

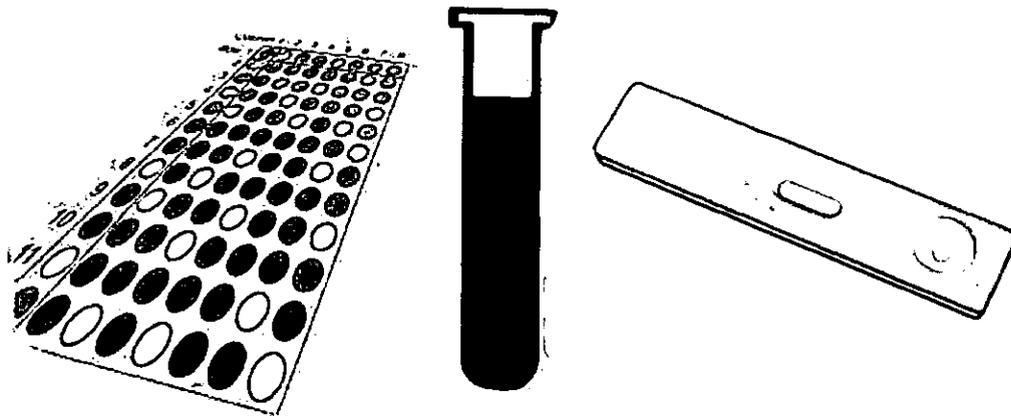
B10-96



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

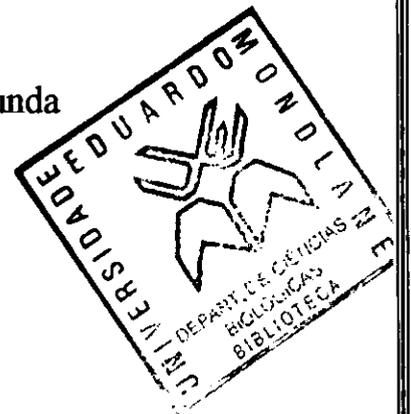
Trabalho de Culminação de Curso
(Estágio)

USO DA TÉCNICA ELISA E TESTES RÁPIDOS
PARA TRIAGEM DE HIV NO BANCO DE SANGUE
DO HOSPITAL CENTRAL DO MAPUTO



Autor: Nédio Eugénio Jonas Mabunda

Maputo, Novembro de 2006





UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Culminação de Curso

(Estágio)

**USO DA TÉCNICA ELISA E TESTES RÁPIDOS
PARA TRIAGEM DE HIV NO BANCO DE SANGUE
DO HOSPITAL CENTRAL DO MAPUTO**

**Autor: Nédio E. J. Mabunda Supervisores: Dr. Joel Samo Gudo
dr^a. Sandra Silva**

Maputo, Novembro de 2006



Dedico este trabalho:

aos meus pais, Jonas Eugénio Mabunda e Antonieta David Mbeve, pelo estímulo, apoio e carinho incondicionais durante o meu percurso estudantil.

Agradecimentos

À dra. Sandra Silva, pela orientação competente, críticas e sugestões que me foram concedidas durante a realização do presente trabalho.

À Direcção do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, que abriu as portas para realização do estágio.

Ao Dr. Joel Samo Gudo, pelo apoio e orientação prestados na realização deste trabalho.

À dra. Paula Machava, pela revisão do trabalho.

À todos funcionários do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, que contribuíram para minha aprendizagem e conclusão deste trabalho, em especial a Celsa, Dona Adelaide, Enfermeira Teresa, Sr. Elias, Cristina, Isaura, Abílio, Ildo, Yolanda e Salomé.

À dra. Evelina e Tenório, pela orientação, conselhos preciosos e sugestões inestimáveis durante o estágio.

Aos meus irmãos Clésia e Dudú pelo apoio dado durante o percurso estudantil.

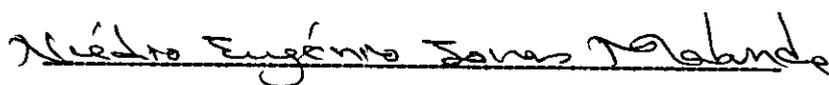
À meus amigos, em especial a Stélio, Dodó, Mayela Figia, Flávio Faife, Tshwpily, Ângelo Augusto, Joaquim Chivambo, Gloria, Laurinha, Levin Cufnica, Teofilo Mabunda, Túlio Chongo e Dalito, pelas horas que não passamos juntos, pelas coisas que deixamos de fazer, pelo apoio moral e compreensão.

À todos meus colegas que ingressaram no Departamento de Ciências Biológicas no ano 2002/2003, pela amizade concedida.

E a todos que directa ou indirectamente colaboraram para a concretização desse trabalho.

Declaração de Honra

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



(Nédio Eugénio Jonas Mabunda)

Maputo, Novembro de 2006

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-HIV - Anticorpo contra as proteínas do HIV

Anti-HBs - anticorpo contra antígeno de superfície do vírus da hepatite B

BS - Banco de Sangue

BSHCM - Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo

CVM - Cruz Vermelha de Moçambique

DNA - Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunossorbente Ligado a Enzima)

FDA - Food and Drug Administration (Agencia norte Americana de regulamentação de produtos alimentares e farmacêuticos)

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HCM - Hospital Central de Maputo

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus de Imunodeficiência Humana)

HTLV - Vírus Linfotrópico Humano

MISAU -Ministério da Saúde

PNTS - Programa Nacional de Transfusão de Sangue

p24 - Proteína do cápside do HIV

RPR - Rapid Plasma Reagin (Reagina Plasmática Rápida)

OMS - Organização Mundial da Saúde

SSCV - Sociedade Suíça da Cruz Vermelha

SIDA\AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

Resumo

O presente trabalho de culminação de curso teve como suporte um estágio de 6 meses no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo. O referido estágio teve como objectivos aprender as técnicas para o processamento do sangue, com particular ênfase no rastreio do HIV.

Além do rastreio do HIV, outras actividades realizadas durante o estágio foram: o rastreio de Hepatite B e da Sífilis, produção de hemocomponentes, tipagem sanguínea e testes de compatibilidade.

Para a concretização dos objectivos a metodologia aplicada foi pesquisa bibliográfica, observação e execução das técnicas.

Após o estágio, conclui que o Banco de Sangue garante a segurança transfusional e que a técnica ELISA, por ser altamente sensível, é ideal para triagem de dadores. Não obstante a sua eficácia, ela tem como maior limitação o não diagnóstico de infecções contraídas nas primeiras duas semanas do período de janela.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iv
Resumo.....	v
1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	3
1.2 Historial do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo.....	5
2. PROGRAMA DE ESTÁGIO PREVIAMENTE DETERMINADO.....	7
2.1 OBJECTIVOS.....	7
2.1.1 Geral:.....	7
2.1.2 Específico:.....	7
3. APOIO CONCEDIDO AO ESTUDANTE POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
5. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	18
5.1 Metodologia utilizada.....	18
5.2 Rastreio de HIV.....	19
5.2.1 Teste ELISA.....	19
5.2.2 Teste Rápido (Teste confirmatório).....	21
5.3 Outras Actividades.....	22
5.3.1 Rastreio de Hepatite B.....	22
5.3.2 Rastreio de Sífilis.....	23
5.3.3 Produção de Hemocomponentes.....	24

5.3.4 Tipagem ABO/Rh.....	24
5.3.5 Testes de compatibilidade	25
5.3.6 Recepção, Sala de inquérito.....	25
5.3.7 Sala de Colheita	25
6. PERSPECTIVA CRÍTICA SOBRE OS PROCESSOS DE TRABALHO NA UNIDADE DE ESTÁGIO.....	26
6.1 Pré - triagem (Inquérito)	26
7. CONCLUSÃO	28
8. RECOMENDAÇÕES	29
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS.....	33
Anexo 1: Cronograma do estágio	34
Anexo 2: Critérios de selecção através do Historial Médico	35
Anexo 3: Relatório apresentado sobre a produção de Hemocomponetes.....	36
Anexo 4: Relatório apresentado sobre o uso das técnicas ELISA e testes rápidos para triagem de HIV	52

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Organograma do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo.....	3
Figura 2: História natural do HIV.....	11
Figura 3a: Captura e detecção de anticorpo.....	14
Figura 3b: Captura e detecção de antígeno.....	14
Figura 4: Comportamento do p24 na infecção pelo HIV.....	16
Tabela 1: Diminuição do período de janela dos testes ELISA.....	16

1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo (BSHCM), fica situado no Bairro da Polana Cimento, na Avenida Agostinho Neto, número 1164. Este tem como actividade principal a coleta e o processamento de sangue (triagem e produção de hemocomponentes) bem como o acompanhamento médico dos dadores.

