

B10-84

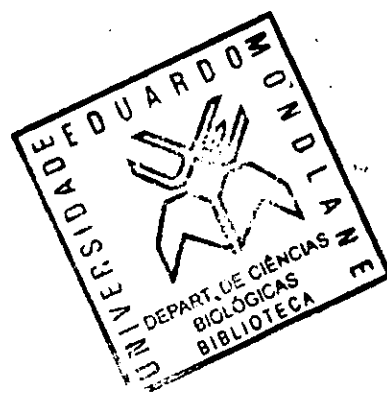


**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Estudos**  
**( Estágio )**

**Técnicas de Imunodiagnóstico Usadas no Laboratório de**  
**Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM**

**Autor : João Albano Mabunda**



**MAPUTO, Novembro de 2006**



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Estudos**  
**( Estágio )**

**Técnicas de Imunodiagnóstico Usadas no Laboratório de**  
**Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM**

**Autor :** João Albano Mabunda

**Supervisores :** Prof. Dr.<sup>a</sup> Elena Folgosa. MD, PhD  
dr. Arlindo Chauque

**Orientadores :** dr.<sup>a</sup> Josefa Melo  
dr.<sup>a</sup> Alice Manjate  
Sr.<sup>a</sup> Zuhura Chionda

**MAPUTO, Novembro de 2006**



## AGRADECIMENTOS :

- Pretendo com estas páginas, manifestar a minha gratidão a todos os que directa ou indirectamente contribuíram para a realização do presente trabalho, sendo a destacar as personalidades seguintes;
  
- Aos meus Supervisores Prof. Dr.<sup>a</sup> Elena Folgosa e dr. Arlindo Cháuque pela atenção, confiança, apoio incansável demonstrado na transmissão dos seus conhecimentos e elaboração de críticas construtivas durante todo o trabalho, e disponibilidade imediata pela assistência e supervisão do estágio.
  
- Aos meus orientadores dr.<sup>a</sup> Josefa Melo, dr.<sup>a</sup> Alice Manjate e Sr.<sup>a</sup> Zuhura Chionda pelas orientações, sinceridade, frontalidade, coragem e pelo fornecimento de artigos científicos, a partir dos quais foi possível traçar a metodologia para realização do presente trabalho incluindo a correcção do texto.
  
- À todos os docentes do Departamento de Ciências, pela paciência, dedicação, preocupação, confiança e responsabilidade que demonstraram ao longo do curso na transmissão dos conhecimentos.
  
- Aos meus colegas, Ângelo, Leonel, José Carlos, Rosário, Nédio, Jerónimo, Semana, Amide, Heitor, Inácio e os demais que sempre estiveram ao meu lado na carteira desde o semestre básico até o último semestre.
  
- Aos meus amigos, Justino, Namadjamura, Weah, Modja, Tonecas, Valoi, Retxua, Venerando, dr Ilídio, Sibanda, Nelson, Mavuto, Capitão, Ivandra, Zuro, Pondo e Plate, pela confiança, entusiasmo e contribuições especiais ao longo de toda a carreira estudantil.

- Aos técnicos e serventes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, em particular os funcionários do sector de Imunodiagnóstico pela ajuda e ensinamentos transmitidos na aprendizagem das técnicas Laboratoriais.
- Aos meus tios , Romão, Marta, Filipe, Massungue, Rofina, Idalina, Assa e Dina, pelo carinho, força e apoio constante que demonstraram ao longo deste Curso.
- Ao meu saudoso avô João de Deus Mambunda, pelo ensinamento e coragem, que transmitiu nos primeiros anos da minha existência.
- Aos meus primos, madrinha e afilhados.
- À minha namorada Salma, pela insistência e incentivo que soube transmitir para finalização do relatório.
- Aos meus irmãos, Tafadzwa, Luísa, Otília, Kevin e Sérgio pelo entusiasmo ao longo de toda a carreira estudantil e durante a realização do trabalho.
- Aos meus Pais Albano João de Deus e Florência Harre Macuinja, pelo apoio moral, amor, carinho, paciência, confiança, sinceridade e incentivo nos estudos.
- À Deus todo poderoso pela vida e oportunidade que me deu de poder desfrutar as maravilhas por debaixo do sol.
- Finalmente a todos que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho, o meu muito obrigado.

## DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, **João Albano Mabunda**, declaro por minha honra, que este trabalho foi elaborado por mim, fruto do meu esforço e dedicação, da minha inteira responsabilidade, e que a informação aqui contida reflecte a verdade.

*João Albano Mabunda*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalhos aos:

Meus irmãos, Tafadzwa, Luísa, Otília, Kevin e Sérgio que este trabalho lhes sirva de inspiração e em especial ao meu amado pai Albano João de Deus e a minha adorada mãe Florência Harre Macuinja pelo sustento por eles prestado desde a minha infância até ao nível superior que culminou com a realização do presente trabalho.

## LISTAS DE ABREVIATURAS

Ac- Anticorpo

Ag- Antígeno

CDC- Centro de controle e prevenção de doenças

CP- Caixa postal

DNA- Ácido desoxiribonucleico

FTA- ABS- Fluorescent treponemal antibody absorbed test

HCM- Hospital Central de Maputo

HIV- Vírus de imunodeficiência humana

ITS- Infecção de transmissão sexual

LCR- Líquido Cefaloraquidiano

L M- Laboratório de Microbiologia

rpm- Rotações por minuto

RPR- Reagina Plasmática Rápida

SFT- Soro fisiológico tamponado

SIDA- Síndrome de imuno deficiência adquirida

TPHA- Treponema pallidum haemagglutination assay

TPI- Treponema pallidum Immobilization

UEM- Universidade Eduardo Mondlane

l μl- Microlitro

VRDL - Venereal Disease Research Laborator



## Resumo

O Presente relatório de estágio foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, sector de Imunodiagnóstico, em Maputo, e descreve as técnicas de imunodiagnóstico usadas neste laboratório e com grande realce para as técnicas laboratoriais usadas no rastreio de Sífilis. O objectivo deste estágio foi a aquisição de conhecimentos e práticas de técnicas microbiológicas que desempenham um importante papel no diagnóstico e controle das doenças infecciosas.

O estágio teve duração de 7 ( sete) meses e compreendeu as seguintes fases:

**Primeira fase:** foi a adaptação técnica ao laboratório. Que decorreu no período compreendido entre Março à Maio de 2006,

**Segunda Fase:** Colheita, Análise, registo, processamento das amostras e interpretação dos resultados, nos meses de Julho à Outubro do corrente ano.

Durante o período em questão realizou-se actividades tais como: Controlo de Qualidade, participação nas aulas práticas da Disciplinas de Microbiologia Médica e no estudo de *Tinea capitis* nas crianças da Aldeia SOS no bairro de Hulene na Cidade de Maputo.

É importante ter em mente que, o conhecimento do mundo microbiológico está desenvolvendo constantemente, daí a motivação do estágio, com vista a consolidação de conhecimentos teóricos ou práticos sobre processos microbiológicos envolvidos no imunodiagnóstico, bem como aprender e obter conhecimentos exequíveis sobre análises microbiológicas que permita a aquisição de habilidades técnicas ou métodos alternativos conciliáveis com processos “ standard” de imunodiagnóstico.

Durante o estágio o sector de Imunodiagnóstico processou 412 amostras de sangue para o rastreio de Sífilis, das quais 150 eram das enfermarias e 262 eram das consultas normais de Dermatologia do Hospital Central de Maputo.

Com o advento do HIV/SIDA Há uma grande necessidade de fazer o rastreio da Sífilis visto ser uma ITS que serve de porta de entra ao HIV.

Findo o estágio, concluí-se que o exame imunodiagnóstico, é muito importante para o diagnóstico da maioria das ITS e sobretudo o rastreio de sífilis.

