

B10-62



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Projecto II

Trabalho de Culminação do Curso
(Relatório de Estágio)

Título: DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS
LABORATORIAIS NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)

Autora: Lúcia Carvalho Uamba Simbine

Maputo, Novembro de 2006



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Projecto II

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



**Título: DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS
LABORATORIAIS NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)**

Supervisor: dr. Emílio Bule

**Co-Supervisores: dr. Cornélio Balane
dr^a Elsa Salvador
dr^a Cynthia Semá**

Autora: Lúcia Carvalho Uamba Simbine

Maputo, Novembro de 2006



AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me guiado e conduzido, concedendo-me coragem, força e fé em todos os momentos de minha vida, especialmente naqueles em que achei que não iria conseguir.

Ao meu Supervisor dr. Emílio Bule, pela estimável ajuda na execução deste trabalho, acreditando na minha vontade, capacidade e em minha força, principalmente nos momentos em que mais precisei, pelas boas orientações e amizade.

Aos meus co-supervisores dr. Cornélio Balane, dr^a Cynthia Semá e a dr^a Elsa Salvador, pelas preciosas orientações, pela amizade e toda ajuda prestada para a realização e culminação deste trabalho.

Ao Dr. Ilesh Jani, por ter concedido o estágio no Departamento de Imunologia, pela disponibilidade do laboratório, material utilizado durante o estágio, pelas sábias palavras e pelos princípios que me transmitiu ao longo destes meses.

Ao INS, em especial aos investigadores e técnicos do Departamento de Imunologia, pelos ensinamentos, paciência, amizade e orientação oferecida para a realização do presente trabalho.

Aos meus pais, por serem pessoas fundamentais na minha existência, por me terem apoiado, incentivado, e me terem dado um dom verdadeiro, o conhecimento.

Aos meus irmãos, cunhado, sobrinhos, tios, primos, padrinhos e afilhados pelo apoio moral, encorajamento e acompanhamento ao longo do curso.

À ti Adélia pelo enorme carinho e amizade, que me dedicaste ao longo destes anos de faculdade.

Aos adoráveis colegas de Faculdade, docentes e amigos, pelo acompanhamento ao longo do curso e toda ajuda prestada. E a todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização e culminação deste trabalho.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra, que este trabalho é fruto do meu esforço e dedicação, e que com base em dados verdadeiros e colhidos por mim durante o estágio, a informação aqui contida, reflecte só, e nada mais do que a realidade.

Maputo, Novembro de 2006.

Lúcia Carvalho Uamba Simbine
(Lúcia Carvalho Uamba Simbine)

DEDICATÓRIA:

Á minha mãe Cecília Paulo Pandja e ao meu pai Carvalho Chavine Uamba, porque graças a eles nasci e sou o que sou hoje.

Aos meus irmãos: David, Joaquina, Joaquim, Ilda, Uraca, Lourenço, Jorge, Rosa e Gabriel que já não se encontra entre nós.

A mim mesma.

A todos que contribuíram directa ou indirectamente para a elaboração e culminação deste trabalho

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN— Ácido desoxirribonucleico
 ARN— Ácido ribonucleico
 ATL— Leucemia das células T do adulto
 CDC —Centers for Disease Control and Prevention
 ELISA— “Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay”
 EDTA— Etthylene-Diamine-tetracetic-Acido
 HCV— Vírus de Hepatite C
 HIV— Vírus de Imunodeficiência Humano
 HTLV— Vírus linfotrópico de células T humanas
 INS—Instituto Nacional de Saúde
 MISAU— Ministério da Saúde
 NID— Número de identificação do doente
 SDS-PAGE— Electroforese em gel Poliacrilamida em Duodecil Sulfato de Sódio
 SIDA— Síndrome de imunodeficiência adquirida
 T CD4+— Linfócitos T que expressam a molécula CD4 em sua superfície
 WB — Western Blot

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Resultado Serológico para o HTLV-I/II nos testes ELISA e W.B.....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Algoritmo Serológico de Testagem Para HTLV.....	6
Figura 2: Ilustração da Centrifugação de Amostras.....	41
Figura 3: Ilustração do Procedimento do Teste ELISA.....	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Norma de Biosegurança

- a) Acesso
- b) Protecção Individual
- c) Áreas de Trabalho do Laboratório
- d) Recipientes de Amostras
- e) Abertura de Embalagens
- f) Uso de Pipetas e Meios de Pipetar
- g) Separação de Soro
- h) Utilização de Centrifugadoras

