

B10-101



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

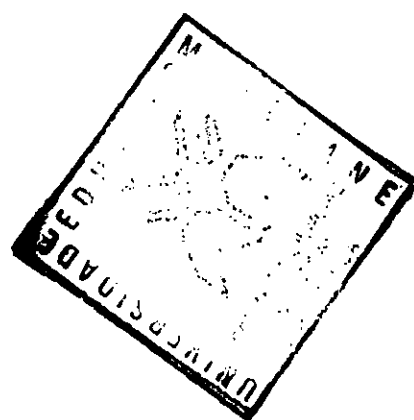
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



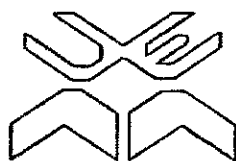
TRABALHO DE CULMINAÇÃO DO CURSO

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A ELUIÇÃO DE AMOSTRAS DE
SANGUE COLHIDAS EM PAPEL DE FILTRO PARA A DETECÇÃO DA IGM
CONTRA O VÍRUS DO SARAMPO: UM ESTUDO COMPARATIVO EM
CRIANÇAS PÓS-VACINADAS NA CIDADE DE MAPUTO**



AUTOR:

NOORBEBÍ ISMAEL ADAMO



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CULMINAÇÃO DO CURSO

**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A ELUIÇÃO DE AMOSTRAS DE
SANGUE COLHIDAS EM PAPEL DE FILTRO PARA A DETECÇÃO DA IgM
CONTRA O VÍRUS DO SARAMPO: UM ESTUDO COMPARATIVO EM
CRIANÇAS PÓS-VACINADAS NA CIDADE DE MAPUTO**

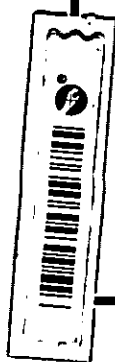
Autor: Noorbebí Ismael Adamo

Supervisores: Dr. Ilesh Jani, MD, PhD

Dr. Cornélio Balane

Co-supervisor: Dra. Tufária Mussá

Maputo, Dezembro de 2006



AGRADECIMENTOS

O meu especial agradecimento vai para o Dr. Ilesh Jani e o dr. Cornélio Balane, pela brilhante supervisão e pelo apoio e atenção que disponibilizaram durante a elaboração deste trabalho, apoio esse que em muito contribuiu para um trabalho excelente.

Um MUITO OBRIGADO enorme vai em particular ao Dr. Ilesh Jani por ter aberto as portas do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde para a realização deste estudo. Jamais irei esquecer da sua boa vontade em ajudar e da grande oportunidade de aprendizagem que tive e que espero continuar a ter!

À minha co-supervisora Dr. Tufária Mussá pela sua incansável paciência e pela orientação e ajuda que me pôde dispensar.

Ao Dr. Cornélio Ntumi pelo apoio e sugestões prestadas durante a realização deste trabalho.

Às enfermeiras Rosa e Josefina, e ao meu colega e amigo Dizimalta, pela forte ajuda durante a fase da colheita das amostras.

Às mães de todas as crianças, que participaram neste estudo cedendo as amostras.

À todo o pessoal do Departamento de Imunologia em especial ao Dr. Eduardo Samo Gudo, à Dra. Arlinda Zango, à Dra. Nádia Amade, ao Orvalho Joaquim, à Clotilde Nhumaio e ao sr. Alfredo Muchanga pela amigável companhia e colaboração durante o decorrer do trabalho.

Ao meu marido e grande amigo Mahomed Murargy, pela sua paciência, amor e carinho, pois em momentos de muito stress e desânimo só mesmo um abraço amigo e doces palavras para nos acalmar e nos dar muita força e coragem.

À minha mãe Hamida e aos meus irmãos Riduan, Jahir, Zulficar e Fátima, que foram uma companhia indispensável e de muita valia, dando sempre o apoio necessário para a minha formação.

À todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!!!

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra, que o presente trabalho de licenciatura é fruto do meu sacrifício e dedicação, e que toda a informação e os dados aqui presentes reflectem o que foi verdadeiramente observado.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em memória ao meu pai Ismael Valgy Adamo. Embora ausente, nunca me esquecerei que um dia me pôs a estudar e sempre me mostrou o bom caminho da vida, que para ele sempre foram os estudos. Suas palavras: *“estudem meus filhos, pois sem estudos nunca serão nada na vida, por mais educação que tenham”* sempre serão lembradas e jamais serão esquecidas.

À minha mãe, pela coragem e força que sempre teve de manter firmes as palavras do meu pai.

Ao meu irmão Riduan Ismael Adamo, por ter substituído o meu pai e por nunca ter deixado faltar o pão em momento algum, ou mesmo a minha matrícula em todos os anos da faculdade.

Nunca me esquecerei do teu enorme sacrifício.

A todos eles, dedico, com muito orgulho, este trabalho!

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Saúde durante os meses de Fevereiro à Dezembro do ano 2006. Teve como principal objectivo a padronização de um método para a eluição de amostras de sangue total colhidas em papel de filtro para a detecção da Imunoglobulina M (IgM) contra o vírus do sarampo, com vista a se implementar o uso deste papel para a colheita de amostras de sangue.

Para o estudo, foram colhidas 106 amostras de sangue venoso em crianças pós vacinadas contra o vírus do sarampo. Esta colheita foi efectuada em dois centros de saúde da cidade de Maputo: Centro de Saúde da Malhangalene e Centro de Saúde 1º de Maio. As amostras foram depois transportadas para o departamento de imunologia, sendo uma parte transferida para o papel de filtro. A outra parte foi centrifugada e se extraiu o plasma (que foi usado como método padrão).

Quatro diferentes métodos de eluição, nomeadamente, eluição com tampão para amostras, eluição com *phosphate buffered Saline (PBS)*, eluição com *phosphate buffered saline tween_20 (PBST_20)* e eluição com 5% de leite em pó magro diluído em *PBST_20* a 0,5% foram usados para testar as amostras de sangue em papel de filtro. Densidades ópticas destas amostras foram depois comparadas com as densidades ópticas do plasma correspondente. Determinou-se, para cada um dos métodos, a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), a concordância e a significância das diferenças observadas, com vista a validar os métodos de eluição usados.

Do total de 106 amostras colhidas e testadas para o plasma, apenas as 25 amostras que se revelaram negativas e igual número de amostras positivas, foram incluídas neste estudo.

Dos quatro métodos de eluição usados para testar as amostras em papel de filtro, a eluição com 5% de leite em pó magro diluído em *PBST-20* a 0,5% produziu resultados mais concordantes com os encontrados pelo método padrão. Isto demonstra que é possível padronizar um método para eluir amostras de sangue colhidas em papel de filtro para a detecção da IgM anti-sarampo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da localização geográfica dos Centros de Saúde da Malhangalene e do 1º de Maio..	9
Figura 2: Ilustração das amostras de sangue em papel de filtro	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas da população estudada	16
Tabela 2: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em amostras de plasma	16
Tabela 3: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com tampão para amostras	17
Tabela 4: Comparação dos métodos de eluição relativamente aos diferentes parâmetros calculados	17
Tabela 5: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com <i>Phosphate Buffered Saline</i>	18
Tabela 6: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com <i>Phosphate Buffered Saline Tween_20</i> a 0,5%	19
Tabela 7: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com 5% de leite em pó magro diluído em <i>Phosphate Buffered Saline Tween_20</i> a 0,5%	19

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Consentimento informado e informação ao paciente	28
Anexo 2: Ficha de registo de dados	32
Anexo 3: Princípio do teste Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha)	33
Anexo 4: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de plasma e critérios de validação do teste segundo as instruções do kit Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha)	35
Anexo 5: Procedimento das eluições das amostras de sangue seco em papel de filtro e preparação de algumas das soluções de eluição	39
Anexo 6: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de sangue seco em papel de filtro	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	<i>Ácido Ribonucléico</i>
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
HCM	<i>Hospital Central de Maputo</i>
HIV	<i>Vírus de Imunodeficiência Humana</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IgA	<i>Imunoglobulina A</i>
IgD	<i>Imunoglobulina D</i>
IgE	<i>Imunoglobulina E</i>
IgG	<i>Imunoglobulina G</i>
IgM	<i>Imunoglobulina M</i>
KDa	<i>Quilo Daltons</i>
ml	<i>Militros</i>
mm	<i>Milímetro</i>
min	<i>Minutos</i>
MISAU	<i>Ministério da Saúde</i>
nm	<i>Nanómetro</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization)</i>
OPAS	<i>Organização Pan-Americana da Saúde</i>
PAV	<i>Programa Alargado de Vacinação</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST_20	<i>Phosphate Buffered Saline Tween 20</i>
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
S&S	<i>Schleicher & Schuell</i>
SIDA	<i>Síndrome de Imunodeficiência Adquirida</i>
VPP	<i>Valor Preditivo Positivo</i>
VPN	<i>Valor Preditivo Negativo</i>
°C	<i>Graus centígrados</i>
µl	<i>Microlitros</i>

GLOSSÁRIO

Antígeno – Molécula ou substância de natureza protéica, lipídica ou polissacarídica, que quando introduzida no organismo é reconhecida como estranho.

ELISA – É um teste imunoenzimático que usa uma enzima ligada a um anticorpo ou a um antígeno como marcador para a detecção de uma proteína específica, especialmente um antígeno ou anticorpo.