## ÍNDICE

Pag

|   |    |
|---|----|
| 1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO .....              | 1  |
| 1.1 Historial do Laboratório.....                                       | 1  |
| 2. Cronograma do estágio .....  | 4  |
| 3. Objectivos .....   | 5  |
| 3.1 Objectivos Gerais:.....   | 5  |
| 3.1 Específico.....   | 5  |
| 4. Apoio concedido .....  | 6  |
| 5. Material e equipamento.....  | 6  |
| 6. Revisão Bibliográfica.....   | 6  |
| 6.1 Bactérias.....  | 6  |
| 6.2. Classificação .....  | 7  |
| 6.3. Espiroquetas.....  | 7  |
| 6.4 Patogénese e imunidade.....   | 8  |
| 6.5 Sífilis e HIV .....   | 8  |
| 7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SÍFILIS .....                            | 9  |
| 7.1 Colheita de amostra.....  | 9  |
| 7.2.1 Microscopia em fundo escuro.....                                  | 10 |
| 7.2.2 Pesquisa de DNA e teste de infectividade .....                    | 10 |
| 7.3 TÉCNICAS DE IMUNODIAGNÓSTICO.....                                   | 10 |
| 7.3.1 Diagnóstico serológico.....                                       | 11 |
| 7.4 Testes não- treponémicos.....                                       | 12 |
| 7.4.1 Prova do veneraeal Diseases Research Laboratory ( VDRL).....      | 12 |
| 7.4.2 Prova de despiste de VDRL.....                                    | 12 |
| 7.4.4 Prova quantitativa de VDRL.....                                   | 13 |
| 7.4.5 Técnica de reagina plasmática rápida ( RPR).....                  | 13 |
| 7.4.7 Teste qualitativo para o diagnóstico de sífilis por RPR :         | 14 |
| 7.5 Testes treponémicos.....  | 15 |
| 7.5.1 Teste de hemaglutinação de <i>Treponemapallidum</i> ( TPHA) ..... | 15 |
| 7.5.2 Prova de triagem de TPHA .....                                    | 15 |
| 7.5.3 Prova quantitativa do TPHA.....                                   | 16 |
| 7.5.4 Prova do anticorpo fluorescente absorvido ( FTA- ABS) .....       | 17 |
| 7.5.6 Técnica da prova FTA-ABS .....                                    | 18 |
| 7.5.7 Resultados de FTA-ABS.....  | 18 |
| 7.9 Actividades desenvolvidas.....                                      | 19 |
| 7.9.1 Metodologia .....   | 19 |
| 7.9.2 Teste qualitativo de RPR .....                                    | 20 |
| 7.9.3 Técnica de TPHA.....  | 21 |
| 7.9.4 Teste Quantitativo para o diagnóstico de Sífilis por RPR .....    | 22 |
| 8. Resultados/Discussão .....   | 23 |
| 9. Perspectiva Crítica .....  | 24 |
| 10. Conclusão.....  | 25 |
| 11. Recomendações.....  | 26 |
| 12. BIBLIOGRAFIA .....  | 28 |
| ANEXOS .....  | 30 |

## **1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO**

O estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, localizada na avenida Salvador Allende n° 702, CP 257, 2° andar, Maputo.

O Laboratório de Microbiologia está dividido nos seguintes sectores: Micologia, Bacteriologia e Imunodiagnóstico, segundo o organograma representado na fig. 1.

Este laboratório desempenha as seguintes funções:

Docência a estudantes dos cursos de Medicina e Biologia, actualização e capacitação periódica de técnicos de laboratório, participação no programa de controle de qualidade externa com laboratórios de referencia internacional, elaboração de normas de controle de qualidade, prestação de serviços de diagnóstico em apoio aos programas nacionais de controle de endemias e epidemias, participação nos planos de supervisão periódica de laboratórios aos vários níveis de actuação de Saúde em colaboração com o sector de laboratórios do Ministério de Saúde, elaborar e assegurar o funcionamento de um programa de controle de qualidade interna, elaborar listas de equipamento, material e reagentes necessários ao diagnóstico de doenças infecciosas abrangidas pelo sistema nacional de vigilância epidemiológica, prestação de acessória técnica no âmbito do diagnóstico microbiológico, junto da secção de laboratórios do Ministério da Saúde, colaboração em actividades de investigação em apoio aos programas de controlo de epidemias e endemias e desenvolvimento de outras actividades de investigação sob coordenação e orientação dos docentes affectos ao laboratório (LM, 1999).

### **1.1 Historial do Laboratório**

O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina faz parte do Departamento Académico de Microbiologia. O Departamento de Microbiologia tem a seu cargo as disciplinas de Microbiologia Médica e Parasitologia e, no seu plano de desenvolvimento a curto e médio prazo tem previsto o crescimento do Laboratório de Parasitologia para além do de Microbiologia (LM, 1999).

Para além das actividades inerentes ao apoio a docência prática das disciplinas de Microbiologia Médica, o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina,

colabora com as autoridades de Saúde desde a epidemia de cólera na cidade de Maputo em 1980 ( L M, 1999).

O bom relacionamento e o reconhecimento da vocação do laboratório para esta área permitiram, em troca dos bons serviços, contar ao longo destes anos com assistência técnica, dotação de equipamento, material e reagentes ao abrigo de projectos com o Ministério de Saúde ( L M, 1999).

Assim, 1997 é celebrado entre a Direcção de Assistência Médica do Ministério de Saúde e a Direcção da Faculdade de Medicina um acordo de cujo âmbito é reconhecimento do laboratório de Microbiologia do Departamento Académico de Microbiologia da Faculdade de Medicina, como laboratório Nacional de referência para diagnóstico de Doenças infecciosas dentre os programas nacionais de controlo de endemias, formando e capacitando nessa área pessoal clínico e outros técnicos de saúde, de modo a que este possa prestar os serviços que o Departamento de epidemiologia e endemias necessita, para melhor cumprir as suas finalidades ( L M, 1999).

Em Dezembro de 1998, ao fim de longos anos de espera, o pessoal do laboratório de Microbiologia que até ai vinha desenvolvendo todas suas actividades em instalações em péssimo estado de manutenção e sem possibilidades de climatização ( o que dificultava a manutenção de serviços prestados e a previsão de abertura de novas áreas de investigação e extensão), vê finalmente concretizada a mudança para as novas instalações e a melhoria das suas condições de trabalho ( L M, 1999).

Além da docência, e das suas actividades como referência para o diagnóstico de doenças infecciosas de etiologia bacteriana e micológica, o laboratório de Microbiologia tem exercido actividades de investigação e extensão. Estas últimas em colaboração com outros Departamentos clínicos da Faculdade e com repartição de epidemiologia do Ministério de Saúde ( L M, 1999).

Tem colaborado em cursos de actualização sobre cuidados aos doentes HIV-SIDA e em seminários nacionais de capacitação e actualização de técnicos médios no diagnóstico supervisão e gestão de laboratórios ( L M, 1999).

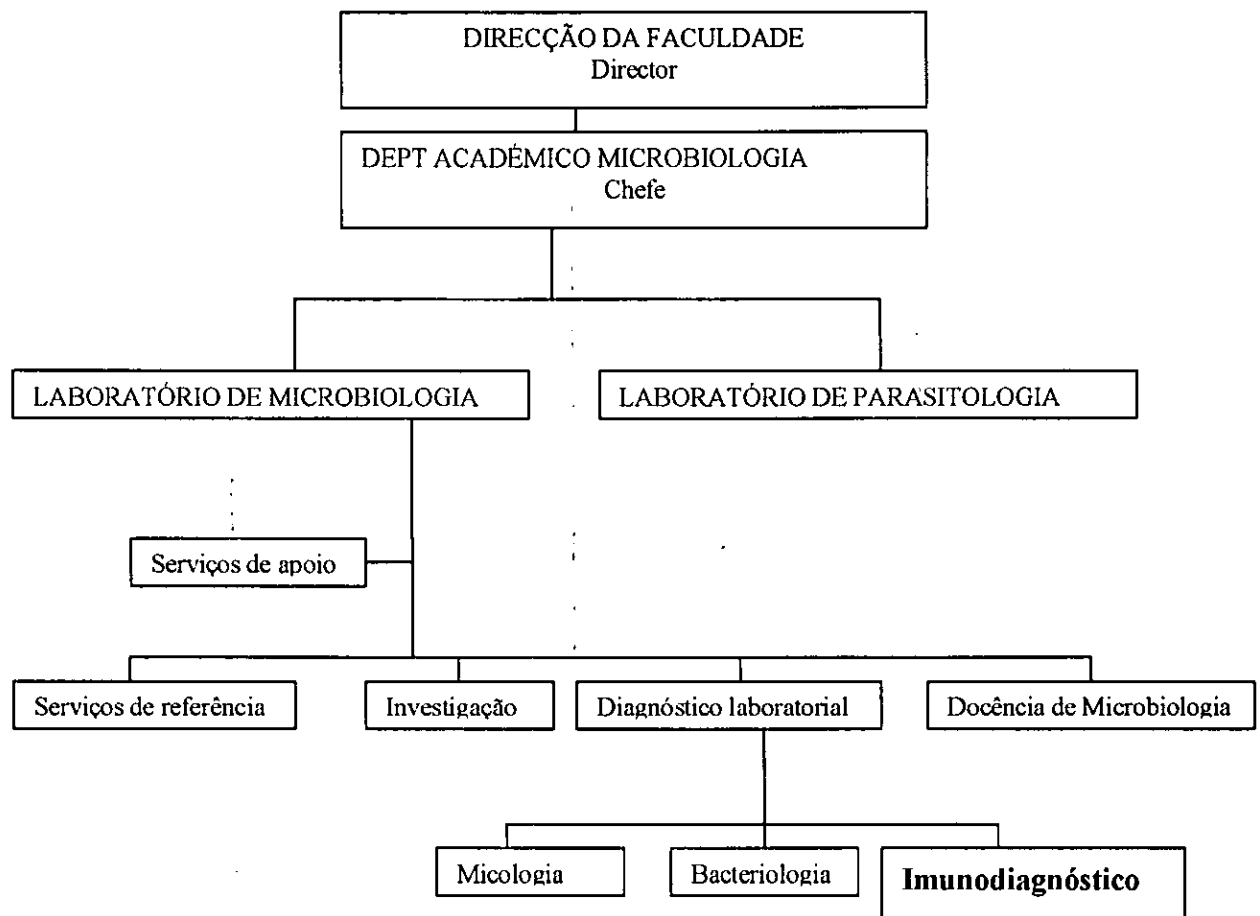


Fig.1 Organigrama do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina- UEM