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

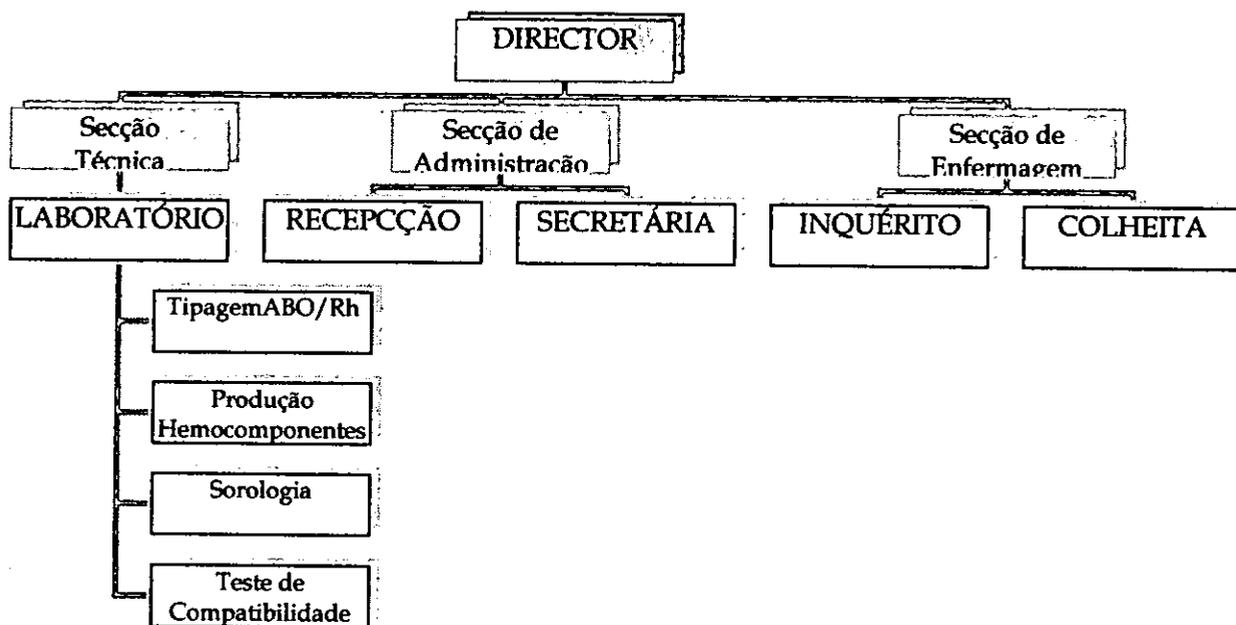


Fig.1: Organograma do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo

Fonte: Elaborado pelo autor com base na informação tida da secção técnica e Administração

- **Recepção** (Secção de Administração), é onde são registados os dados do dador (nome, sexo, endereço, profissão, a causa da doação - voluntário/repositor, e outras);
- **Sala de inquérito** (Secção de Enfermagem) , onde é feita uma avaliação preliminar do estado de saúde dos dadores (sinais de alguma doença, pressão sanguínea, peso, altura, nível de hemoglobina) e o seu historial médico. Faz se uma pré-triagem do dador.
- **Sala de colheita** (Secção de Enfermagem), lugar onde é colhido o sangue do dador (em caso de colheita feita no centro).
- **Laboratório** (Secção Técnica), neste local o sangue segue o seguinte trajecto: Tipagem ABO/Rh, Produção de hemocomponentes, Triagem de HIV e Hepatite B, Triagem de Sífilis, Isoaglutininas, Isohemolisinas e Provas de compatibilidade.

1.2 Historial do Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo

Falar da história do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo é falar da história dos Bancos de Sangue de Moçambique, dado que este foi o primeiro Banco de Sangue do país, e continua sendo o Banco de Sangue de referência a nível nacional.

Durante o período colonial, a transfusão de sangue era feita com base em doação familiar e através de doação remunerável. No entanto, em 1975 após a independência, a doação remunerável foi abolida (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

Em 1979 foi estabelecido um acordo bilateral de cooperação entre o Governo de Moçambique e a Cooperação Suíça, para apoio na área de Saúde. Um ano depois (1980) foi enviado um consultor da Federação Internacional da Cruz Vermelha, para uma primeira avaliação da situação transfusional (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

Em 1982 foi enviada uma consultora para segunda avaliação, cujos resultados culminaram num acordo tri-lateral em 1983 entre o Ministério da Saúde (MISAU), Cruz Vermelha de Moçambique (CVM) e Sociedade Suíça da Cruz Vermelha (SSCV), assim como, num pedido de apoio financeiro à Cooperação Técnica Suíça. Este acordo constituiu a primeira fase (1984-1985) e tinha como principais objectivos a criação do Programa de Sangue (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

Em 1984 com apoio da SSCV foi estabelecido o Programa Nacional de Transfusão de Sangue (PNTS) (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

A segunda fase do acordo tripartido foi estabelecida entre o período 1986-1987, e tinha como principais objectivos a melhoria da capacidade de realização de testes

de grupo sanguíneo, aumento do número de doações e a redução da dependência do país em material importado para a transfusão de sangue. Neste período, a mobilização de doadores de sangue era feita com a colaboração da CVM e a testagem de sangue era apenas feita para Sífilis (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

A terceira fase do acordo tripartido, foi assinada para os anos 1988 e 1990, e estabelecia a instalação de Bancos de Sangue a nível das capitais provinciais e a introdução do despiste de HIV nas unidades de sangue (Gudo, em comunicação pessoal, 2006).

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

2. PROGRAMA DE ESTÁGIO PREVIAMENTE DETERMINADO

O programa de estágio previamente determinado consistia na apreciação dos trabalhos desenvolvidos no Banco de Sangue, com especial atenção no laboratório - área de triagem de HIV e Hepatite B (anexo 1).

Por causa da introdução de novo equipamento para a triagem de HIV e Hepatite B no BSHCM, o estágio prolongou por mais um mês. O crescimento de um (1) mês no período antes determinado visava a apredizagem do manuseamento do equipamento.

Deste modo, o estagiário cumpriu um mínimo de 500 (quinhentas) horas no Banco de Sangue (estágio de 6 meses: de 27 de Março a 30 de Setembro de 2006).

2.1 OBJECTIVOS

2.1.1 Geral:

O objectivo geral materializou-se na:

- Aprendizagem das técnicas para o processamento do sangue, em particular ênfase no rastreio do HIV.

2.1.2 Específico:

Os objectivos específicos foram:

- Conhecer, compreender e saber executar testes de HIV usando a técnica ELISA e testes rápidos.
- Adquirir habilidades técnicas para o rastreio de Hepatite B e *Treponema pallidum*.
- Adquirir habilidades técnicas para realização de grupos sanguíneos, provas de compatibilidade e produção de hemocomponentes.

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

Para a consolidação do trabalho, o estagiário teve o apoio imprescindível da unidade de estágio: fornecimento de literatura sobre funcionamento de um banco de sangue, de manuais dos testes realizados no laboratório, acesso aos computadores com internet, impressão e fotocópia de diversos documentos. A unidade de estágio responsabilizou-se, também, em fornecer refeições durante o exercício das actividades.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sangue é um tecido vivo, composto por uma parte líquida - o plasma - constituída por água, sais minerais, vitaminas e factores de coagulação, e uma parte sólida - (hemácias, leucócitos e plaquetas) (Costanzo, 1999).

O sangue e seus produtos, são utilizados em uma série de propósitos, mas as três principais razões para a transfusão são: correção da anemia (baixo nível de hemoglobina); 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, 1993).

Os efeitos benéficos do sangue têm sido reconhecidos através dos séculos. A triagem de doadores de sangue, tanto clínica como laboratorial, já se caracterizou como um procedimento de importância inquestionável para garantir a segurança transfusional, minimizando seus riscos (Marques, 1994).

Apesar dos avanços que nos podem ser fornecidos por um Banco de Sangue, em todo mundo a transfusão de sangue é associada a algum risco; por isso o processo está sendo empregue apenas quando o perigo da não aplicação da transfusão excede o risco calculado das complicações desta (Leavell & Thorup, 1979).

A transmissão de certos agentes infecciosos (como HIV, *Treponema pallidum*, Hepatite B e C, HTLV) através da transfusão de sangue pode ocorrer e ocorre, sendo uma importante via de infecção. Esta transmissão pode ser prevenida na maior parte dos casos pela elaboração e uso de programas apropriados de triagem.

Apesar de a maioria das transmissões do HIV acontecerem por via sexual, a contaminação por transfusão sanguínea é também preocupante. O risco de se contrair o HIV por meio de transfusão sanguínea no final da década de 80 era de 2 a 5% (Nascimento & Pereira, 2004). A eficiência da transmissão deste vírus através das transfusões é estimada ser superior a 90 % (OMS, 1993).

O primeiro caso aparente do HIV associado a transfusão sanguínea foi reportado numa criança que tinha recebido uma transfusão de sangue em 1981, desde então vários casos foram reconhecidos entre os adultos (Dodd, 1986).

A avaliação do sangue desde a procura de anticorpos anti-HIV, inativação do vírus pelo calor dos concentrados do factor de coagulação e a exclusão mais rígida dos doadores sob risco de SIDA, desde 1985, reduziram o risco de HIV associada à transfusão. Entretanto, um risco muito pequeno de adquirir HIV por transfusões de sangue persiste (Friedland & Klein, 1987).

O Vírus da Imunodeficiência humana (HIV) pertence à família Retroviridae, subfamília Lentivirinae, género *Lentivirus* (Coffin, 1993), o qual é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, SIDA, uma das doenças de grande preocupação médica e social (Wei et al., 1995).

Existem dois retrovírus capazes de levar à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, o HIV-1 e o HIV-2. Este último tem sido descrito em diferentes regiões do mundo, mas sempre, em indivíduos que tiveram algum contacto com o continente africano ou sua população. Em ambos, na infecção inicial há, geralmente, um aumento significativo da virémia, posteriormente inibida pela activação da resposta imune. As subseqüentes concentrações no plasma reflectem o equilíbrio alcançado entre o vírus e o hospedeiro, que pode durar por

alguns anos. Esse nível de interacção varia de pessoa para pessoa e pode ser predativo de um curso clínico de longa duração. Nessa fase clinicamente estável, indivíduos infectados geralmente apresentam níveis de virémia baixos e persistentes e uma depleção gradual de linfócitos T CD4 (+) que pode levar a uma severa Imunodeficiência, ao aparecimento de múltiplas infecções oportunistas, a neoplasias e à morte (Fig. 2) (Machado & Costa, 1999).