Eluição – Processo de extracção de um material a partir de outro, por meio de lavagem com um solvente apropriado.

Phosphate Buffered Saline (Tampão Salino Fosfato) – É uma solução salina contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio. É bastante aplicada devido ao facto de ser isotónica e não tóxica para as células. Pode ser usada como solução de lavagem de células ou para diluir substâncias.

Tween₂₀ – É o nome comercial do Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana ou Polisorbato 20. Devido a sua estabilidade e a sua não toxicidade, é bastante utilizado como detergente e emulsificante. Nas ciências biológicas, por exemplo, o Tween₂₀ é amplamente usado para lisar células de mamíferos, como agente bloqueador em ensaios imunológicos como Western blots e ELISAs, e como agente solubilizador de proteínas da membrana, entre outras.

Especificidade – Representa a capacidade de se produzir resultados negativos na ausência de doença.

Exantema – Manifestação cutânea característica de uma doença infecciosa e contagiosa.

Padrão ouro (Gold standard) – Procedimento ou medida amplamente aceite como sendo a melhor.

Período prodromal – Sintoma ou sinal que precede uma doença.

Plasma – Parte líquida do sangue na qual se encontram, em suspensão, diversos elementos (glóbulos vermelhos, brancos, plaquetas) e o fibrinogénio.

Soro – Parte líquida do sangue, de cor acastanhada, transparente, isenta de elementos figurados e que sobrenada após a separação do coágulo sanguíneo por coagulação do fibrinogénio em fibrina. O soro sanguíneo tem a mesma composição que o plasma, o qual difere pela ausência do fibrinogénio.

Sensibilidade – Representa a capacidade de se produzir resultados positivos em pacientes com doença.

Valor preditivo negativo – Probabilidade de um indivíduo ter um resultado de teste positivo e apresentar a doença.

Valor preditivo positivo – Probabilidade de um indivíduo ter um resultado de teste negativo e não apresentar a doença.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Considerações gerais sobre o sarampo	3
1.2. Características da IgM e sua importância no diagnóstico laboratorial do sarampo	5
1.3. Caso particular de Moçambique e problema de estudo.....	6
2. OBJECTIVOS	8
2.1. Objectivo geral	8
2.2. Objectivos específicos.....	8
3. HIPÓTESE	8
4. ÁREA DE ESTUDO.....	9
5. METODOLOGIA	10
5.1. Desenho do estudo.....	10
5.2. Tamanho da amostra e população de estudo	10
5.3. Considerações éticas.....	11
5.4. Colheita e conservação das amostras	11
5.5. Processamento das amostras:	12
– Preparação das amostras de sangue seco em papel de filtro e das amostras de plasma	12
5.6. Testagem das amostras.....	13
a) Amostras de plasma	13
b) Amostras de sangue seco em papel de filtro	13
5.7. Processamento e análise estatística dos dados	14
6. RESULTADOS.....	16
6.1. Características demográficas da população estudada.....	16
6.2. Método padrão.....	16
6.3. Método de eluição 1 (Tampão para amostras)	17
6.4. Método de eluição 2 (PBS)	18
6.5. Método de eluição 3 (PBST_20 a 0,5%).....	18
6.6. Método de eluição 4 (5% de leite em pó magro diluído em PBST_20 a 0,5%).....	19
7. DISCUSSÃO.....	20
8. CONCLUSÕES	22
9. RECOMENDAÇÕES	23
10. LIMITAÇÕES.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

ANEXOS	28
Anexo 1: Consentimento informado e informação ao paciente	28
a) Consentimento informado	28
b) Informação ao paciente	30
Anexo 2: Ficha de registo de dados.....	32
Anexo 3: Princípio do teste Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha)	33
Anexo 4: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de plasma e critérios de validação do teste segundo as instruções do kit Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha).....	35
Anexo 5: Procedimento das eluições das amostras de sangue em papel de filtro e preparação dalgumas das soluções de eluição	39
Anexo 6: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de sangue seco em papel de filtro	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre o sarampo

O sarampo é uma infecção altamente contagiosa que tem como agente etiológico um vírus da família *Paramixoviridae*, género *Morbillivirus*, para o qual o Homem é o único reservatório (Schechter & Marangoni, 1994; WHO, 2000). A infecção constitui um dos cinco exantemas infantis clássicos, juntamente com a rubéola, a roséola, a varicela e o eritema infeccioso (Murray *et al.*, 2004).

O sarampo é mais comum na infância, sendo mais grave em crianças desnutridas e em países subdesenvolvidos, nos quais a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de um milhão de pessoas morre anualmente devido àquela doença e às suas complicações (Hermann & Pegararo, 1986; Stewien *et al.*, 2000).

Os principais factores que contribuem para a epidemiologia do sarampo são a susceptibilidade universal à infecção na ausência do anticorpo, extremo contágio, densidade populacional, e modos de vida das populações (Baron, 1996).

O vírus do sarampo é um vírus ARN antigenicamente estável, grosseiramente esférico, pleomórfico, com um invólucro cujo diâmetro varia de 100 a 200 nm e apresenta apenas uma variante antigénica conhecida; este vírus é muito sensível ao calor e ao frio (Krugman *et al.*, 1998).

A transmissão do vírus do sarampo é feita de pessoa para pessoa, através do contacto directo com gotículas de saliva, ou muco, expelidas por indivíduos doentes ou infectados e indirectamente, com menor frequência, por objectos recém-contaminados pelas secreções do nariz e da garganta (Hermann & Pegararo, 1986). O período de incubação é geralmente de 10 dias, podendo variar de sete a 18 dias. O período prodromal começa com febre alta, tosse, coriza, conjuntivite e manchas de Koplik na mucosa oral, sendo este o período de máxima transmissão respiratória para os indivíduos susceptíveis (WHO, 2000). Algumas horas depois do surgimento das manchas de Koplik, surge uma erupção avermelhada característica do sarampo que se inicia na parte lateral do pescoço e se estende ao resto do corpo (WHO, 2000). Esta erupção é geralmente muito extensa, persiste por quatro a sete dias e desaparece na mesma ordem em que surgiu (WHO, 2000).

Algumas complicações do sarampo incluem a pneumonia, laringite, diarreia, otite, sinusite e encefalite, sendo esta a mais temida por ser fatal em 15% dos pacientes (Schechter & Marangoni, 1994).

O sarampo é uma doença autolimitada, não existindo um tratamento específico; geralmente o tratamento é sintomático conforme a gravidade do caso, mas pode ser prevenido pela administração de uma vacina com o vírus vivo atenuado nos primeiros meses de vida (Hermann & Pegararo, 1986).

O diagnóstico do sarampo pode ser clínico ou laboratorial (OPAS, 1980). Clinicamente, o sarampo pode ser confundido com as outras doenças exantemáticas, reacções adversas às drogas, e outras como a toxoplasmose, meningococcemia, escarlatina, etc (Behrman & Kliegman, 1999). Os sinais e os sintomas clínicos não são suficientes para se estabelecer um diagnóstico preciso em relação a esta doença. Portanto, a confirmação laboratorial reveste-se de extrema importância, quer na luta pela eliminação do sarampo, como contra a transmissão do vírus (Behrman & Kliegman, 1999; Ratnan *et al.*, 2000; Stewien *et al.*, 2000). Assim sendo, o diagnóstico laboratorial torna-se imperioso na confirmação de todos os casos suspeitos de sarampo de modo a alertar o pessoal de saúde para um maior reforço nas campanhas de vacinação e/ou no controle e prevenção da doença.

O diagnóstico laboratorial do sarampo pode ser feito de três formas:

- Identificação de células gigantes multinucleadas em esfregaços da mucosa nasal;
- Isolamento do vírus em cultura; ou,
- Pesquisa de anticorpos específicos contra o vírus do sarampo no soro, no plasma ou no fluido oral (Behrman & Kliegman, 1999).

A pesquisa de anticorpos específicos contra o vírus do sarampo no soro ou no plasma é o método de diagnóstico laboratorial mais usado, quer seja em Moçambique como noutras partes do mundo. Este método é de execução prática e providencia um rápido diagnóstico laboratorial do sarampo (Ratnan *et al.*, 2000).

1.2. Características da IgM e sua importância no diagnóstico laboratorial do sarampo

Os anticorpos (ou imunoglobulinas) são um grupo heterogénio de glicoproteínas presentes no soro e nos tecidos. São produzidos pelos linfócitos B em resposta a estimulação por um antígeno, reagindo especificamente com esse antígeno (Janeway *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 1990).

Bioquimicamente, podem ser distinguidos cinco isotipos ou classes de anticorpos: IgA, IgE, IgD, IgM e IgG, diferindo entre si em diversos aspectos, tais como seus pesos moleculares, locais de ocorrência no organismo, tempo de vida, nível sérico, etc. (Janeway *et al.*, 1997).

A IgM, que será a mais destacada neste estudo, é uma das três imunoglobulinas produzidas na infecção pelo vírus do sarampo, sendo as restantes duas a IgG e a IgA (Helfand *et al.*, 1998; Helfand *et al.*, 1999; WHO, 2000).