## 2. Cronograma do estágio

| Fases    | Períodos                            | Actividades   |
|----------|-------------------------------------|---|
| Primeira | Março - Maio de 2006                | Estágio de adaptação técnica no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina e elaboração do Protocolo |
| Segunda  | Julho - Outubro de 2006<br>Novembro | Recolha e processamento de amostras<br><br>Processamento dos dados, elaboração e entrega do relatório final     |

### 3. Objectivos

#### 3.1 Objectivos Gerais:

- Aprofundar e adquirir habilidades técnicas e laboratoriais empregues no Imunodiagnóstico de ITS;
- Conhecer, compreender e saber executar técnicas de RPR e TPHA para o diagnóstico de Sífilis;
- Adquirir a capacidade de compreender e resolver os Problemas;

#### 3.1 Específico

- Ganhar habilidades no processamento de amostras de sangue para o diagnóstico de Sífilis;
- Avaliar a frequência de *Treponema pallidum* em doentes de ambos os sexos que frequentam a consulta de ITS do HCM durante o período do estágio;

O trabalho foi efectuado em fases, de modo a permitir uma recolha e análise exaustiva das informações obtidas, quer na literatura, quer ainda no trabalho de campo.

Nessa perspectiva, com vista a alcançar os objectivos previamente preconizados, afigura-se mais abaixo a tabela que contém as informações segundo as quais o trabalho será faseado e executado;

#### 4. Apoio concedido

Quanto aos apoios concedidos há que referenciar a pronta disponibilidade da equipa do laboratório sempre que precisamos, a assistência técnica científica e a oportunidade que tivemos de estagiar e poder conciliar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo da formação.

#### 5. Material e equipamento

- Veja o anexo

#### 6. Revisão Bibliográfica

##### 6.1 Bactérias

As bactérias são relativamente simples na sua estrutura. São organismos **procariontes**, isto é, microrganismos unicelulares simples, desprovidos de membrana nuclear, mitocôndrias, corpúsculos de Golgi e retículo endoplasmático e se reproduzem por fissão binária. O corpo humano é habitado por milhares de diferentes espécies bacterianas - algumas vivendo transitoriamente, outras em uma relação de um parasitismo permanente, da mesma maneira, o meio ambiente que nos envolve, incluindo o ar que respiramos, a água que bebemos e o alimento que comemos, é habitado por bactérias, muitas das quais são relativamente avirulentas, enquanto outras são capazes de produzir doenças potencialmente fatais ( Murray *et al.* , 2004).

As bactérias incluídas na família *Treponemataceae* são de entre todas as espiroquetas, aquelas que apresentam dimensões mais reduzidas. Esta família possui duas espécies estritamente patogénicas para o homem, designadas por *Treponema pallidum* e *Treponema carateum*, por sua vez, a espécie *Treponema pallidum* inclui três subespécies referenciadas como: *T. pallidum* subsp. *pallidum*, agente da **sífilis**, *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*, agente da **framboésia**, e a subespécie *endemicum* ou *Treponema pallidum* subs *endemicum*, responsável pela **sífilis endémica ou bejel**, uma doença não venérea. Outros *treponemas*, considerados comensais da cavidade oral, podem ser



inofensivos, como o *T. macrodentium*, que pode ser isolado da saliva e da placa dentária, ou outros que, em certas situações, podem causar no Homem infecções orais, como periodontite (Burton e Engelkirk., 1996; Balows *et al.*, 1991).

O *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* é, como já referido, o agente causal da sífilis, foi associado à esta doença em 1905, por Fritz Schaudinn e Erich Hoffmann, doença crónica de transmissão venérea com múltiplas apresentações clínicas que ainda hoje é responsável por elevada morbidade e alguma mortalidade, em muitos países do mundo ( Ferreira *et al.*, 2000; Anthony, 1999; Youmans *et al.*, 1983; Robbins e Cotran., 2005).

## 6.2. Classificação

Embora a parede celular das bactérias seja complexa, existem apenas duas formas básicas: uma parede celular Gram positiva, com uma espessa camada de peptidoglicano , e uma parede celular Gram- negativa, com uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa. O tamanho ( 1 a 2 µm ou mais ), apresentando diferentes formas, esférica ( coco), bastonete (bacilo), vírgula ( vibrião) e espiralada ou helicoidal como são os casos dos géneros, *Borrelia*, *Leptospira* e *Treponema* ( onde se encontra a especie *T. Pallidum*, causadora da Sífilis ) , que também pertencem a um grupo chamado espiroquetas (Wilson, *et al.*, 1979; Amabis e Martho., 2002).

## 6.3. Espiroquetas

Espiroquetas são bactérias Gram – negativas na forma de um saca rolhas com flagelos periplásmicos axiais enrolados em torno de um protoplasma helicoidal, que podem possuir um comprimento variável, podendo situar-se entre 5 e 250 µm, distinguindo-se de outras bactérias pela sua singular estrutura celular, e pelo modo como se movem (Ferreira *et al.*, 2000; Robbins e Cotran., 2005).

#### 6.4 Patogénese e imunidade

A incapacidade do *T. pallidum* de crescer em altas concentrações *in vitro* limitou a detecção de factores de virulência específicos nesse microrganismo vários produtos génicos foram associados especificamente a estirpes virulentas, embora o papel da patogenia ainda permaneça desconhecida. As proteínas da membrana externa estão associadas a aderência à superfície das células do hospedeiro, enquanto as espiroquetas virulentas produzem hialuronidase, que pode facilitar a infiltração perivascular e fibronectina que as protege contra a fagocitose. A destruição e as lesões teciduais observadas na sífilis representam primariamente uma consequência da resposta imunológica do paciente à infecção. Consideram-se no quadro da infecção natural da sífilis, três fases evolutivas: a primeira designada por sífilis primária que é caracterizada por uma ou mais lesões cutâneas no local de penetração das espiroquetas; segue-se a ela, mais ou menos rapidamente, um segundo período, designado por sífilis secundária, aparecem sinais clínicos da doença disseminadas, com lesões cutâneas proeminentes dispersas em todas as superfícies do corpo, vindo depois uma terceira fase terciária ou tardia, na qual quase todos os tecidos podem ser afectados sendo as lesões resultantes irreversíveis ( Ferreira *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004; Burton e Engelkirk., 1996; Volk *et al.*, 1991 ).

#### 6.5 Sífilis e HIV

A importância de que hoje se reveste a infecção pelo *T. pallidum*, no contexto da pandemia de SIDA que desde o início da década de 80 vem-se espalhando por todo o mundo é, neste momento, um dado científico praticamente aceite por todos. Tem sido registado, em vários países do Mundo, com resultados estatisticamente significativos, que grupos de indivíduos de comportamentos sexuais de risco, e sofrendo de úlceras genitais, têm maior possibilidade de se infectarem com vírus da imunodeficiência humana ( HIV) do que indivíduos que não apresentem essas lesões. Sendo a sífilis uma das infecções de transmissão sexual que, num determinado período da sua evolução, produzem lesões erosivas da mucosa genital, as úlceras presentes e a fragilidade da mucosa genital inflamada, tornam o indivíduo mais vulnerável à entrada de vários agentes patogénicos, incluindo os vírus ( Ferreira *et al.*, 2000).

## 7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SÍFILIS

O diagnóstico laboratorial dos microrganismos pode ter objectivos diferentes: orientação terapêutica perante uma situação de doença, estudos epidemiológicos sobre a distribuição de estirpes dum agente numa população ou investigação sobre a biologia e patogenia. O diagnóstico laboratorial, em microbiologia, permite a caracterização dos microrganismos implicados de modo directo ou indirecto na etiologia das doenças infecciosas. As técnicas utilizadas na caracterização microbiológica são muito variadas e dependem essencialmente do síndrome clínico que queremos esclarecer, das hipóteses de diagnóstico que se colocam e da fase evolutiva da doença (Ferreira *et al.*, 2000).