Anexo 2: Precauções Durante o Processamento dos Testes

- ii) Avisos
- ii) Informações de Saúde e Segurança
- iii) Precauções Analíticas

Anexo 3: Componentes dos kits, Material e Equipamento

a) Descrição dos Componentes do kit para o Teste ELISA, Preparação e Quantidades Fornecidas

b) Descrição dos Componentes do kit para Western Blot, Preparação e Quantidades Fornecidas

- c) Material
- d) Equipamento

Anexo 4. Interpretação dos Resultados do Teste ELISA

Anexo 5. Interpretação dos Resultados do Teste Western Blot

RESUMO

O presente relatório de estágio foi desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde (INS) — Departamento de Imunologia, Laboratório de Serologia em Maputo e teve como objectivo central, descrever as técnicas e procedimentos laboratoriais no diagnóstico serológico do vírus linfotrófico das células T humanas (HTLV). Um vírus que infecta preferencialmente células denominadas linfócitos T, responsáveis pela defesa do organismo.

O estágio teve a duração de 3 (três) meses e consistiu em: Conhecer e aplicar as normas de biosegurança; conhecer e aplicar as normas laboratoriais de recepção, registo e encaminhamento das amostras para as respectivas unidades; processar amostras de plasma para o diagnóstico serológico do HTLV usando as técnicas ELISA e Western Blot, respeitando as seguintes fases:

Primeira fase: Pesquisa bibliográfica, consulta de livros e manuais disponíveis no Departamento de Imunologia e em outras instituições.

Segunda fase: Recepção e registo de amostras, processamento das mesmas usando as técnicas ELISA e Western Blot.

Terceira fase: Interpretação dos resultados obtidos;

Quarta fase: Redacção do relatório final.

Foram usadas 726 amostras de plasma HIV positivas, provenientes de pacientes de alguns Hospitais de Dia do país, para contagem laboratorial de linfócitos TCD4 de rotina como componente do seguimento laboratorial da infecção pelo HIV. Aquelas com contagem elevada de CD4 foram submetidas à pesquisa laboratorial do HTLV usando um teste ELISA comercial ABBOTT-MUREX HTLV-I/II. Posteriormente, todas as amostras com reactividade positiva para HTLV-I/II foram confirmadas por Western Blot.

Do número total de amostras testadas, 91 amostras (12.53%) revelaram uma reactividade ao teste ELISA. As 91 amostras reactivas ao teste ELISA quando retestadas em duplicado com o mesmo teste ELISA e confirmadas com o teste Western Blot, 75 amostras (10.33%) confirmadas foram reactivas. A identificação dos portadores do HTLV-I/II é importante para prevenir a transmissão da infecção, bem como identificar sintomas iniciais de doenças associadas aos vírus, ajudando deste modo a fazer um melhor controlo e tratamento das doenças causadas pelos vírus.

ÍNDICE	Página
Agradecimentos.....	i
Declaração de Honra.....	ii
Dedicatória.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	I
Lista de Anexos.....	II
Resumo.....	III
1. Apresentação e Caracterização da Unidade do Estágio.....	1
2. Programa de Estágio Previamente Determinado.....	3
2.1. Objectivos.....	3
2.1.1. Geral.....	3
2.1.2. Específicos.....	3
2.2. Metodologia.....	4
2.2.1. Normas de Biosegurança.....	4
2.2.2. Amostras.....	4
2.2.3 Recepção e registo das amostras.....	5
2.2.4. Processamento.....	5
2.2.4.1. Separação e Conservação do Plasma.....	5
2.2.4.2. Amostras para Testagem do HTLV.....	5
2.2.4.3. Confirmação das Amostras HTLV Positivas por Western Blot.....	8
3. Apoio Concedido por Parte da Unidade de Estágio.....	11
4. Revisão Bibliográfica.....	12
4.1. Considerações Gerais Sobre o HTLV.....	12
4.1.2. Leucemia/Linfoma de Células T de Adulto (ATL/L).....	15
4.1.3. Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao Vírus HTLV-I.....	16
4.1.4. Diagnóstico Laboratorial do HTLV-I/II.....	16
4.1.4.1. Testes Serológico.....	16

5. Actividades Desenvolvidas na Unidade de Estágio.....	18
5.1. Resultados.....	18
6. Perspectivas Críticas do Estágio no Laboratório.....	19
6.1. Discussão.....	19
7. Conclusões.....	21
8. Recomendações.....	22
9. Referências Bibliográficas.....	24
ANEXOS.....	26

1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA UNIDADE DO ESTÁGIO

O estágio foi realizado no Instituto Nacional de Saúde (INS) — Departamento de Imunologia, Laboratório de Serologia, em funcionamento no Hospital Central de Maputo, sita no bairro central, Av. Agostinho Neto, telefone nº-21309317. A Estagiária inteirou-se sobre as análises laboratoriais realizadas no sector acima mencionado. Esta conheceu, executou com profissionalismo, espírito científico e criatividade as técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico serológico do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). Um vírus que infecta preferencialmente células denominadas linfócitos T, responsáveis pela defesa do organismo.

