezes com soro fisiológico
- Juntar 2 gotas de soro Coombs
- Centrifugar a 30``LOW
- Observar, se for negativo – Compatível
- Fazer Coombs-control, se for negativo – Teste inválido

ANEXO 2: CRITÉRIOS DE SELECÇÃO ATRAVÉS DO HISTORIAL MÉDICO

Questionário	Resposta		Se sim, especificar se necessário
	Sim	Não	
Perguntas de exclusão definitiva*			
Tem idade superior a 65 anos?			
Tem alguma doença sem cura (crónica)?			
Alguma vez foi suspeito de ter HIV?			
Alguma vez teve Hepatite/Icterícia?			
Alguma vez teve doença venérea?			
Pertence a um grupo de risco de infecção por HIV (ex.: Injecta-se drogas, tem relações sexuais ocasionais sem protecção, fez vacinas tradicionais com lamina usadas por mais de uma pessoa, transfusões repetidas, etc.)?			
Perguntas de exclusão temporária**			
Sabe que uma pessoa com HIV/SIDA não pode doar sangue?			
Tem doenças do Sistema Cardiovascular (ex.: Dor precordial)?			
Tem doenças do Sistema Respiratório (ex.:Asma)?			
Tem doenças do sistema Gastrintestinal (ex.:Úlcera péptica)?			
Tem doenças do Sistema Musculoesquelétrico/Articular?			
Tem doenças do Sistema Genitourinário?			
Tem doenças do Sistema Endócrino (ex.:Diabetes)?			
Tem doenças do sistema Imunitário (Ex.:Alergias)?			
Tem doenças do Sangue (ex.:Hemofilia)?			
Tem febre?			
Está grávida (para mulheres)?			
Está a tomar algum medicamento?			
Foi vacinado nas últimas 4 semanas?			
Foi operado nos últimos 6 meses?			
Alguma vez foi-lhe recusado doar sangue?			
EXAME FÍSICO			
			Sim
			Não
Verifica se tem sinais de doença infecciosa.			
Tem tensão arterial superior 150/100mmHg ou inferior a 90/70mmHg?			
Tem pulso superior a 120 bpm ou inferior a 60bpm?			
Tem Peso inferior a 50Kg?			
Tem Hemoglobina inferior a 12,5 gr/dl?			

(*) INFORMAR AO DADOR QUE NUNCA MAIS PODERÁ DOAR SANGUE EM LUGAR ALGUM.

(**) RESOLVIDO O "CASO" VOLTA A DOAR, MAS PODERÁ SER EXCLUÍDO DEFINITIVAMENTE, SE O CLÍNICO ASSIM DECIDIR.

Fonte: Sala de inquérito (BSHCM)