### 7.1 Colheita de amostra

O produto biológico deve ser colhido do local que, no momento evolutivo da infecção, oferece a maior possibilidade de se isolar e caracterizar o agente causal. Sempre que o quadro clínico aponta para o envolvimento de um determinado órgão ou sistema, é dele que devem ser colhidos os produtos. Na ausência de sintomatologia indicadora de uma localização particular é aconselhável que se façam várias colheitas de sangue para análise microbiológica. O local preferencial para a colheita pode variar no decurso da doença e depende do ciclo biológico do agente infeccioso no hospedeiro (Ferreira *e tal.*, 1998).

Para o diagnóstico da sífilis, é possível fazer-se com base em duas colheitas: sangue ou líquido cefaloraquidiano (Frejaville e Kamoun., 1989).

O diagnóstico laboratorial das *treponemas* não segue o perfil clássico utilizado para a maioria das infecções bacterianas, dado que, nem o *T. pallidum*, nem as outras espécies de *Treponema*, crescem *in vitro*, por isso baseia-se na pesquisa do agente nas lesões mucocutâneas e na serologia, por microscopia de fundo escuro por epifluorescência e pela detecção de anticorpos séricos antitreponema (Burton e Engelkirk., 1996).

## 7.2 Exame directo

A partir de lesões mucosas ou cutâneas, o diagnóstico da sífilis primária, secundária ou congénita pode ser feito por visualização de espiroquetas ( Ferreira *et al.*, 2000).

### 7.2.1 Microscopia em fundo escuro

A forma mais rápida e eficaz de diagnóstico das fases infecciosas da sífilis consiste na detecção dos *Treponemas* móveis, nas preparações a fresco do exsudado raspado das lesões cutâneas ou mucosa, ou no aspirado de punção de nódulo linfático satélite à lesão primária é possível observar em microscópio de fundo escuro a morfologia típica de *T. pallidum* uma vez que as alterações serológicas diagnosticadas, geralmente não têm início até 14 a 21 dias após o contacto. Um método de diagnóstico mais conveniente é o da imunofluorescência. Prepara-se o esfregaço do material suspeito sobre uma lâmina de vidro e fixa-se, sobre o esfregaço deita-se anticorpo específico contra *T. Pallidum* marcado com fluoresceína, e examina-se ao microscópio de fluorescência, mais recentemente, tem se usado anticorpos monoclonais específicos, também marcados pela com isocianato de fluoresceína, para identificação de *T. pallidum*, nas lesões ( Duguid *et al.*, 1993; Ferreira e Ávila, 2001; Ferreira *et al.*, 2000; Youmans *et al.*, 1983 ).

### 7.2.2 Pesquisa de DNA e teste de infectividade

De soro ou LCR, o *T. pallidum* pode ser isolado por inoculação em testículos de coelho. O *Treponema* pode ser evidenciado, também, por meio da identificação de segmento específico de DNA extraído de tecidos, inclusive fixados e incluídos em parafina, assim como de soro ou líquidos orgânicos como cefaloraquidiano, e em seguida amplificado pela técnica de reacção em cadeia da polimerase ( Ferreira e Ávila, 2001).

## 7.3 TÉCNICAS DE IMUNODIAGNÓSTICO

O exame imunodiagnóstico ou sorodiagnóstico estuda reacções antígeno - anticorpo para diagnóstico de doenças infecciosas, distúrbios auto imunes, alergias imunes e doença neoplásica. No soro sanguíneo é realizado o teste de titulação de anticorpos contra antígenos específicos; daí o termo sorologia do sangue ( Fischbach e Dunning III., 2005).

### 7.3.1 Diagnóstico serológico

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), para colheita de soro para testes imunológicos é necessário:

1. *Obtenção de amostras.* Para o diagnóstico de doença infecciosa, deve ser colhida no início da doença ( fase aguda ) uma amostra de sangue ( de preferência o soro) para um tubo de ensaio seco ou para um tubo vácuo e outra amostra deve ser colhida 3 a 4 semanas depois ( fase convalescente). Em geral, a utilidade do teste serológico depende de um aumento do título no intervalo das fases aguda e convalescente. No caso de alguns testes serológicos, uma amostra de soro pode ser adequada se a presença de anticorpos for muito alto.
2. *Realiza-se*
3. *o teste serológico antes do teste cutâneo.* O teste cutâneo frequentemente induz à produção de anticorpos e poderia interferir nos resultados de teste serológico.
4. Identifica-se a amostra apropriadamente e enviar as informações solicitadas. Colocar a amostra em embalagem de risco biológico. Amostras hemolizadas não fornecem resultados precisos, visto que a hemoglobina na amostra de soro pode interferir nos níveis de anticorpos fixadores do complemento.

A resposta imunológica humoral fornece uma história das infecções de um paciente. A serologia pode ser utilizada para identificar o agente infeccioso, avaliar o curso da infecção ou determinar a sua natureza se é aguda ou crónica. Os dados serológicos sobre uma infecção são fornecidos pelo tipo e título do anticorpo e identidade dos alvos antigénicos. O teste serológico é utilizado para identificar vírus e outros agentes que são difíceis de serem isolados em laboratório, ou que produzem doenças com evolução lenta como é o caso da sífilis (Murray *et al.* , 2004).

O diagnóstico da sífilis é feito maioritariamente por reacções serológicas, detectando-se no soro do paciente anticorpos Ig G e Ig M ( reaginas) que reagem in vitro com uma suspensão coloidal de lípidos ( métodos não-treponémicos) ou antígenos de *T. pallidum* (métodos treponémico) ( Ferreira *e tal.*, 2000 ).

Segundo a World Health Organization ( 2003 ); Fischbach e Dunning III (2005); Murray *et al* ( 2004), os testes recomendados pelo Centro de controle e prevenção de doenças de Atlanta, EUA ( CDC-Atlanta ) são :

**Métodos não-treponémicos**, estes métodos são inespecíficos e medem anticorpos da classe IgG e IgM contra lípidos da superfície celular de *T. Pallidum* que também podem ser encontrados nas células infectadas do hospedeiro. O antígeno usado é constituído por cardiolipina ( extraída de tecido animal), lecitina e colesterol estes são os casos de **VDRL** ( Veneral Disease Research Laboratory) e o **RPR** ( Rapid Plasm Reagin).

**Métodos treponémicos**, que utilizam como antígeno *T. pallidum* sendo por isso mais específicos que os métodos não -treponémicos, incluem, **FTA-ABS** ( Fluorescent Treponemal Antibody Absortion) e o **TPHA** ( Treponema pallidum Hemaglutination Assay ) , como os mais usados e o teste de **Nelson** ou **TPI** ( Treponema Pallidum Imobilization), como testes de referência.

#### **7.4 Testes não- treponémicos**

##### **7.4.1 Prova do veneraeal Diseases Research Laboratory ( VDRL)**

Segundo World Health Organization (2003), esta prova simples, de floculação, altamente sensível, pode ser efectuada em tubo de ensaio, mas está mais generalizada a técnica em microlâmina.

##### **7.4.2 Prova de despiste ( qualitativa) de VDRL**

As provas de triagem de despiste podem efectuar-se em lâminas de vidro, de 5 x 10 cm, sobre cada umas das quais se delimitam, com parafina ou anéis de cerâmica, seis zonas circulares. Não são recomendáveis lâminas com cavidade ou anéis de vidro.

1. Deposita-se 60 µl de soro sobre a lâmina.
2. Junta-se, a este, 20 µl do antígeno.
3. Mistura-se com vareta de madeira e rodar a lâmina durante 4 minutos. Se empregar um agitador mecânico, regulá-lo para cerca de 180 rotações por minuto.
4. Faz-se a leitura e comprovar ao microscópio, com objectiva de 10 e ocular de 10, imediatamente após a rotação.

### 7.4.3 Leitura dos Resultados

Negativo: suspensão antigénica em partículas finas e homogéneas.

Fracamente positivo: pequenos grumos de antígeno, com escassa ou nula clarificação do líquido.

Positivo: grumos volumosos, com nítida perda de turvação do líquido.

Quaisquer amostras que dêem resultado positivo ou fracamente positivo devem ser submetidas à prova quantitativa.

### 7.4.4 Prova quantitativa de VDRL

1. Deposita-se 100 µl de soro fisiológico a 0,9%, em cada um de 5 tubos de (7 x 1cm), por cada soro a ensaiar
2. Junta-se 100 µl do soro ao primeiro tubo, e diluir, sucessivamente ao dobro, de forma a obter as diluições de 1 para 1 para 32.
3. Pratica-se a prova, com o soro puro e suas diluições, como se descreveu acima, no teste de despiste ( qualitativo)

Qualquer soro que dê reacção positiva, na diluição de 1 para 32, deve ser novamente diluído, para encontrar a diluição máxima a que corresponda resultado positivo.

Registam-se os resultados do modo seguinte: positiva a 1:1, se quando se observa reacção fracamente positiva com o soro não diluído e negativa com todas as diluições; soro não diluído positivo, quando há reacção positiva com o soro não diluído e fracamente positiva, ou negativa, com diluições; positivo 1:2, 1:4, 1:8, etc., consoante a diluição mais alta do soro em que se observa reacção positiva.