A IgM é encontrada em todos os vertebrados e constitui 5 à 10% das imunoglobulinas no soro humano (0,5 - 1,5 mg/ml). É constituída por uma cadeia pesada do tipo μ , tem um peso molecular elevado (970 KDa) e uma meia vida de 10 dias; não é transmitida por via placentária e encontra-se como pentámeros e ocasionalmente como hexámeros e, devido à sua multivalência, a afinidade funcional para com os antígenos é grande. Esta imunoglobulina é a primeira a aparecer durante a ontogenese, sendo tipicamente formada muito cedo na resposta imune (Janeway *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 1990).

Numa infecção pelo vírus do sarampo (quer seja natural ou por vacinação), a IgM é a primeira das imunoglobulinas a ser produzida, atingindo o seu pico máximo por volta de 10 a 20 dias após a infecção. É também a primeira a decair, não permanecendo por mais de oito semanas no soro e/ou plasma (Helfand *et al.*, 1998; Helfand *et al.*, 1999; WHO, 2000).

A detecção da IgM específica contra o vírus do sarampo por meio de testes serológicos é um teste padrão para um rápido diagnóstico laboratorial do sarampo (Helfand *et al.*, 1999). A presença desta imunoglobulina no soro providencia fortes evidências duma infecção corrente ou duma infecção recente de sarampo (Ratnan *et al.*, 2000; WHO, 2000).

O soro sempre foi a amostra clínica padrão para a detecção de anticorpos específicos contra o vírus do sarampo (Mubarak *et al.*, 2004). Contudo, amostras alternativas como o fluido oral e amostras de sangue seco (DBS) em papel de filtro tem sido usadas com muito sucesso (Riddell *et al.*, 2002).

O uso de amostras de DBS para a investigação de anticorpos de inibição da hemaglutinação do vírus do sarampo foi reportado nos inícios dos anos 80. Desde então, muitos laboratórios têm demonstrado a fiabilidade do uso daquelas amostras em ensaios imunoenzimáticos para a detecção dos anticorpos (IgM e IgG) específicos contra o vírus do sarampo como alternativa às amostras de soro (Riddell *et al.*, 2002). Elas têm apresentado resultados semelhantes àqueles encontrados nas amostras de soro, relativamente às quais demonstram numerosas vantagens. Dentre estas destacam-se:

- A sua facilidade de colecta (por picagem do dedo ou do calcanhar), a qual requer menos treino médico e é mais aceite do que a punção intravenosa quer para os pais da criança, quer para a própria criança, afastando deste modo as técnicas invasivas para a obtenção de volumes grandes de sangue e envolvendo também, menos riscos associados com o uso e descarte de agulhas e seringas (Parker & Cubitt, 1999; Riddell *et al.*, 2002).
- O seu transporte e armazenamento, não requer condições especiais, podendo ser imediatamente transportadas em envelopes selados para os centro de referência. Contrariamente, as amostras de soro precisam de condições de temperatura apropriadas para sua conservação e devem ser devidamente transportadas em recipientes apropriados e seguros (Parker & Cubitt, 1999; Mubarak *et al.*, 2004).
- A sua colecta e o seu processamento, por serem considerados mais económicos em relação às amostras colectadas por punção intravenosa para a obtenção do soro (Parker & Cubitt, 1999).

1.3. Caso particular de Moçambique e problema de estudo

Segundo os dados epidemiológicos fonecidos pelo Ministério da Saúde (MISAU), desde o ano de 1989 ao ano de 2005 pouco mais de 2500 indivíduos morreram devido ao sarampo em todo o País. Só para o ano de 2005 foram registados 12598 casos de sarampo, dos quais 59 resultaram em óbito. De acordo com o Programa Alargado de Vacinação (PAV), desde a sua introdução em Moçambique, em 1979, verificou-se uma grande redução do índice de morbi-mortalidade infantil devido ao sarampo.

Moçambique pretende implementar a vigilância do sarampo baseada nos casos suspeitos. A confirmação dos mesmos será efectuada no Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de

Saúde (I.N.S), com vista a monitorar todos os casos de sarampo à nível do País. Daí a necessidade de se estudar novos meios de como estas amostras serão conservadas e transportadas dos diferentes pontos do País para o Departamento de Imunologia sem qualquer problema logístico. As amostras de soro ou de plasma actualmente em uso no País para a detecção da IgM contra o vírus do sarampo, apresentam algumas desvantagens. Por um lado, necessitam de condições especiais para a sua conservação e transporte, e, por outro, não podem ser conservadas por longos períodos de tempo.

A nível internacional, muitos laboratórios tem adoptado o uso de papel de filtro para a colheita de amostras de sangue devido às facilidades e às enúmeras vantagens que este novo método de amostragem oferece (Riddell *et al.*, 2002). Em Moçambique, apesar do mesmo ser usado nalgumas pesquisas, como por exemplo no diagnóstico do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), desconhece-se ainda a aplicação do referido método na pesquisa da IgM anti-sarampo. Entretanto, trata-se dum método que se mostra extremamente vantajoso para o contexto Moçambicano. Com efeito, analisando as vantagens referidas no ponto anterior podemos considerar que o facto das amostras colhidas em papel de filtro:

- Serem de fácil colecta, requerendo menos treino médico, é extremamente vantajoso para as zonas do País nas quais o número de pessoal treinado é bastante reduzido.
- Não requererem condições especiais para seu transporte e armazenamento, podendo ser imediatamente transportadas em envelopes selados, é bastante benéfico ao considerarmos os frequentes cortes de energia ou até a sua escassez em várias regiões do País. No caso das amostras de soro, esta situação provocaria diversos problemas logísticos.
- Serem menos onerosas em relação às amostras de soro, faz com que se tornem mais adequadas para a realidade económica do País.

Tendo em conta os argumentos acima citados, a validação do procedimento operacional para o diagnóstico laboratorial do sarampo com base nas amostras de sangue total colhidas em papel de filtro é extremamente pertinente para futuras investigações na área do sarampo e/ou outras doenças. Este estudo poderá, também, ser útil na vigilância epidemiológica do sarampo em Moçambique.

2. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo geral

- Padronizar um método para a eluição de amostras de sangue total colhidas em papel de filtro para a detecção da IgM contra o vírus do sarampo.

2.2. Objectivos específicos

- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de cada um dos diferentes métodos de eluição usados.
- Determinar a percentagem de concordância de cada um dos diferentes métodos de eluição usados, em relação ao método padrão.
- Determinar a significância das diferenças observadas em cada um dos diferentes métodos de eluição usados, relativamente ao método padrão.

3. HIPÓTESE

Óptimas eluições do papel de filtro serão alcançadas com a solução de eluição preparada com 5% de leite em pó magro diluído em *PBST*_20 a 0,5%.

4. ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado no laboratório de serologia do Departamento de Imunologia do I.N.S, localizado no recinto do Hospital Central de Maputo (HCM). Este laboratório está envolvido no diagnóstico e pesquisa de várias doenças virais para a saúde pública, como por exemplo, HIV/SIDA, hepatite B, sarampo, rubéola, entre outras.

As amostras para o estudo foram colhidas em dois centros de saúde da cidade de Maputo: Centro de Saúde da Malhangalene, localizado no Bairro da Malhangalene “B” e Centro de Saúde 1º de Maio, localizado no Bairro da Maxaquene “C” (figura 1). A escolha destes centros deveu-se ao facto dos mesmos se encontrarem entre os centros que apresentam um maior fluxo de vacinações.

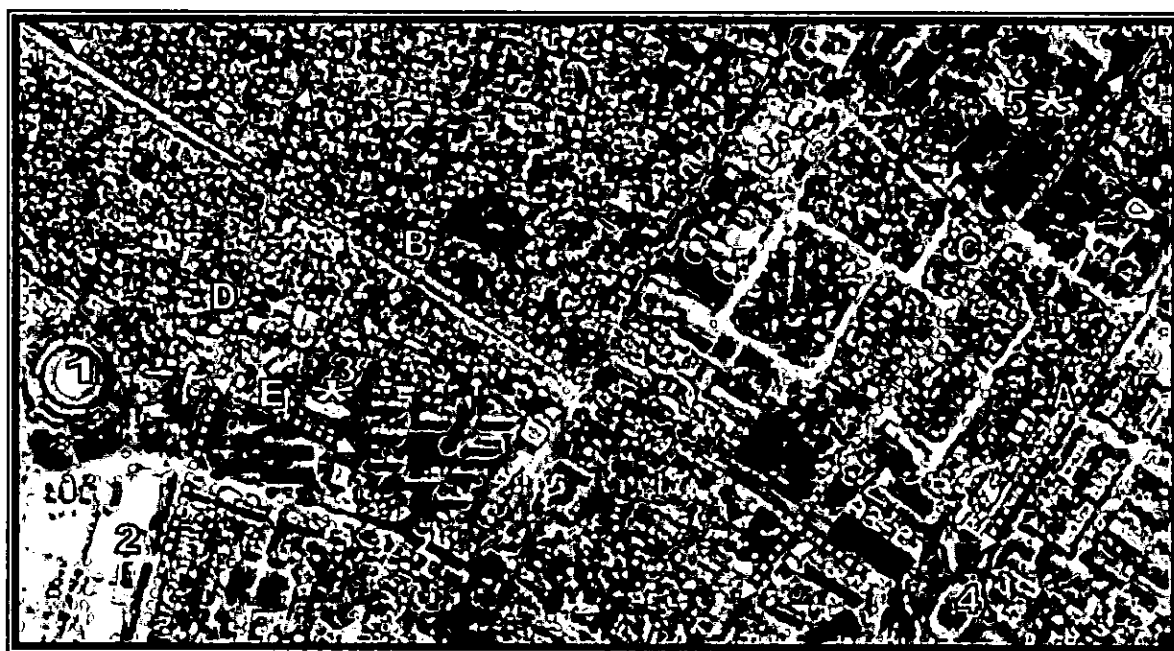


Figura 1: Mapa da localização geográfica dos Centros de Saúde da Malhangalene e do 1º de Maio

Legenda da figura:

- 1 – Praça de touros
- 2 – Centro Comercial Shoprite
- 3 – Centro de saúde da Malhangalene
- 4 – Praça da OMM
- 5 – Centro de Saúde 1º de Maio

- A – Avenida Vladimir Lenini
- B – Avenida Joaquim Alberto Chissano
- C – Rua da Resistência
- D – Avenida Milagre Mabote
- E – Rua de Setúbal

5. METODOLOGIA

5.1. Desenho do estudo

O presente estudo teve um carácter transversal para a comparação de métodos de diagnóstico qualitativos, usando amostras de plasma e de sangue total colhidas em papel de filtro.