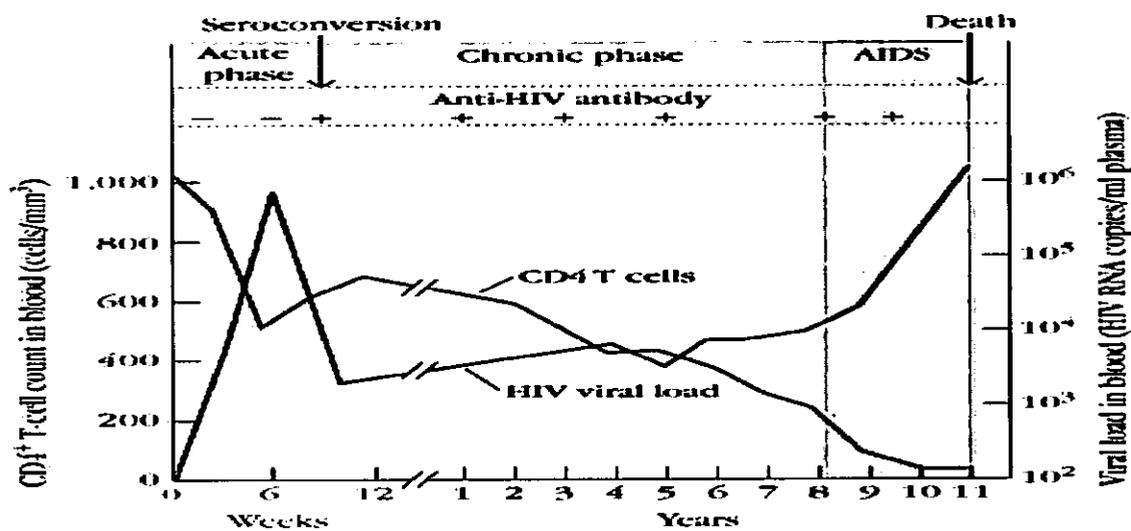


Fig. 2: História natural do HIV

Fonte: Adaptado de www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/HIV.pdf

O HIV é um retrovírus que se integra ao genoma da célula hospedeira. O vírus consiste de uma série de proteínas estruturais, mas a p24 e gp41 são as mais imunogénicas e são, portanto, as mais importantes para a sorologia viral. (OMS,1993).

A presença do HIV no sangue, sêmen e secreções vaginais de pessoas infectadas e o longo período de incubação são factores que promoveram a transmissão da doença por contacto sexual e exposição a sangue e hemoderivados contaminados. O vírus também pode ser transmitido no período perinatal a recém-nascidos (Murray et al., 2004).

Os testes para infecção por HIV são realizados por quatro razões: para identificar pacientes com infecção, de modo que se possa aplicar o tratamento com drogas antivirais, identificar portadores que podem transmitir a infecção a outras pessoas (particularmente doadores de sangue ou de órgãos, mulheres grávidas e parceiros sexuais), para estudos epidemiológicos e para confirmar o diagnóstico de SIDA (Murray et al., 2004).

A natureza crónica da doença (SIDA) permite o uso de testes sorológicos para documentar a infecção por HIV (Murray, et al., 2004). O primeiro teste foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1985 e é baseado na técnica ELISA, que ainda hoje continua a ser o mais usado. No entanto vários testes: serológicos, virulógicos e por biologia molecular podem ser usados (MISAU, 1996).

De acordo com a OMS (1993) os três tipos principais de triagem primária disponíveis para a detecção do anti-HIV (Ensaio de aglutinação de partículas, Ensaio imunoenzimáticos e Ensaio rápidos especializados) baseiam-se no mesmo princípio biológico, e envolvem as mesmas duas etapas básicas: a presença de antígenos ou anticorpos específicos numa amostra é demonstrada por intermédio de uma reacção imunológica padrão, envolvendo a formação de um complexo (imunológico) antígeno/anticorpo, com um dos componentes ligados à uma superfície fixa. A formação do complexo imunológico é posteriormente detectado por um sistema indicador.

A técnica ELISA tem sido um sucesso como método de rotina no rastreio de anti-HIV em doadores de risco (MISAU, 1996). Esta técnica é usada para detectar antígenos e/ou anticorpos específicos. Pode ser usada ainda para detectar um

antígeno/anticorpo particular e para quantificar a quantidade do antígeno (Brostoff et al., 1998).

Testes sorológicos para triagem de doadores de sangue devem apresentar alta sensibilidade evitando ao máximo a presença de resultados falso-negativos. Actualmente, os testes utilizados na triagem sorológica são em sua maioria, métodos imunoenzimáticos (ELISA) que permitem boa padronização, condições de automação, resultados rápidos e seguros (Castro et al., 2004).

Existem duas apresentações básicas de ELISA, que se baseiam nos mesmos princípios, mas diferem na forma como o antígeno viral está imobilizado:

- a) Sobre a superfície de micro-cavidades de poliestireno, apresentação de microplacas com 96 poços.
- b) Sobre uma pequena pérola de poliestireno, de aproximadamente 4mm de diâmetro - apresentação de 20 ou 60 poços (OMS, 1993).

Os ensaios em micro-poços podem ser do tipo antiglobulina, competitivo e sanduíche. Este último, baseia-se num tipo altamente específico de ELISA, 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 (Fig. 3) (OMS, 1993).

De acordo com Brostoff et al. (1998), as placas dos testes ELISA para triagem de HIV podem ser sensibilizadas com anticorpos ou antígenos. Nas placas sensibilizadas com antígenos detecta-se anticorpos, enquanto que nas placas sensibilizadas com anticorpos detecta-se antígenos (Figs. 3a e 3b).

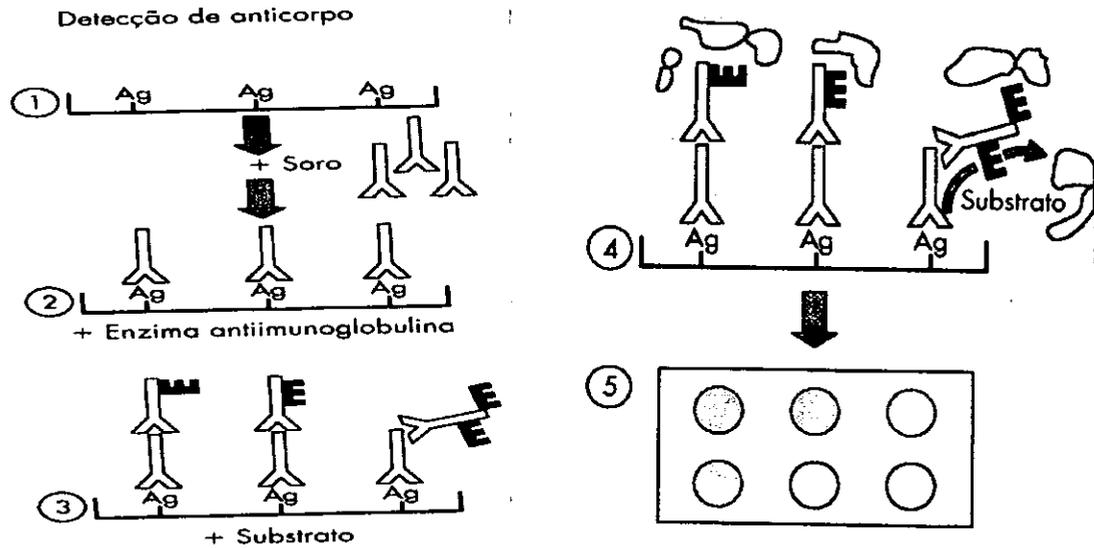


Fig. 3a: Detecção de anticorpo 1. Um antígeno viral é fixado a uma superfície sólida. 2. O soro do paciente é adicionado e se liga ao antígeno. O antígeno não ligado é removido por lavagens. 3. É adicionada anticorpo anti-humano conjugado a enzima, e o anticorpo não ligado é removido 4. Adiciona-se o substrato, junto a um cromóforo (consumidos pela enzima com subsequente mudança de cor). Fonte: (Murray, et al., 2004)

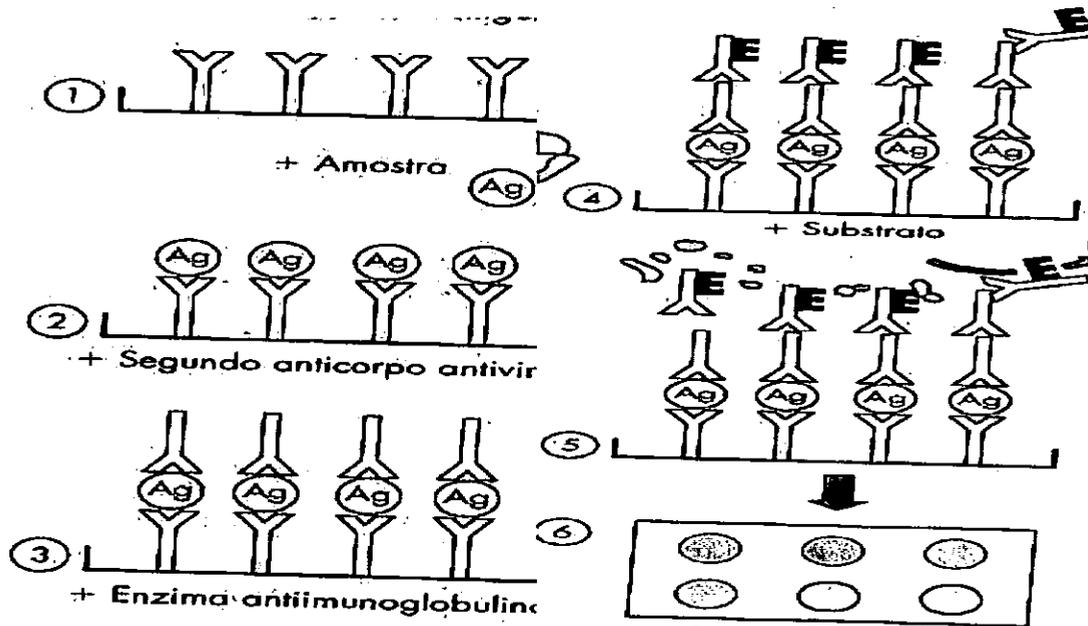


Fig.3b: Captura e detecção do antígeno. 1 O anticorpo antiviral é fixado a uma superfície sólida. 2. Adiciona-se uma amostra contendo o antígeno, e o antígeno não ligado é removido. 3. Adiciona-se o segundo anticorpo antiviral para detectar o antígeno capturado. 4 O anticorpo anti-humano

conjugado a enzima é adicionado, removido o excesso e seguido de, 5 substrato junto a um cromóforo (consumidos pela enzima com subsequente mudança de cor). Fonte: (Murray et al., 2004)

Os primeiros testes ELISA para HIV usavam antígenos procedentes de células lisadas (infectadas com o vírus), sensibilizando a fase sólida dos ensaios e anticorpos anti-imunoglobulina humana policlonais conjugado a uma enzima (testes de 1ª geração). No entanto, anticorpos dirigidos contra esses antígenos causavam frequentemente reatividade não específica. A utilização de antígenos preparados por técnicas de DNA recombinante (testes de 2ª geração) procurou assegurar uma melhor especificidade aos ensaios, contudo a sensibilidade se manteve similar aos testes de 1ª geração. Actualmente, os ensaios de 3ª geração detectam simultaneamente ambos os retrovírus (HIV-1 e HIV-2) e usam na fase sólida antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos; estes, podem ser conjugados e são utilizados para a detecção enzimática de anticorpos específicos para HIV (Andrade et al., 2005).