### 7.4.5 Técnica de reagina plasmática rápida ( RPR)

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), a técnica de RPR consiste em:

### **Preparação do antígeno**

- Agita-se o frasco do Ag para uma boa suspensão. Deve-se evitar agitar fortemente.
- Adapta-se a agulha dosificadora no frasco dispensador e aspira a quantidade necessária de Ag.
- Anota-se o número do lote, a data de expiração e a data em que se coloca o antígeno, cada vez que se encha o frasco dispensador ( facultativo).

### **7.4.6 Controle de qualidade**

- Antes de efectuar uma série de determinações é aconselhável testar o Ag RPR com o controle de positivo incluído no Kit, seguindo os passos descritos para o teste qualitativo.
- O controle positivo do teste deve produzir uma clara aglutinação das micro partículas de carvão.
- Se os resultados esperados não forem obtidos, não utilize o Kit.

### **7.4.7 Teste qualitativo para o diagnóstico de sífilis por RPR :**

1. Deixa-se que os reagentes alcancem a temperatura ambiente ( 23 a 29°C).
2. Com a ajuda de um dosificador, coloca-se uma gota da amostra ( ou gota de controle) sobre um círculo do cartão. Em caso de usar pipeta automática, dosificar 50µl da amostra.
3. Inverte-se o dosificador, com a extremidade plana do mesmo, estende-se a gota sobre toda a superfície do círculo. Descarta-se o dosificador.
4. Agita-se o frasco dispensador de Ag e mantém-se em posição vertical, e deixam-se cair algumas gotas de antígeno dentro da tampa do frasco dispensador para comprovar que a agulha não contém ar e que a gota obtida é adequada. Dosifica-se então, uma gota de Ag sobre cada um dos círculos com soro.
5. Agita-se o cartão durante 8 minutos num agitador rotatório a 100 rpm.



6. Pega-se no cartão, inclinando-o ligeiramente para melhor diferenciar as amostras fracamente reactivas das não-activas, procede-se à leitura sob um foco de luz intensa.
7. Uma vez concluído o teste, lava-se a agulha com água destilada, fecham-se bem os frascos, conservando-os a uma temperatura de 2 a 8°C.

## 7.5 Testes treponémicos

### 7.5.1 Teste de hemaglutinação de *Treponemapallidum* (TPHA)

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), nesta prova, os anticorpos do soro dos doentes sífilicos aglutinam eritrócitos de carneiro revestidos por um extracto de *T. pallidum*. Para eliminar as reacções não específicas, os soros são previamente absorvidos com um diluente especial que contém membranas celulares de eritrócitos de carneiro e boi, extracto testicular de coelho normal, desintegrados pelos ultrasons.

### 7.5.2 Teste treponémico qualitativo TPHA

1. Prepara-se a diluição a 1 para 20 do soro inactivado, num tubo de ensaio, por misturando de 10 µl de soro com 190 µl do diluente de absorção. Conservar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
2. Transfere-se 20 µl do soro diluído para um poço ( 1) da microplaca com 60 µl das células não sensibilizadas. A diluição final do soro é agora 1 por 80.
3. Junta-se 10 µl soro diluído com 60 µl das células sensibilizadas no poço 2 da microplaca. A diluição final do soro é agora de 1 por 80
4. Prepara-se o controlo negativo, tratando como acima um soro não reactivo conhecido.
5. Determina-se o título do soro de controlo reactivo. Para isso depositar 20 µl do diluente em cada um dos poços 1 e 2. Diluir ao dobro, retirando 20 µl do diluente para cada um dos poços 2 a 6 de uma fila da microplaca e juntar 20 µl do soro reactivo de controlo aos poços 1 e 2 da mesma . Diluir ao dobro, retirando 20 µl do poço 2 para a 3, e assim sucessivamente, até ao 6, descartando por fim 20 µl do último. Juntar 60 µl das células de ensaio ( sensibilizadas) a cada um dos poços 1 a 6 ( como o soro positivo tinha sido

6. Pega-se no cartão, inclinando-o ligeiramente para melhor diferenciar as amostras fracamente reactivas das não-activas, procede-se à leitura sob um foco de luz intensa.
7. Uma vez concluído o teste, lava-se a agulha com água destilada, fecham-se bem os frascos, conservando-os a uma temperatura de 2 a 8°C.

## 7.5 Testes treponémicos

### 7.5.1 Teste de hemaglutinação de *Treponemapallidum* (TPHA)

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), nesta prova, os anticorpos do soro dos doentes sífilicos aglutinam eritrócitos de carneiro revestidos por um extracto de *T. pallidum*. Para eliminar as reacções não específicas, os soros são previamente absorvidos com um diluente especial que contém membranas celulares de eritrócitos de carneiro e boi, extracto testicular de coelho normal, desintegrados pelos ultrasons.

### 7.5.2 Teste treponémico qualitativo TPHA

1. Prepara-se a diluição a 1 para 20 do soro inactivado, num tubo de ensaio, por misturando de 10 µl de soro com 190 µl do diluente de absorção. Conservar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
2. Transfere-se 20 µl do soro diluído para um poço ( 1) da microplaca com 60 µl das células não sensibilizadas. A diluição final do soro é agora 1 por 80.
3. Junta-se 10 µl soro diluído com 60 µl das células sensibilizadas no poço 2 da microplaca. A diluição final do soro é agora de 1 por 80
4. Prepara-se o controlo negativo, tratando como acima um soro não reactivo conhecido.
5. Determina-se o título do soro de controlo reactivo. Para isso depositar 20 µl do diluente em cada um dos poços 1 e 2. Diluir ao dobro, retirando 20 µl do diluente para cada um dos poços 2 a 6 de uma fila da microplaca e juntar 20 µl do soro reactivo de controlo aos poços 1 e 2 da mesma . Diluir ao dobro, retirando 20 µl do poço 2 para a 3, e assim sucessivamente, até ao 6, descartando por fim 20 µl do último. Juntar 60 µl das células de ensaio ( sensibilizadas) a cada um dos poços 1 a 6 ( como o soro positivo tinha sido

previamente diluído a 1 por 80, as diluições finais deste serão de 1 para 320 a 1 para 10240).

6. Prepara-se um controlo do reagente deitando, num poço, 20  $\mu$ l de células sensibilizadas e 60  $\mu$ l do diluente.

7. Mistura-se o conteúdo dos poços agitando moderadamente a placa. Pode, também, colocar-se esta última em um agitador tipo Microtiter, por 20 segundos. Deixar as placas em repouso por 4 horas, no mínimo, à temperatura ambiente; por vezes, é vantajosa a incubação da microplaca por uma noite.

Examinar as cavidades individuais e registar o grau de hemaglutinação (se houver), de seguinte forma :

- a) Revestimento liso de células aglutinadas, que cobre aproximadamente todo o fundo da cavidade: +++
- b) Revestimento liso de células aglutinadas, com um estreito círculo vermelho em torno do perímetro de aglutinação: ++
- c) Pequena camada aglutinada, com um círculo mais espesso em torno do perímetro da aglutinação: +
- d) Um anel ligeiramente alargado, de células, rodeado por uma margem rugosa:  $\pm$
- e) Depósito compacto, bem definido de células, no centro da cavidade, com ou sem uma cova muito pequena no centro: - negativo

### 7.5.3 Prova quantitativa do TPHA

- 1) Prepara-se a diluição a 1 para 20, do soro inactivado, misturando 10  $\mu$ l deste último com 190  $\mu$ l do diluente de absorção.
- 2) Deita-se 20  $\mu$ l em cada um dos poços 1 a 8 e no 10 (saltando o 9).
- 3) Transfere-se 20  $\mu$ l do soro diluído a 1 para 20, para cada um dos poços 1, 2 e 10. Faz-se uma série de diluições duplas, desde o poço 2 até ao 8, e rejeitar 20  $\mu$ l da diluição deste último. Deixa-se absorver durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
- 4) Junta-se 60  $\mu$ l das células sensibilizadas em cada um dos poços 1 a 8 e 60  $\mu$ l das células de controlo (não sensibilizadas) no poço 10.
- 5) Prepara-se os controlos das células sensibilizadas, misturando 20  $\mu$ l de diluentes de absorção com 60  $\mu$ l de células.

- 6) Prepara-se um controlo negativo e titula-se o soro positivo, como na prova qualitativa.
- 7) Deixa-se as placas em repouso por 4 horas, no mínimo, à temperatura ambiente, e observa-se a presença de hemaglutinação.

#### **7.5.4 Prova do anticorpo fluorescente absorvido ( FTA- ABS)**

Nesta prova, o soro do doente é absorvido com o líquido sobrenadante, autoclavado, de culturas do *Treponema*, para remover o anticorpo específico do grupo. A fixação, sobre *T. pallidum*, do anticorpo específico de grupo dos treponemas patogénicos é, então, revelada pelo método de imunofluorescência indirecta.