5.2. Tamanho da amostra e população de estudo

O tamanho da amostra foi calculado com base na seguinte fórmula (Kahn, 1989):

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times p(1-p)}{Se^2}$$

Onde :

n – Tamanho da amostra

$Z_{\alpha/2}$ – Z-score a 95% (1,97)

p – Sensibilidade/especificidade

Se – Erro padrão esperado (10%)

O tamanho amostral calculado para este estudo foi de 70 amostras, sendo:

– 35 positivas para a IgM anti-sarampo, a serem colhidas em crianças pós-vacinadas contra o sarampo, devido ao facto da IgM ser produzida após uma infecção natural ou após uma infecção induzida por vacinação sendo que a mesma não permanece por muito tempo no organismo (Helfand *et al.*, 1998; Helfand *et al.*, 1999; WHO, 2000); e

– 35 negativas para a IgM anti-sarampo, a serem colhidas em indivíduos adultos (com idades superiores aos 20 anos), uma vez que estas amostras seriam certamente negativas para a IgM anti-sarampo. Segundo Helfand *et al.* (1998), Helfand *et al.* (1999) e WHO (2000), numa infecção pelo vírus do sarampo, a IgM é a primeira das imunoglobulinas a ser produzida e também a primeira a decair, não permanecendo por mais de oito semanas no soro e/ou plasma.

Para a obtenção das amostras positivas, foram colhidas amostras de sangue venoso em 106 crianças de ambos sexos, com idades compreendidas entre os 9 e os 12 meses. O período de colheita destas amostras decorreu entre os meses de Setembro e Novembro do ano de 2006. Foram incluídas no estudo as crianças vacinadas contra o sarampo que, a pedido dos investigadores, compareceram nos Centros de Saúde 15 dias após a administração da vacina. Não foi aplicado nenhum critério de exclusão. Apesar do tamanho amostral calculado ter sido de 35 amostras positivas para a IgM anti-sarampo, foram colhidas 106 amostras para assegurar qualquer imprevisto que pudesse surgir com relação às mesmas.

Surpreendentemente, após a testagem das 106 amostras supostamente positivas para a IgM anti-sarampo (usando o plasma - método padrão), verificou-se que 25 delas revelaram-se negativas para a mesma. Assim sendo, e devido ao facto do presente estudo requerer bastante tempo, ora escasso, ao invés de se recorrer aos indivíduos adultos para a obtenção das amostras negativas, conforme descrito anteriormente, optou-se por analisar somente aquelas 25 amostras negativas (encontradas no grupo das 106 amostras colhidas em crianças pós-vacinadas). Entretanto, reduziu-se igualmente o número das amostras positivas para 25, dado que o cálculo para o tamanho amostral revelou quantidades iguais para ambas amostras (positivas e negativas).

5.3. Considerações éticas

Pelo facto do presente estudo ter requerido um contacto directo com pacientes humanos para a extracção de amostras de sangue, ele foi submetido e aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde em Moçambique.

5.4. Colheita e conservação das amostras

Antes de se proceder com a colheita das amostras, todos os tutores das crianças foram informados acerca do estudo, para que se obtivesse o seu consentimento e a sua participação. Aos mesmos, foi-lhes entregue a folha de consentimento informado para que assinassem (Anexo 1).

Após obter-se o consentimento por parte dos tutores das crianças, procedeu-se com a colheita das amostras de sangue. Para tal, registou-se num tubo contendo o anticoagulante EDTA o nome da criança e um código que foi atribuído a cada criança para uma posterior identificação no Departamento de Imunologia do I.N.S. Foi também preenchida uma ficha onde constava o código

atribuído a cada criança, o nome da criança, sexo, idade, data da vacinação e data da colheita (Anexo 2).

Posteriormente, o local donde se pretendia extrair o sangue (fossa cubital) foi desinfectado e se efectuou, então, a colheita da amostra. Esta, consistiu na extracção do sangue venoso para um tubo contendo o anticoagulante EDTA até perfazer $\frac{3}{4}$ do volume total do tubo, cuja capacidade era de 5ml.

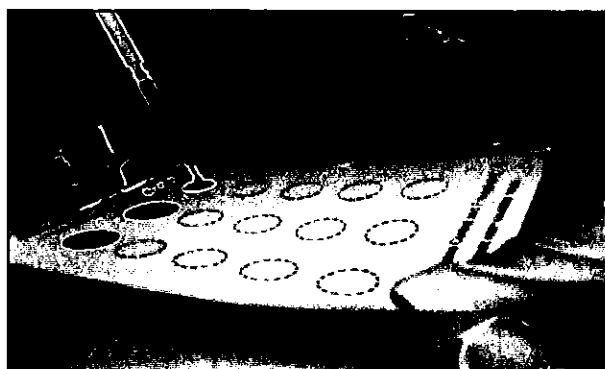
No fim de cada colheita, as amostras foram conservadas (processo este que durava entre quatro a cinco horas) e depois foram transportadas para o Departamento de Imunologia do I.N.S em condições de biossegurança (no interior de uma caixa térmica contendo gelo e um suporte apropriado para os tubos e sem qualquer contacto das amostras com o exterior).

Chegadas ao Departamento de Imunologia do I.N.S, as amostras foram processadas e conservadas por cerca de um mês e meio, altura em que se efectuou a análise das mesmas.

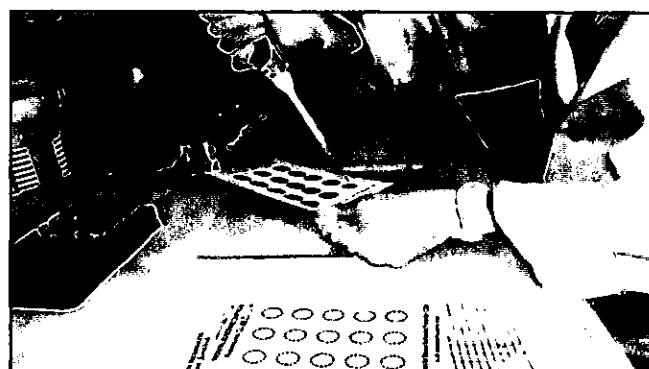
5.5. Processamento das amostras:

– Preparação das amostras de sangue seco em papel de fitro e das amostras de plasma

Após a chegada das amostras no Departamento de Imunologia, 100 μ l do sangue total presente no tubo foram transferidos para cada um dos 15 círculos do papel de filtro S&S nº 903, com a data e o código de cada criança já registados. Cada círculo continha 13mm de diâmetro.



a



b

Figura 2: Ilustração das amostras de sangue em papel de filtro

Deixou-se o sangue presente nos papeis de filtro secar (em estantes de secagem apropriadas) a temperatura ambiente durante 24 horas; depois de seco, os papeis de filtro foram colocados em sacos plásticos apropriados do tipo “zip-lock” contendo silica gel para absorver a humidade existente no interior do plástico.

Por fim, as amostras de sangue seco em papel de filtro foram conservadas à temperatura ambiente por cerca de um mês e meio, altura em que se procedeu com a testagem das mesmas.

O sangue restante no tubo foi centrifugado (5000rpm/10 min.) e se extraiu o plasma, que foi depois transferido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para pequenos crioviais já identificados (código e data da colheita) e, posteriormente, foi conservado a - 20°C até a altura da testagem das amostras (aproximadamente um mês e meio depois).

5.6. Testagem das amostras

a) Amostras de plasma

As amostras de plasma foram testadas e validadas de acordo com as instruções do prospecto do Kit da Enzygnost® Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha), independentemente das amostras de sangue seco em papel de filtro (Anexo 3 e 4). Estas amostras foram consideradas como padrão para a comparação dos métodos de eluição usados para o estudo.

Todas as amostras que se mostraram indeterminadas para o plasma foram descartadas da análise dos métodos de eluição, uma vez que se desconhecia a sua verdadeira característica (positiva ou negativa).

b) Amostras de sangue seco em papel de filtro

Apenas as amostras que se revelaram positivas e as que se revelaram negativas para o plasma foram testadas para os diferentes métodos de eluição do papel de filtro. O tamanho considerado foi de 25 amostras para ambos casos, conforme detalhado em parágrafos anteriores (vide 5.2).