De acordo com Andrade, et al. (2005) a introdução recente de testes de quarta geração, os quais permitem a detecção simultânea de anticorpos e antígeno (anti-HIV e p24), aumentou a eficácia dos métodos convencionais, na triagem sorológica para diagnóstico precoce da infecção pelo HIV. Teoricamente, estes ensaios combinados oferecem maior sensibilidade e encurtamento da janela imunológica (período entre a infecção pelo HIV e o desenvolvimento de um factor sorológico- antígeno ou anticorpo) para detecção do HIV.

De acordo com Couroucé et al. (2000), desde a comercialização dos primeiros testes (testes de 1ª geração) até à actualidade (testes de 4ª geração), fizeram-se grandes progressos para melhorar a característica dos testes. Estes progressos incidiram sobretudo na precocidade da detecção da infecção pelo HIV, que conduziu a uma redução da janela imunológica (Tabela 1).

Tabela 1: Redução do período de janela dos testes ELISA

ANOS	1985-1987	1988-1990	1991-1992	1993-1995	1996-2000
PERÍODO DE JANELA	56 dias	42 dias	33 dias	21 dias	16 dias*

*Testes de quarta geração

Nas primeiras semanas após a infecção pelo HIV, o antígeno p24 está presente no soro, antes da detecção dos anticorpos. Com o aparecimento desses, o antígeno p24 torna-se indetectável, devido à formação de complexos imunes antígeno-anticorpo e à depuração vírica, permanecendo assim por meses ou anos (Fig.4). O reaparecimento da antigenemia durante o curso da infecção geralmente está associado a um prognóstico desfavorável (Couroucé, et al. 2000).

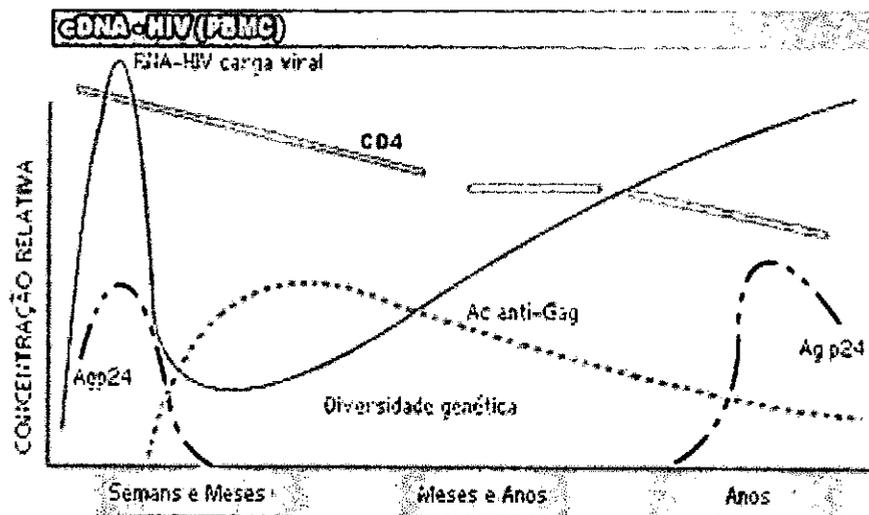


Fig.4: Comportamento do p24 na infecção pelo HIV

Fonte: modificado de www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/hiv1.shtml

Os testes imunoenzimáticos para triagem de HIV apresentam algumas desvantagens: a produção e a preparação de antígenos são associados com o risco de infecção; a composição do material antigénico é influenciada por uma variedade de factores (meio, métodos de colheita, preparação) pelo que torna difícil a padronização; mesmos antígenos altamente purificados, contêm antigénios celulares que reagem como auto-anticorpos, o que dá origem a maior número de falsos positivos (MISAU, 1996). Outra desvantagem dos testes ELISA para HIV é a não detecção de infecções recém contraídas (OMS, 1993).

Os testes ELISA podem apresentar resultados falso-positivos. Procedimentos mais específicos como a análise Western blot (considerado "padrão ouro"), testes rápidos, Imunoensaios lineares, Imunofluorescência indireta são posteriormente utilizados para confirmar os resultados soropositivos (Murray et al., 2004).

De acordo com a OMS (1993), estudos têm demonstrado que as combinações de ELISA e/ou testes simples/rápidos, tais como os imunoensaios e testes de aglutinação podem fornecer resultados tão confiáveis, ou às vezes até com maior segurança do que a combinação ELISA/Western blot, por um custo bem menor.

Os Testes rápidos dispensam equipamentos para a sua realização, sendo de fácil execução e leitura visual. A sensibilidade é comparável à dos testes ELISA (OMS, 1993).

A maioria dos testes rápidos imunocromatográficos para detecção qualitativa de anticorpos e antígenos específicos para HIV1/2, empregam uma combinação de uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de HIV1/2 ligados a uma fase sólida (membrana) (Machado & Costa, 1999).

5. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO

5.1 Metodologia utilizada

Para a concretização dos objectivos pré determinados, foi aplicada a seguinte metodologia em cada sector do laboratório:

- A primeira fase destinava-se à revisão bibliográfica, consulta de manuais/guiões existentes no laboratório, consulta de artigos na internet, leitura de livros na biblioteca do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) e na biblioteca do Instituto Superior de Ciências de Saúde.
- A segunda fase era a observação durante 3 ou 4 dias, da execução da técnica por parte do técnico. Durante a observação em caso de dúvida pedia esclarecimento ao executor. Findo os dias de observação o estagiário executava a técnica sobre a observação do técnico responsável até ao domínio total. A partir daí, passava a executar em paralelo com o técnico ou, por vezes, sozinho.
- Na terceira fase (findo o tempo de estadia no sector), o estagiário apresentava um trabalho bibliográfico acerca do sector onde estivera. Neste trabalho, para além de falar da técnica usada no BS, falava de outras existentes. A apresentação era assistida por todos técnicos e o director do BS (Anexos 3 e 4).

5.2 Rastreio de HIV

5.2.1 Teste ELISA

A triagem de HIV foi realizada nos mês de Maio, Junho (2 semanas) e Setembro (3 semanas) em todos dias úteis da semana, excepto, às segundas-feiras.

A primeira etapa para o rastreio é a retirada do "kit" (GENSCREEN PLUS HIV Ag-Ab) do refrigerador para que estabilizem à temperatura ambiente. Enquanto isso, as amostras são centrifugadas (5 minutos, a velocidade de 3000 Rpm) de modo que a haver separação entre o soro e as hemácias.

Depois de protocolar as amostras, prepara-se a solução de lavagem. O tampão de lavagem é fornecido (no kit) como uma solução concentrada. Para tal, despeja-se 1,4 litros de água destilada no cilindro de medição, seguido de adição do conteúdo de uma garrafa de tampão de lavagem concentrado. Depois de completar o volume final de 1,5 litro com água destilada mistura-se muito bem. Por fim, o conteúdo é despejado no recipiente de armazenamento de tampão, e fecha-se firmemente. De acordo com a OMS (1993), o tampão preparado é estável à temperatura ambiente por um mês, se armazenado em recipientes firmemente fechados.

Depois de retirar a microplaca da embalagem, coloca-se directamente (sem pré-lavagem da placa) sucessivamente:

- 25µl de diluente em cada poço;
- 75 µl de soro do controlo negativo no poço A1;
- 75 µl de soro do controlo "cut-off" nos poços B1,C1,D1;
- 75 µl de soro do controlo positivo no poço E1;
- 75 µl da primeira amostra (controlo interno negativo) em F1;

- 75 µl da segunda amostra (controlo interno positivo) em G1;
- 75 µl do soro das amostras (uma em cada poço);

De acordo com Azambuja (2004), o depósito das amostras deve ser acompanhada de 3 aspirações, com a pipeta de 75 µl ou agitação da microplaca após a etapa de pipetagem.

Em seguida, cobre-se a microplaca com uma película autocolante, pressionando bem sobre toda a superfície de forma a ficar uniforme. Daqui, ela é colocada numa incubadora seca durante 60 minutos a 37°C. De acordo com a OMS (1993), durante este período, qualquer anti-HIV ou antígeno HIV presente ligar-se-á, respectivamente, a antígenos ou anti-HIV sensibilizados na placa.

Faltando 5 a 10 minutos para o fim do tempo de incubação prepara-se o conjugado. Pois, de acordo com a OMS (1993), o conjugado deve ser preparado no mínimo 15 minutos, e não mais do que 30 minutos, antes de ser utilizado.

O procedimento para preparação da solução do conjugado 2 é o seguinte: bate-se ligeiramente o frasco (contendo o substrato) sobre a bancada para destacar qualquer substância que possa ter aderido á rolha de borracha. Retira-se a rolha com cuidado e deita-se o conteúdo do frasco de diluente conjugado. Volta-se a tapar o frasco e deixa-se durante 10 minutos, agitando e invertendo periodicamente, para facilitar a dissolução.