#### **7.5.5 Obtenção das preparações antigénicas**

1. Coloca-se oito lâminas numa tina de coloração e cobrir com álcool absoluto, por 1 hora, para desengordurar; Descartar o álcool e deixar secar as lâminas.
2. Reconstitui-se uma embalagem do antígeno treponémico ( próprio *Treponema pallidum* ) por adição de 1 ml de água destilada estéril. Destruir quaisquer grumos de suspensão antigénica, por repetidas aspirações com seringa e agulha de graduação.
3. Deposita-se em cada lâmina, 10 µl da suspensão antigénica.
4. Deixa-se em repouso durante 5 minutos, à temperatura ambiente, retirar o excesso de líquido das lâminas e deixar secar completamente, durante mais 10 a 15 minutos.
5. Coloca-se as lâminas numa tina de coloração e cobrir com acetona, por 10 minutos, para fixar.
6. Descarta-se a acetona e deixar as lâminas secar ao ar.

Por este processo, devem obter-se esfregaços em lâminas do antígeno com 50 a 100 treponemas por campo microscópico, uniformemente distribuídos, quando observados com ampliação de 400x.

### 7.5.6 Técnica da prova FTA-ABS

1. Calcula-se quantas cavidades com o antígeno serão necessárias para os testes e controlos, e retirar o número apropriado de lâminas.
2. Inactiva-se os soros em tubos de ensaio em banho Maria a 56° C, por 30 minutos.
3. Rotula-se cada tubo de ensaio com soro a testar, dispor a série de tubos num suporte, diluir a 1 por 5, com absorvente, os soros a testar e os de controlo que dêem reacções respectivamente forte, fraca e negativa ( 10 µl de soro + 40 µl de absorvente).
4. Transfere-se 10 µl de cada soro para uma das lâminas com antígeno. Identificam-se as amostras, na lâmina, escrevendo na parte posterior negra, desta, com lápis de grafite.
5. Incuba-se a 37°C, durante 30 minutos, em atmosfera húmida.
6. Coloca-se as lâminas no suporte apropriado e retirar o excesso de soro, com soro fisiológico tamponado, escoar e deixar secar ao ar.
7. Retirara-se do congelador uma embalagem do conjugado globulina anti-humana marcada com fluoresceína, deixar fundir e diluir com soro fisiológico tamponado, de modo a obter a diluição de trabalho previamente determinada (veja abaixo), juntar 10 µl desta diluição a cada lâmina com antígeno.
8. Repete-se as etapas 5 e 6.
9. Junta-se uma pequena gota do líquido de montagem, a cada lâmina, colocar sobre ela uma lamela.

### 7.5.7 Resultados de FTA-ABS

Observar ao microscópio de fluorescência as lâminas o mais rapidamente possível ( se for inevitável alguma demora, colocar as lâminas numa sala escurecida e fazer leitura dentro de 4 horas).

Localizar os treponemas com uma objectiva a seco, de grande ampliação e microscópio de fundo escuro, antes de verificar o grau de fluorescência, com um sistema óptico apropriado, ou seja, o microscópio munido de uma lâmpada HBO de 200W, filtro primário BG12 e filtros secundários.

Nas reacções positivas, observam-se treponemas fluorescentes enquanto que nas reacções negativas tal não acontece. Apreciam-se os resultados como mostra a tabela 1 ( veja anexo).

Deverão efectuar-se os seguintes controlos adicionais, quando se ensaiam novos lotes dos reagentes ( que devem ser controlados em paralelo com os anteriormente existentes):

- a) Soro fracamente positivo, diluído a 1 por 5, com o absorvente e também, a 1 por 5, com soro fisiológico tamponado ( SFT ). Estes ensaios devem mostrar uma fluorescência equivalente demonstrativa de que o absorvente não remove o anticorpo específico, o que daria origem a falsos negativos, com amostras fracamente positivas.
- b) Controlos da coloração não específica, que compreendem ( antígeno + SET + conjugado) e ( antígeno + absorvente + conjugado).

O soro não específico dará uma reacção positiva ( ++), quando diluído com SFT, mas reacção negativa, quando diluído com absorvente, o que demonstra a eficácia deste, na inibição da coloração não específica. Os controlos da coloração não específica serão sempre negativos.

#### **Interpretação dos resultados das provas serológicas**

O conjunto dos resultados obtidos nas provas VDRL, TPHA e FTA-ABS fornece informações valiosas sobre a infecção. É importante, contudo, recordar que tem de se interpretar cada caso individualmente, à luz dos dados clínicos e epidemiológicos disponíveis. Dadas as graves implicações sociais e médicas, o diagnóstico de sífilis nunca deverá basear-se em resultados da análise de uma única amostra de sangue, segundo a tabela 4 do anexo.

#### **Reacções falso- positivas e falso- negativas com teste não-treponémicos**

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), uma reacção positiva não é conclusiva para sífilis. Várias condições produzem resultados falso-positivos biológicos para sífilis. As reacções falso-positivas biológicas não são, de forma alguma, "falsas". Podem revelar a presença de outras doenças graves. Supõe-se que a reagina ( reacção) seja um anticorpo contra lípidos teciduais. Acredita-se que os lípidos sejam libertados do tecido corporal no

curso normal das suas actividade. Esses lípidos libertados podem induzir a formação de anticorpos. Reacções falso positivas biológicas não treponémicas podem ocorrer na presença de abuso de drogas, lúpus eritematoso, mononucleose, malária, lepra, pneumonia viral, imunização recente ou, raramente gravidez ( veja a tabela 3 no anexo). Reacções falso negativas podem ocorrer no início da evolução da doença ou durante estágios inactivos ou avançados ( veja tabela 5 do anexo).

### 7.8 Factores que interferem no diagnóstico laboratorial da sífilis

1. O excesso de lípidos no sangue interfere nos resultados do teste.
2. O álcool diminui a intensidade da reacção em testes que detectam reagina; portanto, deve-se evitar a ingestão de álcool durante no mínimo 24 horas antes da colecta do sangue.

### 7.9 Actividades desenvolvidas

#### 7.9.1 Metodologia

O estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM com base em amostras de Sangue provenientes HCM, colhidas em doentes que frequentam o Departamento de Dermatologia do Hospital supracitado, que apresentavam infecções sugestivas de serem causadas por *Treponema pallidum*

As amostras foram colhidas através de uma punção venosa com uma seringa, colhendo o sangue e depositadas em frascos esteréis que contenham anticoagulante ( EDTA), os frascos devidamente rotulados foram imediatamente enviados para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina ( UEM), onde as amostras foram protocoladas num livro de registo do laboratório.

#### 7.9.2 Teste qualitativo de RPR

No laboratório de Microbiologia, foi feito o processamento das amostras, que se baseou, primeiro emcentrifugar as mesmas em tubos de ensaio durante 5 minutos de modo a separar o soro do plasma. Com o soro realizou-se o teste de RPR seguindo o seguinte procedimento: usando um cartão de papel com com dez ( 10) fossos em forma circular onde cada círculo representa um paciente, em cada fosso coloca-se com ajuda de uma

micropipeta 50 µl do soro do paciente e usando um espalhador espalhou-se o soro sem contudo, sair dos limites de cada círculo. Com um frasco dosificador contendo antígeno RPR que consiste em Cardiolipina 0,003%, lecitina 0,020-0,022%, colesterol 0,09%, EDTA 0,0125 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M, mertiolato sódico 0,1%, cloreto de colina 10% p/v, micropartículas de carvão 0,01 e água destilada ), deitou-se uma gota do antígeno em cada círculo e levou-se para um agitador rotatório durante 8 ( oito) minutos a uma velocidade de 100 rpm. Depois de agitar procedeu-se a leitura sob foco de luz intensa, e os soros positivos, produzirão uma clara aglutinação das micropartículas de carvão, e os negativos mantem-se em homogênea.

Os soros RPR positivos foram submetidos a um teste específico de TPHA para confirmação.

### 7.9.3 Técnica de TPHA

Usou-se uma microplaca de titulação de 96 pocinhos, para cada teste são necessários 4 pocinhos, dos quais 2 são usados para diluição do soro.

1. Distribuiu-se 25µl de diluente no pocinho 1, 100µl no pocinho 2 e 25µl nos pocinhos 3 e 4
2. Acrescentou-se 25µl da amostra no pocinho 1. Misturou-se o conteúdo do pocinho 1 e transferiu-se 25µl para o pocinho 2. Misturou-se e transferiu-se 25µl do pocinho 2 para o pocinho 3. Misturou-se e descartou-se 25µl do pocinho 3. Transferiu-se outros 25µl do pocinho 2 para o pocinho 4, mistura-se e descarta-se 25µl do pocinho 4.
3. Acrescenta-se 75µl do reagente controle ( células não sensibilizadas) no pocinho 3 e 75µl do reagente antígeno ( células sensibilizadas) no pocinho 4.
4. Misturou-se o conteúdo dos pocinhos dando leves golpes nas laterais da microplaca durante um período mínimo de 30 segundos.
5. Cobriu-se a placa e incubou-se durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Evitou-se qualquer movimento da microplaca, mantendo-se a mesma distante de fontes de calor.
6. Leram-se os resultados Segundo o anexo da tabela 1.