As amostras de sangue seco (DBS) em papel de filtro foram eluídas no dia anterior à sua testagem (por cerca de 14 horas) para um maior rendimento na extracção da IgM presente no papel de filtro. Para tal, dois discos de DBS com 6mm de diâmetro cada foram cortados com um furador metálico e

colocados em crioviais. Em seguida, foram depositados em cada criovial 220 µl de cada solução de eluição, nomeadamente:

1. Tampão para amostras proveniente no kit da Enzygnost® Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha) – Método de eluição 1;
2. PBS – Método de eluição 2;
3. PBST_20 a 0.5% – Método de eluição 3;
4. 5% de leite em pó magro (OXOID, Inglaterra) diluído em PBST_20 a 0.5% – Método de eluição 4;

Vide detalhes das eluições e da preparação das diferentes soluções de eluição no anexo 5.

As amostras de DBS foram depois testadas de acordo com as instruções do kit da Enzygnost® Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha) mas com algumas modificações (Anexo 6). O critério usado para a validação do teste dos DBS foi o mesmo que o usado para as amostras de plasma (Anexo 4).

5.7. Processamento e análise estatística dos dados

Os dados foram digitados e processados em Microsoft office Excel (Microsoft corporation USA, 1985-2003). E, com o programa Stata Statistical Software (release 9.0, Stata Corporation, College Station, Texas, 2005), foram feitas os seguintes cálculos/análises estatísticas:

- Determinação da *sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo* e respectivos intervalos de confiança a 95% para cada um dos métodos 1, 2, 3 e 4, assumindo o plasma como padrão ouro.
- Determinação da *percentagem de concordância* das amostras reportadas como positivas e negativas para cada um dos métodos 1, 2, 3 e 4.
- Determinação do *valor do coeficiente kappa* (nível de concordância) e o seu respectivo intervalo de confiança a 95% entre cada um dos métodos 1, 2, 3 e 4.

- Cálculo do *teste de MacNemar* para determinar a significância da diferença observada na proporção de IgM anti-Sarampo detectada usando cada um dos métodos de 1 à 4.

Todas as amostras que se mostraram indeterminadas para qualquer um dos métodos de eluição foram excluídas da análise estatística.

6. RESULTADOS

6.1. Características demográficas da população estudada

Das 50 amostras (25 positivas e 25 negativas para o método padrão) seleccionadas para a análise dos métodos de eluição do papel de filtro, 29 foram provenientes do Centro de Saúde da Malhangalene, das quais 11 foram colhidas em crianças do sexo feminino e 18 foram colhidas em crianças do sexo masculino. As restantes 21 foram amostras provenientes do Centro de Saúde 1º de Maio, das quais 15 foram colhidas em crianças do sexo feminino e seis em crianças do sexo masculino (tabela 1). Todas as amostras foram provenientes de crianças que pertenciam à faixa etária dos nove meses.

Tabela 1: Características demográficas da população estudada

Proveniência	Sexo		Total
	Feminino	Masculino	
C.S. M ^a	11	18	29
C.S. 1º M ^b	15	6	21
Total	26	24	50

^a Centro de Saúde da Malhangalene

^b Centro de Saúde 1º de Maio

6.2. Método padrão

Das 106 amostras testadas para o método padrão (plasma), 62 tiveram um resultado positivo, 25 mostraram um resultado negativo, e 19 foram indeterminadas (tabela 2).

Tabela 2: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em amostras de plasma

Resultado do plasma	Nº de amostras
Positivo	62 (58%)
Negativo	25 (24%)
Indeterminado	19 (18%)
Total	106 (100%)

6.3. Método de eluição 1 (Tampão para amostras)

Das 25 amostras positivas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o método de eluição 1, cinco mostraram-se positivas, sete negativas e 13 indeterminadas. Em relação às 25 amostras negativas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o mesmo método de eluição, 21 mostraram-se negativas, duas foram positivas e duas indeterminadas (tabela 3). Este método mostrou uma sensibilidade de 42%, uma especificidade de 91%, VPP de 71%, VPN de 75% e uma concordância de 74%. O coeficiente Kappa apresentou um valor de 0,366, e o valor referente ao qui-quadrado de MacNemar foi de 0,0956 (tabela 4).

Tabela 3: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com tampão para amostras

		Método de eluição 1			Total
		Pos ^a	Neg ^b	Ind ^c	
Plasma	Pos	5	7	13	25
	Neg	2	21	2	25
Total		7	28	15	50

^a Positivas

^b Negativas

^c Indeterminadas

Tabela 4: Comparação dos métodos de eluição relativamente aos diferentes parâmetros calculados

PARÂMETRO	MÉTODOS			
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
Nº de Indeterminados	15 (30%)	15 (30%)	13 (26%)	13 (26%)
Sensibilidade (%)	42 (*15,2% - 72,3%)	93 (*66,1% - 99,8%)	86 (*85,2% - 100%)	100 (*78,2% - 100%)
Especificidade (%)	91 (*71,9% - 98,9%)	100 (*83,9% - 100%)	100 (*57,2% - 98,2%)	100 (*84,5% - 100%)
^a VPP (%)	71	100	100	100
^b VPN (%)	75	95	92	100
Concordância (%)	74	97	95	100
Coeficiente Kappa	0.366	0.940	0.882	1
^c X ² MacNemar	0,0956	0,32	0,16	1

^a Valor preditivo positivo

^b Valor preditivo negativo

^c Qui-quadrado de MacNemar

*Intervalo de confiança de 95%

6.4. Método de eluição 2 (PBS)

Das 25 amostras positivas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o método de eluição 2, 13 mostraram-se positivas, uma mostrou-se negativa e 11 foram indeterminadas. Em relação às 25 amostras que foram negativas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o mesmo método de eluição, 21 apresentaram-se negativas e quatro mostraram-se indeterminadas (tabela 5). Este método de eluição mostrou uma sensibilidade de 93%, uma especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN de 95%, uma concordância de 97%, o valor do coeficiente Kappa foi de 0,32 e o valor referente ao qui-quadrado de MacNemar foi de 0,940 (tabela 4).

Tabela 5: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com *Phosphate Buffered Saline*

		Método de eluição 2			Total
		Pos ^a	Neg ^b	Ind ^c	
Plasma	Pos	13	1	11	25
	Neg	0	21	4	25
Total		13	22	15	50

^a Positivas

^b Negativas

^c Indeterminadas

6.5. Método de eluição 3 (PBST_20 a 0,5%)

Das 25 amostras positivas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o método de eluição 3, 12 mostraram-se positivas, duas negativas e 11 foram indeterminadas. Em relação às 25 amostras negativas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o mesmo método de eluição, 23 mostraram-se negativas e duas apresentaram um resultado indeterminado (tabela 6). Este método de eluição mostrou uma sensibilidade de 86%, uma especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN de 92%, uma concordância de 95%, o valor referente ao coeficiente Kappa foi de 0,16 e o valor referente ao qui-quadrado de MacNemar foi de 0,882 (tabela 4).

Tabela 6: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com *Phosphate Buffered Saline Tween_20* a 0,5%

		Método de eluição 3			Total
		Pos ^a	Neg ^b	Ind ^c	
Plasma	Pos	12	2	11	25
	Neg	0	23	2	25
Total		12	25	13	50

^a Positivas

^b Negativas

^c Indeterminadas

6.6. Método de eluição 4 (5% de leite em pó magro diluído em *PBST_20* a 0,5%)

Das 25 amostras positivas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o método de eluição 4, 15 foram positivas e 10 foram indeterminadas. Em relação às 25 amostras negativas para o plasma, e que foram testadas para a análise do papel de filtro usando o mesmo método de eluição, 22 mostraram-se negativas e três mostraram um resultado indeterminado (tabela 7). Este método de eluição mostrou uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN de 100%, uma concordância de 100%, o valor do coeficiente kappa foi igualmente de 1 e o valor referente ao qui-quadrado de MacNemar foi de 1 (tabela 4).

Tabela 7: Resultados da serologia de IgM anti-sarampo em sangue seco em papel de filtro eluído com 5% de leite em pó magro diluído em *Phosphate Buffered Saline Tween_20* a 0,5%

		Método de eluição 4			Total
		Pos ^a	Neg ^b	Ind ^c	
Plasma	Pos	15	0	10	25
	Neg	0	22	3	25
Total		15	22	13	50

^a Positivas

^b Negativas

^c Indeterminadas

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foram testados 4 métodos de eluição: o método 1 (Tampão para amostras), o método 2 (PBS), o método 3 (PBST_20) e o método quatro (5% de leite em pó magro diluído em PBST_20 a 0,5%). Estes métodos produziram resultados diferentes (tabela 4).

Se observarmos detalhadamente a tabela 4, podemos reparar que o método 4 apresenta melhores resultados comparativamente aos restantes métodos. Ele mostrou óptimos valores em relação aos parâmetros calculados para a validação do mesmo (sensibilidade de 100%, especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN também de 100%, concordância de 100%, coeficiente Kappa de 1 e o valor correspondente ao qui-quadrado de MacNemar, também foi de 1). Era de se esperar que este método apresentasse óptimos resultados, uma vez que o leite magro em pó consiste em proteínas que são usadas como agentes bloqueadores, o que ajuda na redução das reactividades não específicas (Weir *et al.*, 1986). Reagente este, que não está presente nos outros métodos. Contudo, apesar deste ter sido o melhor método, mostrou um elevado número de indeterminados. O mesmo verificou-se nos restantes métodos de eluição (Tabela 4).