Findo o período de incubação, retira-se a película autocolante e faz-se 3 ciclos de lavagem no lavador automático. Seguidamente seca-se o excedente da lavagem batendo a microplaca contra uma folha de papel absorvente ou gaze seca.

O processo subsequente é a distribuição de 100 µl de conjugado (previamente preparado) por todos os poços e volta-se a cobrir com uma película autocolante e incuba-se durante 30 minutos á temperatura ambiente.

Faltando 5 a 10 minutos do período de incubação prepara-se a solução de substrato. De acordo com a OMS (1993), O substrato é preparado durante os últimos 5 a 10 minutos do período de incubação e utilizado dentro de 30 minutos após o seu preparo.

O procedimento para preparação da solução do substrato é o seguinte: dilue-se 11 vezes a solução de cromogénio (R9) no tampão substrato (R8): 1 ml de reagente R9 + 10ml de reagente R8. De acordo com a OMS (1993), a solução de substrato deve ser incolor quando preparado. Se a solução ficar azulada, ou houver a formação de precipitados, deve descartada, e uma nova solução deve ser preparada.

Terminado o período da segunda incubação, retira-se a película autocolante, lava-se 5 vezes no lavador automático e distribui-se rapidamente em todos os poços 100 µl do substrato (previamente preparado). Em seguida, Incuba-se no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente, sem cobertura do papel autocolante.

Após a última incubação, junta-se 100 µl da solução de paragem adoptando a mesma sequência e ritmo de distribuição utilizados para o substrato e seca-se cuidadosamente a superfície inferior da placa. Depois de 5 minutos lê-se a densidade óptica a 450\620nm no espectrofótopmetro e por fim protocola-se o resultado.

5.2.2 Teste Rápido (Teste confirmatório)

Neste teste, são submetidos todas amostras reactivas (positivas) no teste ELISA. De acordo com Cura & Windel (1994), um resultado de teste de rastreio positivo

não implica, necessariamente, a existência do HIV, já que os testes de ELISA podem ter resultados falso-positivos.

O teste rápido usado é o Uni-Gold (teste imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos específicos para HIV1/2).

Para o teste rápido enumera-se as membranas em ordem crescente, aplicam-se 2 (duas) gotas de soro na membrana utilizando uma nova pipeta para cada amostra, seguido de 2 (duas) gotas de solução tampão. De acordo com Machado & Costa (1999), a solução tampão propicia o fluxo lateral dos componentes libertados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos.

Espera-se no mínimo 10 minutos para fazer a leitura do resultado.

Terminada a triagem de HIV, descarta-se todas as bolsas de sangue HIV positivas (para o primeiro teste). De acordo com Nascimento & Pereira (2004), para fins de segurança das transfusões sanguíneas, apenas um teste positivo (de rastreio) é suficiente para o descarte da bolsa de sangue.

5.3 Outras Actividades

5.3.1 Rastreio de Hepatite B

O rastreio de Hepatite B, é feita em simultâneo com a do HIV e usa-se o teste ELISA (semelhante ao do HIV). De acordo com Cura & Windel (1994), 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 de cor, através da adição de substrato cromogénico. A leitura pode ser visual; entretanto, recomenda-se a utilização de espectrofotómetro.

Os resultados reactivos são também confirmados com um teste rápido.

5.3.2 Rastreio de Sífilis

O rastreio de Sífilis (*Treponema pallidum*) foi realizada nos meses de Junho (duas semanas) e Julho (uma semana) juntamente com Isohemolisinas e Isoglutininas (testes indirectos de tipagem sanguínea) em todos dias úteis da semana.

Para o rastreio da sífilis usa-se o teste não treponémico - RPR (- Rapid Plasma Reagin).

De acordo com Alves et al. (2002), o antígeno do teste RPR é preparado com uma suspensão de antígeno de VDRL (Teste desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa de Doenças Venéreas, dos Estados Unidos, que em inglês é chamado de Veneral Disease Research Laboratory) modificada com adição de cloreto de colina, para eliminar a necessidade de aquecer o soro; e partículas muito finas de carvão, como agente de visualização.

Para o teste, o antígeno RPR é misturado com o soro, num cartão com cobertura plástica. Se há anticorpos presentes, estes se combinam com as partículas lipídicas do antígeno, produzindo floculação. As partículas de carvão se coaglutinam com os anticorpos e aparecem grumos negros sobre o fundo branco do cartão. Se não existem anticorpos presentes, a mistura fica com a cor cinzenta uniforme (Cura & Windel, 1994).

As bolsas de sangue com resultados reactivos (positivos) a RPR são descartadas. Apesar de que o armazenamento do sangue a 4°C durante 72 horas leva a morte do *T. pallidum*, dado que ele é muito sensível as temperaturas baixas. De acordo com a OMS (1993), a infecção de dadores pelo *T. pallidum* é utilizada como um marcador da conveniência dos dadores. Ela indica dadores expostos ao risco de doenças sexualmente transmitidas, devido ao comportamento sexual. Com isto pode aumentar o risco de exposição ao HIV.

5.3.3 Produção de Hemocomponentes

A produção de Hemocomponentes foi realizada no mês de Abril. A produção é feita todos dias úteis da semana.

Os produtos obtidos a partir do sangue total (unidade de sangue antes de ser fracionada) são os seguintes: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e plasma fresco congelado (anexo 3).

5.3.4 Tipagem ABO/Rh

A tipagem ABO/Rh foi feita nos meses de Julho (uma semana) e Agosto (duas semanas) durante todos dias úteis da semana. Neste processo usa-se a tipagem directa (testes em tubos de ensaio). De acordo com a OMS (1993), a vantagem da técnica de tubos é permitir um longo tempo de incubação sem qualquer evaporação do seu conteúdo.

5.3.5 Testes de compatibilidade

A aprendizagem para testes de compatibilidade durou 3 semanas (Julho). Os testes são feitos todos dias úteis da semana e usam-se testes de compatibilidade maior.

5.3.6 Recepção, Sala de inquérito

Na recepção esteve durante uma semana (Março), onde aprendeu a registar, arrumar as fichas de dadores. Na sala de inquérito esteve apenas a observar a realização da pré-triagem (por uma semana).

5.3.7 Sala de Colheita

A aprendizagem na sala de colheita foi em Abril (uma semana) e Setembro (uma semana). Na sala de colheita, registava os dados do dador (contidos no cartão ou guia de colheita de sangue) e fazia a colheita de sangue durante todos dias úteis da semana.

A estadia na sala de colheita incluiu a saída com Brigadas móveis, as quais colhem sangue em diversas instituições (escolas, empresas, igrejas e outras).

6. PERSPECTIVA CRÍTICA SOBRE OS PROCESSOS DE TRABALHO NA UNIDADE DE ESTÁGIO

6.1 Pré - triagem (Inquérito)

A pré-triagem ou inquérito dos doadores representa uma tarefa indispensável para a segurança transfusional. É na pré-triagem onde é feita uma avaliação preliminar do estado de saúde dos doadores (sinais de alguma doença, pressão sanguínea, peso, altura, nível de hemoglobina e outros) e o seu historial médico.

O historial médico, fornece informações necessárias para decidir se aceita-se o dador, rejeita-se temporariamente ou exclui-se permanentemente e dando-se ao dador oportunidade de auto-exclusão, garantindo deste modo maior segurança ao receptor de sangue, pois pode impedir a transfusão de uma unidade de sangue em período de "janela imunológica".

Todavia, tem se verificado pouco ou simplesmente nenhum cuidado nesta etapa do processo de colheita de sangue. O historial médico nas brigadas muitas vezes não é feito. A maioria dos inquiridores ignora as perguntas do historial médico (anexo 2), principalmente quando há muita afluência de doadores.

A inadequada pré-triagem de doadores de sangue pode trazer problemas adversos para o dador assim como para o receptor do sangue e, representa um risco para a transmissão do HIV (no período de janela) e de outros agentes infecciosos.

De acordo com Nascimento & Pereira (2004), é importante que antes da doação o doador encare a doação como um gesto voluntário que salvará vidas e não como uma forma gratuita de se fazer exames, obter medicamentos e lanche. Os doadores devem ser amplamente informados no inquérito sobre a responsabilidade, honestidade e seriedade que um doador de sangue tem para que possa haver maior segurança para os futuros receptores desse sangue doado.

Independentemente do local de colheita de sangue, a pré-triagem é imprescindível e ela deve ser feita na íntegra, excluindo deste modo doadores com comportamento de risco e aqueles que a doação de sangue possa afectar o seu estado de saúde.

7. CONCLUSÃO

Durante o estágio no Banco de Sangue do Hospital Central de Maputo, apreendi o seguinte:

- Um Banco de Sangue desempenha um papel fundamental para a Medicina Transfusional. Ele garante transfusões seguras, evitando deste modo reacções transfusionais e transfusão de agentes infecciosos.
- O rastreio sorológico de HIV por si só não garante totalmente a ausência deste nas unidades de sangue. Outras actividades anteriores ao rastreio (captação de dadores, pré-triagem) desempenham um papel relevante.
- A técnica ELISA é vantajosa para o rastreio de infecção de dadores de sangue, pois para além de ser altamente sensível, é aplicável para um grande número de amostras, tem custo relativamente baixo, é de fácil execução e possibilita a automação.
- Apesar da sua eficácia para o rastreio de infecção em de dadores de sangue, a técnica ELISA tem como limitação o não diagnóstico de infecções contraídas nas primeiras duas semanas do período de janela.
- A alta sensibilidade dos testes ELISA compromete a sua especificidade, dando deste modo alguns resultados falsos positivos. Assim, o teste ELISA precisa de um segundo teste para confirmação dos resultados positivos.

Com o estágio no BSHCM, adquiri e aperfeiçoei habilidades técnicas, graças a execução rotineira de diversas actividades, execução essa, feita com alto rigor, eficácia e responsabilidade.