Os resultados positivos tanto com o teste RPR como com o específico TPHA foram posteriormente submetidos a um teste quantitativo para determinar o título final de reactividade conforme o seguinte procedimento a tabela 1 do anexo.

#### **7.9.4 Teste Quantitativo para o diagnóstico de Sífilis por RPR**

1. Dosificou-se 50µl de solução salina de reagina em cada um dos fossos 2 a 5 do cartão
2. Com a mesma pipeta automática, depositou-se 50µl da amostra no círculo 1 e 50µl directamente sobre a gota salina no círculo 2
3. Com a mesma pipeta aspirou-se e expulsou-se várias vezes a amostra e a solução salina contidos no círculo 2 até para obter uma boa mistura
4. Retirou-se 50µl da obtida no círculo 2 e transferiu-se para o círculo 3
5. Realizou-se as mesmas operações descritas anteriormente para conseguir a mistura correcta dos reagentes até ao círculo 5 e então descarta-se 50µl deste último.
6. Observou-se cada diluição como está descrito na secção teste qualitativo

E procedeu-se a leitura vendo até qual dos círculos poderíamos verificar a presença de micropartículas de carvão. O círculo com a maior diluição onde ainda se observava aglutinação das partículas de carvão foi registado com o título obtido ( 1:2; 1:4; 1:8, etc ).

#### **7.9.5 Outras actividades desenvolvidas**

- Participação nas aulas práticas da disciplina de Microbiologia Médica aos estudantes da Faculdade de Medicina e Instituto Superior de Ciências de Saúde.
- Controlo de qualidade de qualidade de soros provenientes do CDC de Atlanta no rastreio de sífilis e HIV.
- Participação no estudo de infecções por *Tinea capitis* nas crianças da aldeia SOS do bairro de Hulene em Maputo.

## 8. Resultados/ Discussão

Tabela 1 : Resultados obtidos com as amostras de soro testadas usando inespecifico ( RPR) e especifico ( TPHA).

|           | RPR | TPHA | TOTAL |
|-----------|-----|------|-------|
| Positivos | 70  | 72   | 142   |
| Negativos | 200 | 70   | 270   |
| total     | 270 | 142  | 412   |

Das 412 amostras recebidas no Laboratório para o seu processamento, verificou-se que no total de 270 amostras de soro testados com RPR, 70 foram positivos ( reactivos) e 200 foram negativos ( não reactivos ).

Dos 142 soros testados com TPHA 72 foram positivos e 70 negativos. Pode-se ver claramente que foram efectuados mais RPR em virtude de muitas das requisições de análises, os clínicos solicitarem apenas o testes RPR.

Tabela 2 : Relação TPHA e RPR

|              | RPR |      | TPHA |      | TOTAL |      |
|--------------|-----|------|------|------|-------|------|
|              | Nº  | %    | Nº   | %    | Nº    | %    |
| +            | 70  | 17   | 72   | 17,5 | 142   | 34,5 |
| -            | 200 | 48,5 | 70   | 17   | 270   | 65,5 |
| <b>TOTAL</b> | 270 | 65,5 | 142  | 34,5 | 412   | 100  |

Pela tabela pode-se ver que 17 % RPR positivos 17 % de soros foram também reactivos com TPHA. Isso é evidencia de presença de infecção activa. Dos 65,5 de soros % RPR negativos 17,5 % foram TPHA positivos, o que significa que provavelmente houve contacto anterior com o *T. pallidum* ou que a reagina do RPR não detectou neste grupo anticorpos Anti-treponema por o doente estar numa fase inicial da infecção.

## 9. Perspectiva Crítica

É importante que as amostras estejam em boas condições para que se atinjam resultados correctos e precisos. De notar que a algumas amostras de testes chegaram ao laboratório depois de cerca de 48 horas de colheita e algumas delas hemolizadas.

Segundo Fischbach e Dunning III (2005), as amostras não devem no ser processadas após 48 horas da sua colheita, sob o risco de poder-se identificar alguns falsos positivos, na medida em que podem produzir-se alguns artefactos que eventualmente serão incorrectamente reconhecidos como reaginas induzindo ao Médico a um falso diagnóstico.

No que concerne ao teste de rastreio de sífilis é necessário que se efectue os testes de RPR e TPHA para todos os soros na medida em que, Segundo a Organização Mundial de Saúde ( 2003 ), nos primeiros estágios da sífilis é possível que o RPR seja negativa porque as reaginas ainda não estão em título suficiente capaz de ser detectados pela suspensão cardiolipinica, enquanto com o teste de confirmação TPHA é possível confirmar que o individuo já esteve exposto ou está nos estágios iniciais da doença.

## 10. Conclusão

- É importante ter em mente que, o Laboratório de microbiologia desempenha um papel preponderante no diagnóstico e controle das doenças infecciosas.
- Durante o estágio fui capaz de aprender e executar técnicas de despiste de sífilis em uso no laboratório para análises microbiológicas de amostras, como são os casos de RPR e TPHA.
- Adquirir habilidades técnicas graças à rotina semanal dos serviços, o rigor de análises padronizadas e análise dos dados com o acompanhamento dos técnicos, principalmente no masuseamento de amostras serológicas
- Neste trabalho não houve relação entre sífilis/sexo e sífilis/idade, na medida em que trabalhei com amostras de soros provenientes de indivíduos de quase todas idades e sexos, e não foi possível identificar o sexo mais frequente, embora houvesse o predomínio na idade sexualmente activa.
- É importante que se faça o despiste de sífilis na medida em que os processos de transmissão são diversos e as suas manifestações não muito típicas podendo se encontrar numa fase latente por um período de tempo.

## 11. Recomendações

No que se refere ao estágio efectuado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, importa ressaltar algumas situações enfrentadas pelo estagiário, o que de certa forma dificultaram a sua rápida inserção nos trabalhos sistemáticos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia na Secção de imunodiagnóstico. Aqui faz-se menção especificamente à indisponibilidade de um plano de actividades para os técnicos que lidam directamente com os estagiário, o que seria fundamental para o seu desempenho eficiente. Ora, para a solução deste problema, recomenda-se:

- A disponibilização, com antecedência, de um plano de trabalho com objectivos clarificados, à equipa técnica que acompanha o estagiário, para uma melhor orientação nos serviços de Laboratório de Microbiologia. Essa recomendação é extensiva a todos os departamentos ou secções.

No que concerne a certos materiais, por exemplo, frascos com meios de cultura, tubos de ensaio, restos de lixo laboratorial, papel de cartolina, que são utilizados para a realização dos trabalhos práticos, e depois descartados recomenda-se:

- Uma boa coordenação dos serventes envolvidos no processo de limpeza e descarte do material utilizado, visando à assepsia da secção de imunodiagnóstico.

A respeito dos prazos que se encontram geralmente nos rótulos das embalagens é necessário verificar muito bem para evitar trabalhar com material fora do prazo, sendo assim recomenda-se:

- Que se verifique muito bem os kits, para se saber se estão ou não fora ou dentro do prazo para evitar a obtenção de resultados não expressivos e com algumas dificuldades de leitura.
- A solicitação e substituição imediata dos kits fora do prazo por quem de direito.

No que respeita a conservação e transporte dos sangues é necessário que se efectue em tubos de ensaio com máxima de segurança possível para isso recomenda-se:

O uso de tubos de ensaio que contenham uma tampa para isolar e não permitir a contaminação.

No concernente ao manuseamento do sangue dentro do sector é necessário que se faça sempre de luvas visto que a maior parte das amostras provém de indivíduos sugestivos de possuir uma ITS que pode ser uma porta de entrada do HIV.