O elevado número de indeterminados encontrados representou uma grande desvantagem para o estudo. Entretanto, esta elevada percentagem de indeterminados pode ter sido causada pela ocorrência de reacções não específicas nos poços do teste ELISA, provavelmente devido à presença de Hemoglobina ou de fibras do papel de filtro que afectam na maior parte das vezes, a capacidade do teste detectar IgM (Edwards, 1999); as reacções não específicas podem também ter sido exacerbadas pelo facto do teste ELISA utilizado ser baseado em lesados celulares e virais, antígenos que frequentemente estão associados a reactividades não específicas (Edwards, 1999).

Com base na tabela 4, o método 4, que consistia na solução de eluição preparada com 5% de leite em pó magro diluído em *phosphate buffered saline tween_20* a 0,5%, mostra-se como sendo o melhor método para eluir as amostras de sangue colhidas em papel de filtro para a detecção da IgM anti-sarampo. Este achado reforça a hipótese anteriormente formulada, assim como os estudos efectuados por Riddell *et al.* (2002), que também apontam para a eluição com 5% de leite em pó magro diluído em *phosphate buffered saline tween_20* a 0,5% como sendo o melhor método para eluir estas amostras. Contudo, mais trabalho é necessário para a padronização final, uma vez que, com a redução no tamanho amostral e com o elevado número de indeterminados encontrados, não foi possível alcançar com precisão esta padronização.

Surpreendentemente, das 106 amostras que foram colhidas em crianças pós-vacinadas e que foram testadas para a IgM anti-sarampo usando o método padrão, encontrou-se 24% (o que correspondia a 25 amostras) cujo resultado para a IgM revelou-se negativo (Tabela2). Era suposto que as 106 amostras fossem todas positivas para a IgM anti-sarampo (ou seja, que apresentassem essa imunoglobulina) uma vez que todas as amostras eram provenientes de crianças vacinadas. Como possíveis respostas, pode-se considerar um desenvolvimento retardado ou até mesmo o não desenvolvimento da IgM face à vacina administrada. Este aspecto, pode estar associado ao estado nutricional ou ao estado imunológico das crianças em questão ou, ainda, a diversos aspectos logísticos relacionados com a conservação e/ou administração da vacina (Toptygina *et al.*, 2005).

Podem, também, estar implicados no desenvolvimento retardado ou não desenvolvimento da IgM face à vacinação, factores de ordem genética, como é o caso dos alelos do sistema HLA (*human leucocyte antigen*) que são característicos de cada etnia e população e diferem entre indivíduos da mesma espécie (Monte *et al.*, 2003). Segundo van Eden *et al.*, (1982), citado por Coimbra Jr. (1987), este sistema funciona como centro controlador da amplitude da resposta imunológica do organismo, e factores ligados a este sistema actuam como moduladores do tipo da resposta imunológica do indivíduo frente aos microrganismos.

Portanto, torna-se necessário trabalhar e aprofundar mais esta matéria para elucidar a aparente baixa eficácia vacinal, e um bom método baseado em sangue seco em papel de filtro será crucial para estudos de larga escala a nível nacional.

É de salientar que o uso do papel de filtro apresenta um grande impacto na saúde pública, para a vigilância de casos e para a pesquisa e medição da eficácia vacinal, visto ser um método que apresenta facilidades de colecta, transporte e conservação (Parker & Cubit, 1999; Riddell *et al.* 2002; Mubarak *et al.*, 2004).

8. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a solução de eluição preparada com 5% de leite em pó magro diluído em *PBST_20* a 0,5% (método 4), foi a melhor solução para eluir as amostras de sangue colhidas em papel de filtro para a detecção da IgM específica contra o vírus do sarampo. Esta observação demonstra ser possível padronizar um método para a eluição de amostras de sangue colhidas em papel de filtro para a detecção da IgM-anti sarampo, com vista a ser um método alternativo ao método padrão actualmente em uso no País.

9. RECOMENDAÇÕES

- 1- Estudos de desenvolvimento de anticorpos, nomeadamente IgM e IgG pós-vacinação, são recomendados para o caso de Moçambique, para se saber a época exacta em que estes atingem o seu apogeu.
- 2- Estudos para identificar as causas das reactividades não específicas de modo a reduzi-las.
- 3- Estudos de eficácia das vacinas contra o vírus do sarampo, uma vez que foram verificados muitos casos de IgM negativos e indeterminados.
- 4- Estudos de eficácia vacinal contra o vírus do sarampo no contexto do HIV/SIDA.
- 5- Reforços nas campanhas de sensibilização para as vacinações, uma vez que foram reportados casos de mães que levaram as crianças para a vacinação contra o sarampo fora do calendário de vacinações.

10. LIMITAÇÕES

- O elevado e inesperado número de Indeterminados.
- Deficiência de literaturas, que poderiam guiar para uma melhor interpretação e discussão dos resultados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baron, S. (1996). Medical Microbiology. 4ª edição, 620 pp., Texas.

Behrman, R.E. & R.M. Kliegman (1999). Nelson-Princípios de Pediatria. 3ª edição, 690 pp., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.

Coimbra Jr., C.E.A. (1987). O Sarampo entre Sociedades Indígenas Brasileiras e Algumas Considerações Sobre a Prática da Saúde Pública entre Estas Populações. Caderno de Saúde Pública, 3 (1): 22-37

Edwards, R. (1999). Immunodiagnostics. 281 pp., New York.

Helfand, R.F., H.E.G. Jr., W.L. Atkinson, J.D. Nordin, H.L. Keyserling & W.J. Bellini (1998). Decline of Measles-Specific Immunoglobulin M Antibodies after Primary Measles, Mumps, and Rubella Vaccination. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 3(5): 135-138.

Helfand, R.F., S. Kebede, J. Howard E. Gary, H. Beyene & W.J. Bellini (1999). Timing of Development of Measles-Specific Immunoglobulin M and G after Primary Measles Vaccination. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2(6): 178-180.

Hermann, H. & A.D.S. Pegararo (1986). Enfermagem Em Doenças Transmissíveis. 157 pp., São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária LTDA.

Janeway, C.A., P. Travers, S. Hunt & M. Walport (1997). Immunology - The Immune System in Health and Disease. 3ª edição, 700 pp., New York.

Krugman, S., S.L. Katz & A.A. Gershon (1998). Doenças Infecciosas Na Infância. 9ª edição, 411 pp., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.

Manuila, L., A. Manuila, P. Lewalle & M. Nicoulin (2001). Dicionário Médico. 2ª edição, 857 pp., Lisboa.

MISAU, Boletins epidemiológicos (1989 - 2005).

Monte, S.J.H. do, J.M.M. Neto, G.F. Rampim, N. Shulzhenko, A. Morgun, M.G. DeLima (2003). Polimorfismo do Sistema HLA em uma Amostra de Mestiçoda Popilação de Teresina, Piauí.

<http://www.scielo.br/>, 12.08.03, 08.12.06

Mubarak, H.S.E., S. Yüksel, O.M. Mustafa, S.A. Ibrahim, A.D.M.E. Osterhaus & R.L.D. Swart (2004). Surveillance of Measles in Sudan Using Filter Paper Blood Samples. Journal of Medical Virology, (73): 624-630.

Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi & M.A. Pfaller (2004). Microbiologia Médica. 4ª edição, 761 pp., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.

OPAS (1980). Controle das Doenças Transmissíveis no Homem. 420 pp., Washington, D.C., Abram S. Benensos Editor.

Parker, S.P. & W.D. Cubitt (1999). The use of dried blood spot sample in epidemiological studies. Journal of Clinical Pathology, (52): 633 – 639.

Ratnan, S., G. Tipples, C. Head, M. Fauvel, M. Fearon & B.J. Ward (2000). Perfomance of Indirect Immunoglobulin M (IgM) Serology Tests and IgM Captue Assays for Laboratory Diagnosis of Measles. Journal of Clinical Microbiology, (38): 99-104.

Riddell, M.A., J.A. Leydon, M.G. Catton & H.A. Kelly (2002). Detection of Measles Virus-Specific Immunoglobulin M in Dried Venous Blood Samples by Using a Commercial Enzyme Immunoassay. Journal of Clinical Microbiology 1(40): 5-9.

Rosen, F.S., L.A. Steiner & E.R. Unanue (1990). Dictionary of Immunology, 223 pp., Britain.

Schechter, M. & D.V. Marangoni (1994). Doenças Infecciosas: Conduta Diagnóstica e Terapêutica. 228 pp., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.

Stewien, K.E., L.R.D.A.V.D. Lima, V.F. Botosso, M.I.D. Oliveira, S.N. Fagundes, M.B. Nogueira, S.L.B. Ragazzi, M.T.Z.D. Costa, B. Ejzenberg & E.L. Durigon (2000). Clinical and Laboratory

Evaluation of Measleslike Rash in Children and Young Adults. Brazilian Journal of Microbiology, 3(31): 1-8.

Toptygina, A.P., A.L. Pukhalsky & V.A. Alioshkin (2005). Immunoglobulin Profile of Antimeasles Response in Vaccinated Children and in Adults With Measles History. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, (12): 845-847.