8. RECOMENDAÇÕES

O BSHCM é um Banco de Sangue de referência nacional. O zelo, eficiência com que os trabalhos são feitos dão mérito ao mesmo. Mesmo assim, uma e outra coisa pode ser feita para melhorar muito mais as suas actividades, como por exemplo:

1. Sendo o rastreio de HIV usando a técnica ELISA, um processo que requer muita atenção pela parte do executor (para evitar erros), recomenda-se que a sala de execução dos testes, tenha uma circulação interna segura e racional, evitando deste modo ruído e perturbações.
2. Para possibilitar a honestidade, sinceridade, e evitar embaraço durante as perguntas do historial médico recomenda-se que nas brigadas o inquérito seja feito num lugar privado.
3. Para reduzir a incidência de HIV, Hepatite B, e outros agentes infecciosos transmitidos por sangue nos dadores recomenda-se um aconselhamento periódico dos mesmos.
4. Para maior conhecimento sobre os requisitos para doação de sangue, testes feitos ao sangue colhido (garantido aderência e a auto exclusão) recomenda-se que nos locais de colheita de sangue (BS e Brigadas) sejam postos panfletos com essa informação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, F.B., F.C. Carvalho, P.G. Carvalho, A.T. Dias, J. Heukelbach, J.A. Queiroz (2005). Evaluation of a Combined Antigen/ Antibody Test for The Identification of Recent HIV I/II Infection in Blood Donors, vol.37. (3), Brasil, RBAC, 169-174.
- Ávila, S.L. e A.W Ferreira (1996) . Diagnóstico Laboratorial das Principais doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 302pp, Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan.
- Azambuja, G., E.V Chicovele, J.S Gudo (2004). Genscreen HIV1\2 versão 2, BIO-RAD, Maputo, Programa Nacional de Transfusão de Sangue.
- Brostoff, J. D. Male, I. Roitt (1998). Immunology, Fifth edition. Mosby International Ltda.
- Coffin, J.M. (1993). Structure and Classification of Retrovirus, In: Levy J. The Retroviridae 19-45. New York, Plenum Press.
- Cotanzo, L. S. (1999). Fisiologia, 392pp, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan SA.
- Castro, M.G.; M.R. Oliveira, JR. D. Langhi (2004). Validação dos Testes Sorológicos Anti-HBc e Anti-HIV para Triagem de Doadores de Sangue, Edição 149, Laes & Haes, Artigos científicos.

- 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.
- Couroucé, A. M., S. Laperche, M. Maniez-Montreuil (2000). Les tests de dépistage combiné de l'antigene p24 et des anticorps anti-VIH dans l'infection précoce à VIH-I, Vol. 7, suppl. 1., Transf. Clin. Biol. p. 18-24
- Dodd, R.Y. (1986). Testing for HTLV-II/LAV. American Association of Blood Banks.
- Friedland, G. H. e R.S Klein (1987). Transmission of Human Immunodeficiency Virus. *New Engl. J. Med.*, 317: 1125-35.
- Gudo, J. S. (2006). Comunicação pessoal. Director do Banco de Sangue do Hospital Central do Maputo. Maputo
- Leavell, B. S. e A. Thorup (1979). Hematologia Clínica; 1ª edição. 456pp, Rio de Janeiro, Internacional Ltda.
- Machado, A.M. & J.C Costa (1999). Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Medicina* 32: 138-146.

- Marques, J. F (1994). Transfusão de hemácias contendo hemoglobinas, Vol. 16. n.166, maio/ago. Rev. da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 229 - 231.
- Ministério da Saúde - Banco de Sangue (1996), Manual de Imunohematologia, 142pp, MISAU, Maputo- Moçambique.
- Murray, P. R., K.S. Rosenthal, G.S Kobayashi, M.A. Pfaller (2004). Microbiologia Médica, 4ª edição. 762pp, Guanabara Koogan.
- Nascimento, F. RF e A.M Pereira (2005). Prevalência de HIV entre Doadores de Sangue no Banco de Sangue de Maranhão. DST-J bras Doenças Sex Transn 16 (4): 11-13.
- Organização Mundial da Saúde (1993). Triagem para HIV e outros Agentes Infecciosos, Modulo 2, 160pp, Genebra.
- Wei, X., S.K Ghosh, M.E Taylor (1995), Viral Dynamics in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Nature; 373:117-22

ANEXOS

Anexo 1: Cronograma do estágio

O estagiário realizou um mínimo de 5 horas por dia.

	Ano 2006																							
	Março				Abril				Maio				Junho				Julho				Agosto			
Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Sector																								
Secretaria				*																				
Sala de inquérito				*																				
Sala de Colheita					*																			
Produção de hemocomponentes						*	*	*																
Triagem de HIV e Hepatite B									*	*	*	*	*	*								*	*	
Triagem de Sífilis e Isohemolisinas e Isoglutininas															*	*	*							
Provas de compatibilidade																*	*	*						
Tipagem ABO\Rh																		*	*	*				

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 Gastrointestinal (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			
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)

Anexo 3: Relatório apresentado sobre a produção de Hemocomponentes

Conteúdo

Introdução

Objectivos

Material e Procedimentos

Sangue total (ST)

Armazenamento

Indicações

Concentrado de hemácias (CH)

Obtenção

Armazenamento

Indicações

Subtipos

Concentrado de plaquetas (CP)

Obtenção

Armazenamento

Indicações

Plasma fresco congelado (PFC)

Obtenção

Armazenamento

Indicações

Subtipos

Crioprecipitado (CRIO)

Obtenção

Armazenamento

Indicações

Conclusão

Bibliografia

1. INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido vivo, composto por uma parte líquida - o plasma - constituída por água, sais minerais, vitaminas e factores de coagulação, e uma parte sólida (hemácias, leucócitos e plaquetas) (Costanzo, 1999).

O sangue é produzido na medula óssea dos ossos chatos (vértebras, costelas, quadris, crânio e esterno); nas crianças, também os ossos longos, como o fêmur, realizam a produção de sangue (Gaudin & Jones, 1977).

A hemoterapia moderna baseia-se no uso selectivos dos componentes do sangue. A utilização correcta dos diversos hemocomponentes, associados a um maior controle de qualidade nas diversas etapas, desde a coleta até o fracionamento, tem tornado a hemoterapia mais segura e, hoje, muitos pacientes são beneficiados com derivados de uma única doação (www.hemonline.com.br).

De acordo com Razouk & Reiche (2004), os principais hemocomponentes produzidos a partir do sangue total (como é conhecido a unidade de sangue antes de ser fracionada) são: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, Plasma fresco congelado, Plasma comum, crioprecipitado, concentrado de granulócitos e albumina humana.

Em Moçambique, até a altura só produz-se concentrado de hemácias, plasma fresco congelado, plasma comum e concentrado de plaquetas (Gudo, 2004).

O sangue total, não encontra hoje quase nenhuma indicação clínica onde não possa ser substituída com eficácia por seus componentes. A razão para isto está

no facto de que conseguimos conservar melhor os hemocomponentes isoladamente (www.hemonline.com.br).

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 de reacção transfusional. Contudo, essas vantagens somente são obtidas quando há a real necessidade da transfusão e prescrição adequada com a indicação clínica (Razouk & Reiche, 2004).

A realização desse procedimento de forma não criteriosa expõe o receptor a sérias complicações como a aquisição de doenças transmissíveis, reacções transfusionais (hemolíticas ou não) que podem ser graves, sensibilização imunológica, falha terapêutica, aumento no custo do tratamento e ansiedade gerada no paciente e nos familiares envolvidos. Acrescenta-se, ainda, o desperdício de um material nobre, devido ao generoso acto da doação e ao elevado custo na adequação do mesmo para fins terapêuticos (Razouk & Reiche, 2004).

Alguns avanços dramáticos na Saúde, em particular na Cirurgia e Medicina, têm ocorrido em parte graças á larga disponibilidade de componentes do sangue. Contudo, muito poucos reconhecem que a cirurgia cardíaco complicada, os transplantes da medula óssea e do fígado, e a quimioterapia agressiva são poucos dos avanços no tratamento, que no seu todo dependem da transfusão de sangue (Gudo, 2004).

O sangue e seus produtos, são utilizados em uma série de propósitos, mas as três principais razões para a transfusão são: correção da anemia (baixo nível de hemoglobina); 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, 1993).

2. OBJECTIVOS

- Descrever os procedimentos de obtenção dos hemocomponentes.
- Definir os limites correctos de temperatura para o armazenamento de hemocomponentes.
- Explicar a necessidade de transfusão de cada hemocomponente.

3. MATERIAL E PROCEDIMENTO

Material	E	Equipamento
Unidade(s) de sangue		Refrigerador
Tesoura		Congelador
Gaze		Banho Maria
Luvas		Centrífuga
Avental plástico		Agitador de plaquetas
		Expressor de plasma
		Balança electrónica

3.1 Sangue Total (ST)

O ST se caracteriza como o sangue colectado de um doador, misturado com a solução preservativa e anticoagulante, na proporção de aproximadamente 450 ml de sangue para 63 ml de solução preservativa (Razouk & Reiche, 2004).

De acordo com Gudo (2004), o sangue total fresco é composto por Hemácias; plasma; leucócitos e plaquetas.

3.1.1 Armazenamento

O tempo de permanência fora de controle de conservação até a completa transfusão deve ser menor que 24 horas.

Seu prazo de validade depende do anticoagulante utilizado na bolsa de colecta: a validade é de 21 dias (se for usado Citrato-Fosfato-Dextrose - CPD); 35 dias (Citrato - Fosfato-Dextrose- Adenina - CPDA-1); ou 42 dias (CPD + manitol) a partir da data da colecta (AABB, 1986). Deve ser estocado em refrigerador monitorizado entre 1° e 8° C.

3.1.2 Indicações

As indicações para o uso do sangue total são extremamente limitadas. O sangue, 24 horas depois de seu armazenamento, perde as funções plaquetárias e a concentração de factores lábeis de coagulação diminui.