Em relação ao pessoal afecto ao sector é necessário a capacitação institucional de modo a adequarem as suas capacidades as técnicas de momento e não só mas também é importante a mobilização de pessoal capacitado e com qualificações apropriadas para dirigir e coordenar algumas actividades de investigação neste sector.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Amabis, J.M e Martho, G. R ( 2002). Biologia dos Organismos, Volume II, editora moderna Ltda, São paulo- brasil, 698pp.
2. Burton, G. R. W., (1996) Microbiologia para Ciências de Saúde, 5ª Edição, pp( 260-268), Editora Guanabara Koogan, SA Rio de Janeiro.
3. Duguid, J.P., Cruickshank, R., Marmion, B.P e Swain, C.H.A (1993). Microbiologia Médica, Volume II, 6ª Edição. pp ( 966-967), Lisboa.
4. Ferreira, A W., Àvila, S. L. M. (2001) Diagnóstico Laboratorial das Principais doenças infecciosas e auto-imunes, 2ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 433pp.
5. Ferreira, W.F.C. F; Sousa, J. C. F; Rui, A; Azinheira, M. P e Miguel, F. A. F. C. (1998). Microbiologia, Volume I, editora Lidel-edições Técnicas, Lisboa, 384pp.
6. Ferreira, W.F.C. F; Sousa, J. C. F; Lopes- Abreu, J. A. C; Bacellar, F. C e Calado, E ( 2000). Microbiologia, Volume II, editora Lidel-edições Técnicas, Lisboa, 370pp.
7. Fischbach, F.T e Dunning III, M. B ( 2005). Manual de enfermagem, Exames Laboratoriais e diagnóstico, 7ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 738pp.
8. Fréjaville, J. P., Kamoun, P., ( 1989) Manual de exames de Laboratório, Editora Atheneu, São Paulo, 701pp.
9. Guião de Microbiologia ( 1999).

10. Laboratório de Microbiologia ( 1999).
11. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S; Kobayashi, G.S e Pfaller, M.A. (2004) Microbiologia Médica, 4ª Edição, Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil, 762pp.
12. Wilson, M. E; Mizer, H.E e Morello ( 1979). Microbiology In Patient Care, 3<sup>rd</sup> edition, 669pp, Geneva
13. World Health Organization (2003). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2<sup>nd</sup> edition, 167pp. Geneva.
14. Youmans, G. P; Paterson, P. Y e Sommers, H. M ( 1989). Bases Biológicas e Clínicas das doenças infecciosas, editora artes Médicas Ltda, 880pp, Brasil.
15. Volk, W. A; Benjamin, D. C; Kadner, R. J e Parsons, J. T ( 1991). Essentials of Medical Microbiology, 4<sup>th</sup> edition, 803pp, London.



# ANEXOS

**Tabela 1. Teste Qualitativo, Segundo o guião do Laboratório de Microbiologia 1999.**

| Pocinho nº   | 1   | 2    | 3<br>Controlé | 4<br>Teste |
|--|-----|------|---------------|------------|
| Solução diluente µl                                  | 25  | 100  | 25            | 25         |
| Amostra µl   | 25  |      |               |            |
| Misturar e transferir µl                             |     |      |               |            |
| Diluição   | 1:2 | 1:10 | 1:20          | 1:20       |
| Reativo controle µl                                  | -   | -    | 75            | -          |
| Reativo antígeno µl                                  | -   | -    | -             | 75         |
| Diluição final                                       |     |      | 1:80          | 1:80       |
| INCUBAR DURANTE 45-60 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE |     |      |               |            |

### Leitura dos resultados

- 4+ : Manto homogêneo de células que cobre o fundo do pocinho, as vezes com margens irregulares.
  - 3+ : Manto homogêneo de células que cobre parcialmente o fundo do pocinho.
  - 2+ : Manto homogêneo de células rodeado por um anel de hemácias.
  - 1+ : Manto homogêneo de células rodeado por um evidente anel de hemácias.
  - ± : Botão de hemácias com uma pequena abertura central.
  - : Botão de hemácias com uma abertura central muito pequena ou botão totalmente compacto.
- Positivo : de 4+ a 1+  
 Duvidoso : ±  
 Negativo : -

**Tabela 2. Diluições do teste Quantitativo RPR Segundo o guião do Laboratório de Microbiologia 1999**

|                               |     |        |        |        |          |
|-------------------------------|-----|--------|--------|--------|----------|
| Círculo                       | 1   | 2      | 3      | 4      | 5        |
| Salina $\mu$ l                | -   | 50     | 50     | 50     | 50       |
| Amostra $\mu$ l               | 50  | 50     | -      | -      | -        |
| Misturar e transferir $\mu$ l |     | L 50 J | L 50 J | L 50 J | L 50 J → |
| Diluição                      | 1:1 | 1:2    | 1:4    | 1:8    | 1:16     |

## 5. MATERIAL E EQUIPAMENTO

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Equipamento

- Agitador eléctrico;
- Geleira (10<sup>0</sup>C); Centrífuga;
- Um cronómetro;

#### 5.1.2 Material acessório

- Frasco dispensador
- Cartão de RPR
- Frascos
- Placas de microtitulação ( microplacas) com fundo em forma de U ( Redondo)
- Tubos de ensaio com/sem tampas; Ampolas
- Suporte de tubos de ensaio;
- Pipetas automaticas
- Espátulas; Luvas;
- Agulha dosificadora
- Fita adesiva; Tesoura;
- Cesto de autoclave;

### 5.1.3 Reagentes

- Soro Fisiológico
- Antígenos suspensão de hemácias de frango sensibilizadas
- Controle- suspensão de hemácias de frango de frango não sensibilizados
- Solução diluente tampão fosfato salino
- Controle positivo do soro imune de coelho pré-diluído a 1:20
- Controle negativo- soro não imune de coelho Pré-diluído a 1:20
- Controle positivo- hemácias de frango sensibilizadas com Ag de *T pallidum*
- Controle negativo- hemácias de frango não sensibilizados com Ag de *T pallidum*

### Reagentes

1. Soro fisiológico tamponado, de pH 7,6;
2. Antígeno treponémico ( suspensão liofilizada da estirpe de *T. pallidum*).
3. Soro conhecido fortemente positivo.
4. soro conhecido de reacção minimal
5. soro não específico ( soro não sífilico, que é reactivo quando diluído com soro fisiológico tamponado, mas não reactivo , quando diluído com o absorvente).
6. Absorvente ( produto preparado a partir de culturas de treponemas.
7. Imunoglobulina anti humana fluorescente
8. Acetona
9. Líquido de montagem glicerinado e tamponado

Tabela 03 Registo dos resultados da prova FTA-TBS para detecção dos anticorpos contra *T. pallidum*, segundo Ferreira e Ávila (2001)

| Aspecto dos treponemas  | Grau de fluorescência | Registo             |
|---|-----------------------|---------------------|
| Fluorescência verde, brilhante  | +++                   | Positivo            |
| Fluorescência verde moderada a intensa  | ++                    | Positivo            |
| Fluorescência verde fraca mas nítida, uniforme, equivalente à do controlo positivo, fraco | +                     | Fracamente positivo |
| Fluorescência fraca mas nítida, menos intensa que a do controlo positivo fraco            | ±                     | Reacção limite      |
| Ausência de fluorescência, treponemas vagamente visíveis ou completamente invisíveis      | -                     | Negativo            |

Tabela 04 Modelo de resultado das provas serológicas em diferentes fases da sífilis adquirida, segundo Ferreira e Ávila (2001).

| VDRL | TPHA | FTA-ABS | Interpretação   |
|------|------|---------|---|
| +    | -    | -       | Falsa reacção positiva; repetir o ensaio, para excluir a infecção primária.                       |
| +    | -/+  | +       | Infecção primária; a pesquisa microscópica do treponema será provavelmente, positiva.             |
| +    | +    | +       | Sífilis não tratada (ou recentemente tratada), provavelmente, para além da fase primária.         |
| -    | +    | +       | Sífilis tratada ou parcialmente tratada em qualquer fase; sífilis não tratada, latente ou tardia. |
| -    | +    | -       | História de sífilis tratada   |

Tabela 05 Distúrbios não sífilicos que produzem resultados biológicos falso-positivo( BFP) utilizando VDRL e RPR, Segundo Fischbach e Dunning III (2005)

| <b>Doença</b>                   | <b>Percentagem aproximadamente de BFP</b> |
|---------------------------------|---|
| Malária                         | 100                                       |
| Hanseníase                      | 60  |
| Febre recorrente                | 30  |
| Imunização activa em crianças   | 20  |
| Mononucleose infecciosa         | 20  |
| Lúpus eritematoso               | 20  |
| Linfogranuloma venéreo          | 20  |
| Pneumonia atípica               | 20  |
| Febre por mordedura de rato     | 20  |
| Febre tifóide                   | 20  |
| Vacina                          | 20  |
| Hepatite infecciosa             | 10  |
| Leptospirose ( doença de Weil)  | 10  |
| Periarterite nodosa             | 10  |
| Tripanossomíase                 | 10  |
| Cancróide                       | 5   |
| Varicela                        | 5   |
| Sarampo                         | 5   |
| Artrite reumatóide              | 5-7                                       |
| Escarlatina                     | 5-6                                       |
| Endocardite bacteriana subaguda | 5   |
| Pneumonia pneumocócica          | 5   |
| Tuberculose pulmonar avançada   | 3-5                                       |
| Perda de sangue repetida        | 3-5                                       |
| Resfriado comum                 | ? ( baixa)                                |
| Gravidez                        | ? ( baixa)                                |