Weir, D.M., L.A. Herzenberg, Caroline Blackwell & L.A. Herzenberg (1986). Immunochemistry. 4th, 356 pp., London,

WHO (2000). Manual for the Laboratory Diagnosis of Measles Vírus Infection. 49 pp., Swizerland.

ANEXOS**Anexo 1: Consentimento informado e informação ao paciente****a) Consentimento informado**

Nome da criança: _____; Código: _____

Data de nascimento: _____

Consentimento assinado

Eu, _____, (Pai, Mãe, Tutor da criança) confirmo que fui informada de forma satisfatória de que o presente estudo tem por finalidade avaliar se ao colher amostras de sangue total em papel de filtro de crianças de nove meses de idade, 15 dias depois da administração da vacina contra o sarampo, podem ser detectados anticorpos em quantidade e qualidade suficientes com as de soro de forma a padronizar a técnica para as amostras em papel de filtro.

Os resultados do estudo beneficiarão o control e vigilância epidemiológica do sarampo a ser implementada em Moçambique. Neste sentido fui esclarecida(o) da natureza da participação da minha criança e da minha própria pessoa (Tutor, Mãe, Pai) nesta investigação, dos riscos e benefícios que dela decorrem, e ainda do direito que tenho de nos retirarmos do estudo em qualquer momento sem prejuízo do actual tratamento médico ou outro que venha a ser posteriormente necessário. Confirmo também que se tiver perguntas a fazer, poderei contactar a qualquer momento aos supervisores do estudo:

Dr. Ilesh Jani, dr. Cornélio Balane, dr. Tufária Mussá.

Assinatura (Tutor, Mãe, Pai): _____ Data: _____

BI: _____; Arq. Ident: _____; Data de emissão: _____

Assinatura do enfermeiro (a) _____ Data: _____

Consentimento verbal

Eu (Nome da enfermeira legível) _____, confirmo que li o DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO ao (Tutor, Mãe, Pai) da (o) paciente _____ (Nome em letra de imprensa) e lhe expliquei de forma devida a finalidade e os métodos do estudo. O _____ (Pai/ Mãe/Tutor) autorizou a participação no estudo. Confirmo também que foi avisado que poderá retirar-se do estudo a qualquer momento sem prejuízo para o tratamento actual ou futuro da criança.

Assinatura (Enfermeira): _____ Data: _____

BI: _____; Arq. Ident: _____ Data de emissão: _____.

b) Informação ao paciente

Título do projecto: Avaliação comparativa do diagnóstico serológico da IgM contra o vírus de sarampo usando amostras de soro e amostras de sangue total seco em papel de filtro.

Finalidades do estudo

A doença do sarampo é causada por um vírus que pode causar morte em crianças e adultos. As crianças quando nascem estão protegidas contra o sarampo nos primeiros meses de vida. Essa protecção é transmitida pela mãe durante os últimos dias de gravidez. A protecção no recém nascido vai diminuindo gradualmente e desaparece no primeiro ano de vida. A melhor maneira de proteger a criança depois da protecção materna desaparecer, é vacinar contra o sarampo.

Em Moçambique, o diagnóstico de sarampo requer uma amostra de sangue tirada da veia, de modo a detectar anticorpos IgM contra o vírus de sarampo.

Este estudo tem como finalidade avaliar se usando amostras de sangue total colhidas em papel de filtro, é possível detectar a IgM em quantidades suficientes de modo a validar a técnica de eluição e usá-la para o diagnóstico de sarampo.

Os resultados deste estudo serão usados na rotina da vigilância epidemiológica do sarampo por forma a substituir a colheita de sangue por venopunção.

Gostaríamos de saber se está disposta a participar no estudo.

Procedimentos

Se concordar em participar no estudo, vamos lhe fazer algumas perguntas sobre nome, idade e o estado vacinal da criança. O estudo implicará recolha de sangue venoso apartir da veia do braço. Este método é desconfortável, mas é importante para podermos avaliar e padronizar a técnica de eluição e substituírmos a colheita de sangue picando a veia do braço em futuros casos ou suspeitas de sarampo.

Riscos e benefícios

Em nenhum momento do estudo estarão sobre risco e os resultados deste estudo poderão ser úteis na vigilância epidemiológica do sarampo em Moçambique assim como noutros estudos epidemiológicos.

Duração do estudo

Para a colheita de amostras em crianças recém vacinadas o estudo vai durar no máximo dois meses e a sua criança apenas será picada uma única vez e ser-lhe-á atribuído um valor de trinta mil meticais (30.000 MT) para o transporte.

Garantia de confidencialidade

Os seus dados e resultados serão tratados com rigorosa confidencialidade. Contudo, eles poderão ser analisados pelas autoridades supervisoras do estudo.

Participação voluntária

Você é livre de decidir se deseja ou não participar neste estudo e em qualquer momento você pode sair do estudo, sem nenhuma consequência de restrição do serviço prestado neste centro de saúde.

Mesmo se decidir não participar, isso não terá qualquer consequência negativa no seu atendimento ou da criança.

Se estiver disposto a participar neste estudo, ser-lhe-á pedido que assine o formulário de "Consentimento informado". Se não puder assinar, poderá dar o consentimento verbal. Neste caso, o consentimento verbal será testemunhado pela (o) enfermeira (o) que estiver a ler este documento para si.

Anexo 3: Princípio do teste Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha)

Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha) é um teste imuoenzimático para a determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos específicos de IgM contra o vírus do sarampo no soro ou plasma humano e nos eluídos de amostras de DBS.

- O Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha) é um teste ELISA baseado no princípio de “sandwich” numa única etapa.
- O absorvente RF fixa-se à IgG existente na amostra da análise. Se existir na amostra, o factor reumatoide fixa-se a estes imunocomplexos, sendo assim eliminado. O absorvente RF precipita até 15 mg de IgG/ml (em relação à amostra não diluída), extirpando assim, o vírus específico da IgG. Este efeito colateral aumenta a sensibilidade da detecção de IgM.
- Os anticorpos específicos de IgM contra o vírus do sarampo contidos na amostra de análise, fixam-se aos antígenos nos poços de reacção da placa do teste. O conjugado Anti IgM humana/POD fixa-se nestes anticorpos específicos.
- A porção enzimática do conjugado transforma a solução de uso cromógeno formando uma cor azul. Acrescentando solução de paragem POD, esta reacção termina com uma alteração amarela da cor.
- Desta forma, a IgM dirigida contra os antígenos celulares é denunciada na cuvete revestida do antígeno de controlo
- O valor diferencial da intensidade da cor obtida na amostra de análise entre o antígeno e o antígeno de controlo do revestimento da cuvete, constitui a medida do teor e a reactividade imunoquímica dos anticorpos do vírus.

Cuidados e precauções durante o procedimento

- Utilizar batas longas de mangas compridas com punho, luvas descartáveis, óculos e máscara de proteção individual
- Calçar sapatos fechados e de difícil penetração por material perfuro-cortante
- Manipular todos reagentes e componentes do kit com cuidado
- Limpar imediatamente qualquer derramamento de material que contenha agentes potencialmente infecciosos com hipoclorito de sódio a 0,5%
- Acondicionar em lugar próprio todo o material e reagentes no final da jornada
- Não utilizar reagentes após a data de validade e não modificar o procedimento. Nunca deixar as tiras secar mais de 10 minutos durante o teste
- Não misturar reagentes de lotes diferentes no decorrer de um mesmo ensaio
- Manusear as amostras assim como os controlos reactivos fortes, os reativos fracos e os não reativos com agentes potencialmente infecciosos
- Em casos de acidente ou contacto com os olhos lavar imediatamente com água em abundância e consultar um médico
- Respeitar as concentrações e tempos de actuação indicados pelo fabricante

Anexo 4: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de plasma e critérios de validação do teste segundo as instruções do kit Enzygnost Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha)

a) Procedimento para a testagem das amostras de plasma

Kit : Enzygnost Anti-Measles - Virus/IgM

Nº Cat.	Nº Lot. _____	Date Validade : _____
Kit suplementar : <u>Supplementary Reagents for Enzygnost/TMB</u>		
Nº Cat.	Nº Lot. _____	Date Validade : _____
Date: _____	No. Amostras: _____	No. de Strips: _____

Procedimento

Solução corada azul + Tampão da amostra (1:21)
 Solução azul 1050 µl + 21 ml Tampão da amostra
 ↓
 Diluir: amostra + Tampão da amostra corado de azul (1:21)
 Amostra 20 µl + 400 µl Tampão da amostra corado azul
 ↓
 Diluir : referência + Tampão da amostra corado de azul (1:21)
 P/N Referência 20 µl + 400 µl Tampão da amostra corado de azul
 P/P Referência 40 µl + 800 µl Tampão da amostra corado de azul
 ↓
 Preparar o RF absorvente: rehidratar numa solução de 5ml H₂O dest
 ↓
 Só as amostras são tratadas com RF lot _____ (1:2)
 Diluir as amostras 200 µl + 200 µl Solução de RF
 Misturar suavemente e absorver durante 15 min à temp. ambiente ou uma noite a 4°C
 ↓
 Distribuir 150 µl (P/N, P/P₁, amostra e P/P₂) nos poços da placa e poços de controlo do antigénio
 ↓
 Incubar 37 °C, 60 min (cobrir com uma folha de papel adesivo)
 ↓
 Lavagem POD 50 ml + 950 ml ED (1:20)
 Lavar 3X
 ↓
 Conjugado 300 µl + 15 ml Tampão conjugado
 Distribuir o conjugado 100 µl/poço (1:51)
 ↓
 Incubar a 37 °C, 60 min (Cobrir com nova folha de papel adesivo)
 ↓
 Lavar 3X
 ↓
 Cromogénio TMB 1200 µl + 12 ml Tampão TMB
 Dispensar TMB 100 µl/poço (1:11)
 ↓
 Incubar 30 min RT (cobrir com uma nova folha de papel adesivo)
 ↓
 Adicionar a solução de paragem 100 µl/poço
 ↓
 Ler a 450 nm (630- 650 nm como Ref.)