O desenvolvimento de hemocomponentes tem limitado o uso de sangue total a poucas condições clínicas. O uso de ST fresco não é mais aceito na hemoterapia actual e traduz apenas a falta de disponibilidade de produtos mais adequados. Portanto, seu uso deverá ser apenas como matéria-prima para o preparo de

hemocomponentes. O ST estocado deverá ser usado nos casos em que tenha ocorrido uma perda superior a 30% da volemia. Todavia, essas hemorragias também poderão ser manuseadas com concentrado de glóbulos vermelhos e soluções eletrolíticas e/ou coloidais (Razouk & Reiche, 2004).

3.2 Concentrado de Hemácias (CH)

Os eritrócitos (CH) são preparados pela retirada de aproximadamente 80% do plasma de uma unidade de sangue total. Apresenta um índice hematócrito (porcentagem do sangue composto por hemácias) de 70 a 80% (AABB, 1986).

Como vantagens do emprego de eritrócitos sobre o sangue total tem-se a obtenção da mesma capacidade de oxigénio com a metade do volume; redução no nível de isoaglutininas naturais (anti-A e anti-B) e redução significativa nos níveis de citrato e potássio, principalmente para doentes cardíacos, renais e/ou hepáticos (Razouk & Reiche, 2004).

3.2.1 Obtenção

É o seguinte o procedimento geral para a produção de concentrado de hemácias usando centrifugação:

- Pesa-se e equilibra-se cada unidade;
- Colocam-se as unidades balanceadas na centrífuga.
- Centrifuga-se pelo tempo e velocidade especificados. Embora a velocidade média seja de aproximadamente 3200 Rpm por cerca de cinco minutos, cada centrífuga deve ser calibrada individualmente para assegurar um produto de qualidade.
- Quando a centrífuga parar completamente, retira-se cuidadosamente a unidade, colocando-a em um expressor;
- Exprime-se o plasma para dentro da bolsa satélite acoplada. O hematócrito pode ser avaliado por retirar bastante plasma até trazer a interface célula/plasma para o canto superior da bolsa ou removendo o peso especificado do plasma.
- Quando a quantidade desejada do plasma for retirada, sela-se o tubo.

3.2.2 Armazenamento

Armazena-se o concentrado de hemácias aproximadamente a 4°C, de acordo com a solução anticoagulante preservadora usada, a validade muda. A validade é de 21 dias (se for usado CPD); 35 dias (CPDA-1); ou 42 dias (CPD + manitol) a partir da data da colecta (Razouk & Reiche, 2004).

3.2.3 Indicações

O CH é indicado para aumentar a massa eritrocitária em pacientes que necessitem aumentar sua capacidade de transporte de oxigénio (Razouk & Reiche, 2004).

3.2.4 Subtipos

Concentrado de hemácias pobre em leucócitos

A doação de 450 ml de sangue contém cerca de $3,0 \times 10^9$ leucócitos. Em pacientes politransfundidos, pode-se observar a presença de anticorpos antileucocitários, que produzem reacções febris não hemolíticas (RFNH) em transfusões que contenham essas células (Razouk & Reiche, 2004).

Concentrado de hemácias pobre em leucócitos são hemácias preparadas por um método que assegure a remoção de, pelo menos, 85% dos leucócitos originalmente presentes na bolsa de sangue colectado. Os métodos de remoção podem ser a lavagem, a centrifugação invertida com retirada da camada leucoplaquetária do *buffy-coat* ou a extracção automática do *buffy-coat* durante a preparação e uso de filtro leucodepletors. O número de leucócitos no componente final deverá ser menos de 5×10^6 células. Sua validade é de 24 horas quando preparado em sistema aberto e mantém a validade original se for em sistema fechado (Razouk & Reiche, 2004).

Concentrado de hemácias lavadas

Pacientes que tiveram reacções transfusionais alérgicas com CH normal poderão ser beneficiados com o uso de hemácias lavadas. Hemácias lavadas são usadas para pacientes com deficiência de IgA e anticorpos anti-IgA. O procedimento de lavagem deverá ser realizado com solução isotónica de cloreto de sódio. Para esse processo ser efectivo, deve compreender pelo menos três ciclos de lavagem. Este procedimento pode ser realizado a qualquer momento dentro do prazo de validade do componente, mas uma vez que a lavagem é realizada em sistema aberto, o CH resultante pode ser estocado por apenas 24 horas, entre 1° e 4°C, devido ao risco de contaminação bacteriana. CH lavadas devem ser administrados através de filtros de transfusão em até quatro horas (Razouk & Reiche, 2004).

Hemácias rejuvenescidas

São hemácias tratadas por um método que restabelece os níveis normais de 2,3 Difosfato glicerol (2,3-DPG) e Adenina Trifosfato (ATP). As hemácias podem ser rejuvenescidas até três dias após seu vencimento, desde que tenham sido mantidas a 4° - 2°C. Depois desse procedimento, os glóbulos vermelhos podem ser lavados e transfundidos dentro de 24 horas. Os rótulos dessas unidades devem indicar o uso de soluções de rejuvenescimento (Razouk & Reiche, 2004).

3.3 Concentrado de plaquetas (CP)

O CP consiste de uma suspensão de plaquetas em plasma, preparado mediante dupla centrifugação de uma unidade de sangue total. É importante que este sangue total não seja colhido em tempo maior que 15 minutos. O CP deve conter, pelo menos, $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas (Razouk & Reiche, 2004).

3.3.1 Obtenção

É o seguinte o procedimento geral para a preparação do concentrado de plaquetas ocasionais com estocagem a 22°C:

- Mantém-se o sangue total em 20 a 24°C, antes e durante a preparação da plaqueta;
- Centrifuga-se o sangue em rotação leve (em média 3200 Rpm). Essa centrifugação irá separar os eritrócitos, mas deixará as plaquetas suspensas no plasma.
- Exprime-se o plasma rico em plaquetas para dentro de uma das bolsas satélites
- Sela-se o tubo entre as hemácias e o plasma. O concentrado de hemácias é armazenado a 4°C.
- Centrifuga-se mais uma vez o plasma rico em plaquetas em rotação pesada (3600 Rpm por cinco minutos). Isso separará as plaquetas do plasma.
- Exprime-se a maior parte do plasma sobrenadante para a bolsa satélite, deixando aproximadamente 50ml com as plaquetas.

3.3.2 Armazenamento

De acordo com AABB (1986), Lorenzi et al. (1996), a colecta e o armazenamento afectam muitos aspectos da morfologia e das funções plaquetárias. As actividades metabólicas destas células continuam durante o armazenamento. Mudanças morfológicas ocorrem no citoesqueleto, na membrana e nos antígenos. Factores que afectam a viabilidade das plaquetas armazenadas incluem: soluções anticoagulantes preservadoras; temperatura de armazenamento; composição e tamanho da bolsa usada. Sendo assim, as plaquetas são armazenadas em bolsas plásticas especiais (que permitem a troca de gases com o meio), armazenados à

temperatura de 20° a 24°C sob constante agitação (para prevenção de formação de uma massa compacta) à temperatura ambiente. Tem validade de cinco dias.

De acordo com Razouk & Reich (2004), existe preocupação especial com a contaminação bacteriana do CP devido à sua estocagem à temperatura ambiente, devendo-se respeitar seu prazo de validade.

3.3.3 Indicações

As indicações clínicas para transfusão de plaquetas são para prevenir ou controlar a hemorragia em pacientes com baixas contagens de plaquetas (trombocitopenia), ou, menos frequentemente, em pacientes com disfunção plaquetária (trombocitopatias) (Razouk & Reiche, 2004).

3.4 Plasma Fresco Congelado (PFC)

O plasma fresco congelado constitui um produto secundário frequente da produção de concentrado de hemácias e de concentrados de plaquetas. O produto é isento de hemácias e contém todos os factores plasmáticos de coagulação, inclusive os factores V e VIII (Lorenzi, 1996).

3.4.1 Obtenção

Segue-se os mesmos procedimentos já citados na secção de concentrado de plaquetas.

3.4.2 Armazenamento

Deve ficar armazenado a uma temperatura de, no mínimo, - 20° C, tendo a validade de 12 meses. Porém, a temperatura mais recomendada é a de -30° C e, assim, a validade do PFC passa a ser de 24 meses (Razouk & Reiche, 2004).

3.4.2 Indicações

Para pacientes que apresentam sangramento activo e múltiplas deficiências de factores de coagulação. Os exemplos incluem a reposição sanguínea maciça com sangue estocado, trauma, cirurgia, hepatopatia, coagulação intravascular disseminada, ou quando um distúrbio específico não pode ou ainda não foi identificado (Lorenzi, 1996).

3.4.4 Subtipo

Plasma Comum (PC)

Pode ser chamado também de plasma normal, plasma simples ou plasma de banco. Diferencia-se do PFC, pois seu congelamento se dá mais de oito horas depois da colecta do ST que lhe deu origem. Pode resultar também da

transformação de um PFC cujo período de validade expirou. Deve ser armazenado em temperatura igual ou inferior a -20°C e tem a validade de cinco anos (Razouk & Reiche, 2004).

3.6 Crioprecipitado (CRIO)

O Crioprecipitado, é um componente obtido do PFC, sendo rico em Factor VIII (Hemofilia A), fibrinogénio e factor XIII da Coagulação (Gudo, 2004).

3.6.1 Obtenção

De acordo com Lorenzi (1996) e Razouk & Reiche (2004), para a obtenção do Crioprecipitado, procede-se da seguinte maneira:

- A preparação do CRIO começa por se permitir que o PFC (com peso mínimo de 180 g) descongele lenta e gradativamente no refrigerador em 1 a 6°C . Em geral, isso levará de 14 a 16 horas, quando realizado em um refrigerador padrão de banco de sangue. Se for empregado o banho descongelante circulante para Crioprecipitado (banho de água a 4°C), o tempo de descongelamento é reduzido para cerca de 4 horas. O ponto final é quando o plasma atinge uma consistência "lodosa".
- Centrifuga-se o plasma a 4°C com rotação pesada (4000 RPM),
- Exprime-se imediatamente o plasma sobrenadante para a bolsa satélite acoplada, deixando um volume residual de 10 a 20 ml.

3.6.2 Armazenamento

De acordo com Razouk & Reiche (2004), o crioprecipitado deve ser imediatamente recongelado. Não deverá transcorrer mais de uma hora entre o momento que o plasma atinge a consistência lodosa e o crioprecipitado é recongelado. A exposição do plasma a temperaturas elevadas ou um retardo em

recongelar o crioprecipitado provocará uma queda significativa na actividade final do factor VIII.

3.6.3 Indicações

As principais indicações da transfusão de CRIO são no tratamento da hemofilia A, doença de von Willebrand, deficiência de fibrinogénio congénita ou adquirida, deficiência de Factor XIII e complicações obstétricas Seu uso também é benéfico no tratamento da tendência hemorrágica associada à uremia (Razouk & Reiche, 2004).

4. CONCLUSÃO

Os hemocomponentes são obtidos através de duas centrifugações seriadas do sangue total. A primeira consiste em centrifugação denominada de leve para obtenção do concentrado de hemácias e do plasma rico em plaquetas o qual é submetido por uma segunda centrifugação chamada de pesada resultando no plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas. O crioprecipitado Constitui-se da fracção de plasma insolúvel ao frio, obtida a partir do Plasma Fresco Congelado.

O sangue total e o concentrado de hemácias deve ser sempre armazenado numa temperatura entre +2°C e +8°C. O plasma deve ser rapidamente congelado, e mantido a numa temperatura igual ou inferior a -30°C. O concentrado de plaquetas é posto a temperatura de 20 a 24oC, em agitação contínua. O crioprecipitado é congelado a temperatura de -20°C.

O sangue total e o concentrado de hemácias são usados para aumento da massa eritrocitária e do volume plasmático enquanto que o concentrado de plaquetas é usado para tratamento ou prevenção de sangramentos devido a trombocitopenias. O crioprecipitado è transfundido em caso de deficiência do fator VIII (hemofilia A), fator XIII, fibrinogénio; tratamento da doença de von Willebrand.

5. BIBLIOGRAFIA

- Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB)(1986). Terapêutica Transfusional: Manual para Médicos, 3 ed. 104pp, Bethesda.
- Cotanzo, L. S. (1999). Fisiologia, Editora Guanaba Koogan SA. 392pp, Rio de Janeiro.
- Gaudin, A. J. e K.C. Jones (1977). Introdução à Biologia. Nova York, 865pp, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Gudo, J. S. (2004). Normas sobre a prática clínica transfusional em Moçambique, 74pp, Ministério da Saúde - Direcção Nacional da Saúde, Maputo.
- 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.
- Verrastro, T., T. Lorenzi, N. Wendel (1996). Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. São Paulo. Ed. Atheneu, 237-293.
- Calvante, T.A. (2006). O Sangue e seus Derivados. [www.hemonline.com.br] Consultado a 21 de Abril de 2006.

Anexo 4: Relatório apresentado sobre o uso das técnicas ELISA e testes rápidos para triagem de HIV

NB: Foi omitido neste anexo a introdução, uma parte do desenvolvimento e a conclusão (aspectos ligados ao Teste ELISA e testes rápidos) dado que fazem parte do presente trabalho.

Objectivos:

- Descrever os procedimentos para efectuar um teste ELISA e testes rápidos;
- Explicar a essência do teste ELISA e testes Rápidos;
- Descrever outros testes usados para triagem do HIV (Western blot e PCR)

OUTROS TESTES

Western Blot (WB)

O teste WB tem o mesmo princípio do ELISA, isto é, captura de anticorpos, porém com antígenos específicos do HIV. Na técnica de WB, existe a possibilidade de se revelar a presença de anticorpos contra nove (9) proteínas do HIV-1: gp160, gp120, gp42, p66, p51, p31, p55, p24, p17. As três primeiras são codificadas pelo gene *env*, as três seguintes, pelo gene *pol* e as restantes, pelo gene *gag* (Fig 1) (Machado & Costa,1999).

Os antígenos virais são separados de acordo com seus pesos moleculares, mediante uma electroforese em gel de poliacrilamida, e a seguir são transferidos para membranas de nitrocelulose (este processo é chamado de blotting). A presença de anticorpos anti- HIV é detectada por testes similares ao ELISA, com a visualização de anticorpos distintos contra os diferentes componentes antigénicos do HIV (Cura & Wendel, 1994).

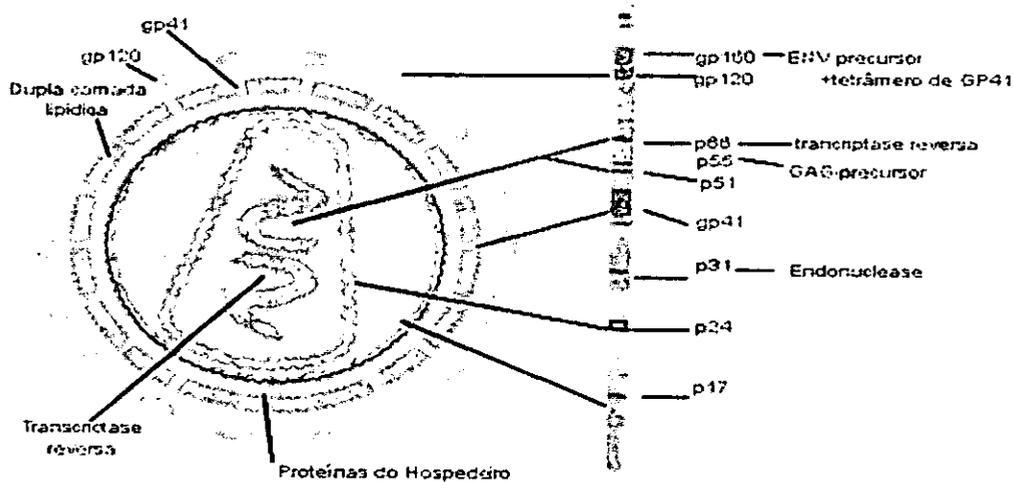


Fig 1: Proteínas do HIV 1

Fonte: Fonte: modificado de www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/hiv1.shtml

Soros que apresentem reactividade contra, pelo menos, uma proteína de dois grupos génicos diferentes, sendo uma delas obrigatoriamente do *env*, são considerados reagentes. Soros que apresentem reactividade contra duas proteínas do *env* são igualmente considerados reagentes (Machado & Costa,1999).

Soros que apresentem reactividade contra, pelo menos, uma proteína de dois grupos génicos diferentes, desde que não sejam do *env*, são considerados indeterminados. Soros que apresentem reactividade contra, pelo menos, uma proteína de um grupo génico, desde que não seja p17, são considerados indeterminados (Machado & Costa,1999).

Soros que reajam isoladamente contra p17 são considerados negativos. Soros que não reajam contra nenhuma proteína são, obviamente, considerados negativos (Machado & Costa,1999).

Em geral, a técnica de WB apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA, contudo, quando o conjugado enzimático do WB é preparado com o sistema avidina-peroxidase, pode tornar-se mais sensível e reconhecer anticorpos não detectados no ELISA. O facto de habitualmente se submeter ao WB os soros que já resultaram positivos ao ELISA torna a resultante mais específica (Ávila & Ferreira, 1996).

De acordo Machado & Costa (1999), o WB não é indicado como um teste de triagem inicial, devido à alta frequência de reacções indeterminadas, a maioria das quais pode ser não específica. o WB não é apropriado como ferramenta para uso em triagem inicial de grandes populações. Seu emprego deve ser reservado como um teste confirmatório, em especial em populações em que tenha havido positividade pelo ELISA ou outro teste em uma triagem inicial.

A maior limitação no emprego mais disseminado desta técnica é seu elevado custo (Ávila & Ferreira, 1996).

Polymerase Chain Reaction - PCR

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) tem melhorado significativamente o diagnóstico molecular nos últimos anos, seguindo uma rápida replicação *in vitro* e a subsequente identificação de sequências específicas do ácido nucléico. A amplificação de sequências de DNA humano e de muitos DNA alvos resulta, frequentemente, em uma produção abundante e específica do fragmento desejado, permitindo então, a detecção simples e sem ambiguidade do produto de diagnóstico (Alves et al, 2002).

O princípio da técnica de PCR é simples e baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três passos: 1) desnaturação da dupla fita de DNA, 2) anelamento dos *primers*, e 3) extensão dos *primers*. Um ciclo faz tipicamente ~3-5 minutos e é repetido 20-40 vezes. Um tubo da reacção de PCR contém uma mistura de tampão, nucleotídeos, *primers*, enzima (*Taq*-DNA-polimerase) e ácido nucléico do espécime de interesse (Alves et al, 2002).

Usa-se a reacção em cadeia de polimerase-*polymerase chain reaction-PCR*, em especial para o diagnóstico de infecção pelo HIV-1, em crianças nascidas de mães soropositivas, sendo altamente específico e sensível em lactentes de um a dois (1-2) meses de idade e para o esclarecimento diagnóstico de indivíduos com perfis indeterminados ao WB (Machado & Costa,1999).

De acordo com Ávila & Ferreira (1996), o PCR é um método muito sensível, mas a sensibilidade depende de uma adequada preparação da amostra. Apresenta as desvantagens de ser complexo, haver possibilidade de contaminação e de ser caro. É o método de escolha quando a sensibilidade é essencial, sendo indicado no diagnóstico individual.

BIBLIOGRAFIA

Ávila, S.L. e A.W Ferreira (1996) . Diagnóstico Laboratorial das Principais doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 302pp, Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan.

Cura E. & Wendel S. (1994). Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serologia de los Bancos de Sangre. OPAS, Washington D.C.

Machado, A.M. & J.C Costa (1999). Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), Medicina 32: 138-146.

Alves, G. B., P.R. Rezende, L.M Maradei-Pereira (2002). Polymerase chain reaction sensitivity against enzyme immuno assay test virus HIV -1, vol.24, no.1 *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, Mar, p.25-28.