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado
P/N					
P/P1					
P/Pint					

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado
P/P2					

b) Folha de cálculos e validação do teste

Resultados

 $\Delta A < 0.10 = \text{Negativo}$ $\Delta A > 0.20 = \text{Positivo}$ $0.10 \leq A \leq 0.20 = \text{Indeterminado}$ **Nota:** _____

Controlo de Qualidade Interno

1. Extrapolação quantitativa :

limite inferior $\leq A_{\text{referência P/P}} \leq$ limite superior

Limite inferior = _____

Limite superior = _____

 ΔA da referência P/P no início = _____ ΔA da referência P/P no final = _____No limite ? : **SIM / NÃO**No limite ? : **SIM / NÃO****A leitura individual de P/P no início e no fim não deve diferir da média das 2 leituras em mais de 20%**

Média P/P = _____

Referência P/P no iní 20% Média = _____

Referência P/P no fim = _____

M - 20%	Média	M + 20%
_____	_____	_____

No limite ? : **SIM / NÃO**No limite ? : **SIM / NÃO** **ΔA de referência P/N deve ser sempre inf. a 0.1** ΔA da referência P/N = _____No limite ? : **SIM / NÃO**

2. Extrapolação quantitativa :

 ΔA de P/P deve ser sempre ≥ 0.2 No limite ? : **SIM / NÃO**

Anexo 5: Procedimento das eluições das amostras de sangue em papel de filtro e preparação das soluções de eluição

a) **Processamento das amostras de sangue seco em papel de filtro usando tampão para amostras como solução de eluição (Método 1)**

Dia anterior à testagem**Procedimento:**

Etapa 1: Cortar, com um furador metálico, dois discos (do sangue seco em papel de filtro), de 6mm cada para um vial anteriormente identificado com o código da criança e a data;

Etapa 2: Adicionar no tubo 220µl do tampão para amostras (proveniente no Kit da Enzygnost® Anti-Vírus do Sarampo-Vírus/IgM (Dade Behring, Alemanha));

Etapa 3: Fechar os tubos e agitar por inversão;

Etapa 4: Conservar os tubos por +/-24 horas à 4° C;

Dia da testagem**Procedimento:**

Etapa 1: Agitar bem os viais por inversão;

Etapa 2: De seguida, centrifugar os tubos (2.200 rpm/15 min);

Etapa 3: Proceder de acordo com a folha de trabalho (Anexo 6).

Preparação da solução de lavagem *PBST_20* (0,05%):

— Para 1000 ml de solução de lavagem:

Procedimento:

Passo 1: Dissolva 5 cápsulas de *PBS* em 1000ml de água destilada.

Passo 2: Acrescente 500µl de *Tween_20* a solução da etapa 1.

Passo 3: Agite suavemente para homogenizar a solução e feche com uma fita aderente até o momento das lavagens.

b) Processamento das amostras de sangue seco em papel de filtro usando Phosphate Buffered Saline (PBS) como solução de eluição (Método 2)

Dia anterior à testagem**Procedimento:**

Etapa 1: Preparar a solução de *PBS*; para tal, dissolva num elermeyer um comprimido de *PBS* em 200ml de água destilada, e de seguida coloque o elermeyer num agitador magnético até que o comprimido se dissolva por completo.

Etapa 2: Após a dissolução completa do comprimido, tapar o elermeyer com uma fita aderente e reservar a solução.

Etapa 3. Cortar, com um furador metálico, dois discos (do sangue seco em papel de filtro), de 6mm cada para um vial;

Etapa 2: Adicionar no tubo 220µl da solução de *PBS*;

Etapa 3: Fechar os tubos e agitar por inversão;

Etapa 4: Conservar os tubos por +/-24 horas à 4° C.

Dia da testagem

Procedimento:

Etapa 1: Agitar bem os tubos durante 15min a temperatura ambiente;

Etapa 2: De seguida, centrifugar os tubos (2.200 rpm/15 min);

Etapa 3: Proceder de acordo com a folha de trabalho (Anexo 6).

c) Processamento das amostras de sangue seco em papel de filtro usando Phosphate Buffered Saline-Tween 20 (PBST20) à 0,5% como solução de eluição (Método 3)

Dia anterior à testagem

Procedimento:

Etapa 1: Preparar a solução de *PBS-T20* à 0,5%; para tal, dissolva num elermeyer um comprimido de *PBS* com 200ml de água destilada. Leve o elermeyer a agitar num agitador magnético até que o comprimido se dissolva por completo.

Etapa 2: Após a dissolução completa do comprimido, acrescente no elermeyer 1000µl da solução de *tween-20*. Tapar o elermeyer com uma fita aderente e reservar a solução.

Etapa 3. Cortar, com um furador metálico, dois discos (do sangue seco em papel de filtro), de 6mm cada para um tubo;

Etapa 4: Adicionar no vial 220µl de *PBS-T20* à 0,5%.

Etapa 5: Fechar os viais e agitar

Etapa 6: Conservar os tubos por +/-24 horas à 4° C;

Dia da testagem

Procedimento:

Etapa 1: Agitar bem os viais a temperatura ambiente;

Etapa 2: De seguida, centrifugar os tubos (2.200 rpm/15 min);

Etapa 3: Proceder de acordo com a folha de trabalho (Anexo 6).

d) Processamento das amostras de sangue seco em papel de filtro usando 5% de leite em pó magro diluído em Phosphate Buffered Saline-Tween 20 (PBS-T20) à 0,5% como solução de cluição (Método 4)

Dia anterior a testagem

Procedimento:

Etapa 1: Preparar a solução de 5 % de leite em pó magro diluído em *PBS-T20* à 0,5%; para tal, dissolva num elermeyer um comprimido de *PBS* com 200ml de água destilada. Coloque no elermeyer uma fita magnética e agite num agitador magnético até que o comprimido se dissolva por completo.

Etapa 2: Após a dissolução completa do comprimido, acrescentar no elermeyer 0,5ml da solução de *tween-20*. Agitar suavemente o elermeyer para homogenizar a solução.

Etapa 3: Adicionar 5grs de leite em pó magro a solução da etapa 2. Agitar bem para dissolver o leite e filtrar a solução. Tapar com uma fita aderente e reservar a solução.

Etapa 4: Cortar, com um furador metálico, dois discos (do sangue seco em papel de filtro), de 6mm cada para um tubo;

Etapa 5: Adicionar no tubo 220µl da solução de *PBS-T20* à 0,5%.

Etapa 6: Fechar os tubos e agitar

Etapa 7: Conservar os tubos por +/-24 horas à 4° C;

Dia da testagem

Procedimento:

Etapa 1: Agitar bem os viais à temperatura ambiente;

Etapa 2: De seguida, centrifugar os tubos (2.200 rpm/15 min);

Etapa 3: Proceder de acordo com a folha de trabalho (Anexo 6).

Anexo 6: Folha de trabalho: Procedimento para a testagem das amostras de sangue seco em papel de filtro

Kit : Enzygnost Anti-Measles -Virus/IgM

Nº Cat. _____

Nº Lot. _____

Date Validade : _____

Kit suplementar : Supplementary Reagents for Enzygnost/TMB

Nº Cat. _____

Nº Lot. _____

Date Validade : _____

Date: _____

No. Amostras: _____

No. de Strips: _____

Procedimento

Preparar o RF absorvente: rehidratar numa solução de 5ml H2O dest



Só as amostras são tratadas com RF lot _____ (1:2)

Diluir as amostras 200 µl + 200 µl Solução de RF

Misturar suavemente e absorver durante 15 min à temp. ambiente ou uma noite a 4°C



tribuir 150 µl (P/N, P/P₁, amostra e P/P₂) nos poços da placa e poços de controlo do antigé



Incubar 37 °C, 90 min (cobrir com uma folha de papel adesivo)



Lavagem PBST_20 a 0,05% 1000 ml PBS + 500 µl T_20

Lavar 5X



Conjugado 300 µl + 15 ml Tampão conjugado

Distribuir o conjugado 100 µl/poço (1:51)



Incubar a 37 °C, 90 min (Cobrir com nova folha de papel adesivo)



Lavar 5X



Cromogénio TMB 1200 µl + 12 ml Tampão TMB

Dispensar TMB 100 µl/poço (1:11)



Incubar 30 min RT (cobrir com uma nova folha de papel adesivo)



Adicionar a solução de paragem 100 µl/poço



Ler a 450 nm (620 nm como Ref.)

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado
P/N					
P/P1					
P/Pint					

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado

Amostra	Ag	Controlo	Δ A	Result. FC	Resultado
P/P2					