No âmbito das suas atribuições e com vista a cumprir os seus objectivos, o INS estabelece acordos e protocolos de cooperação com Instituições congéneres, Estabelecimentos de Investigação, organismos públicos ou privados, nacionais e internacionais. A realização conjunta de programas e projectos de interesse comum e a utilização simultânea de recursos disponíveis dentro de uma perspectiva de racionalização e optimização de meios humanos e de equipamento de investigação são acções realizadas no âmbito da criação do INS (MISAU, 2005).

A sede do INS encontra-se instalada dentro do MISAU (Ilesh, 2006 em comunicação pessoal).

O INS está estruturado da seguinte forma:

- Conselho de Administração;
- Direcção Geral;
- Direcção Científica;
- Departamentos Centrais;
- Centros de Investigação;
- Unidades de Pesquisa;
- Laboratórios Especializados
- Unidades de Serviço (MISAU, 2005).

A Direcção científica tem como função planificar e coordenar o processo de investigação, com vista a obter melhor rendimento científico. Esta direcção compreende:

- Departamento de Imunologia;
- Departamento de Parasitologia Intestinal e Vesical;
- Departamento de estudos de plantas medicinais e medicina tradicional;
- Laboratório Especializado;
- Departamento de Parasitologia de Sangue.

O Departamento de Imunologia desenvolve actividades de pesquisa em Imunologia Clínica, Serologia e Biologia Molecular. São objectos de pesquisa neste Departamento HIV e outras doenças virais preveníveis por vacina, doenças infecciosas e não infecciosas com importância para a saúde pública, tecnologias laboratoriais para o diagnóstico e monitorização de doenças infecciosas humanas (MISAU, 2005).

Este Departamento, possui Laboratórios de referência para enumeração de linfócitos T CD4+, detecção de ADN quantificação de ARN viral, ensaios diagnósticos e de monitorização de doenças virais, como é o caso do HIV e algumas doenças preveníveis por vacina (MISAU, 2005).

O Departamento de Imunologia, possui os seguintes laboratórios:

- Laboratório de Serologia na secção de Imunologia Clínica;
- Laboratório de Microscopia óptica na secção de Imunologia Clínica;
- Laboratório de Microscopia de fluorescência na secção de Imunologia Clínica;
- Laboratório de Citometria de Fluxo na secção de Imunologia;
- Laboratório de Biologia Molecular na secção de Virologia Médica (MISAU, 2005).

2. PROGRAMA DE ESTÁGIO PREVIAMENTE DETERMINADO

O programa de estágio pré-definido incidiu na apreciação dos trabalhos desenvolvidos no Departamento de Imunologia. Houve um período de reconhecimento do local de estágio seguido da escolha do tema. Assim, a estagiária no cumprimento das suas obrigações de aprendizagem cumpriu cerca de 300 horas no Laboratório de Serologia (de 2 de Junho a 2 de Setembro de 2006). Tendo participado nas diversas actividades de rotina realizadas no Departamento com o objectivo de aprender os aspectos práticos e científicos desenvolvidos junto com os técnicos e orientadora do estágio.

2.1. Objectivos

2.1.1. Geral:

- ❖ Conhecer e descrever técnicas e procedimentos laboratoriais usados para o diagnóstico serológico do HTLV.

2.1.2. Específicos:

- ❖ Conhecer e aplicar as normas de biosegurança;
- ❖ Conhecer e aplicar as normas laboratoriais de recepção, registo e encaminhamento das amostras para as respectivas unidades;
- ❖ Processamento de amostras de plasma para o diagnóstico do HTLV usando as técnicas ELISA e Western Blot.

2.2. Metodologia

2.2.1. Normas de Biosegurança

Segurança biológica é o termo utilizado para descrever os princípios e as práticas que são implementadas para evitar a exposição não intencional e o escape acidental de agentes patogénicos e toxinas.

Para conhecer as normas de biosegurança foi consultado o manual de segurança biológica em Laboratórios (OMS, 2004). Foi também consultado, normas de procedimentos laboratoriais em prospectos de testes ELISA e Western Blot usados durante os procedimentos dos testes, tendo observado atentamente os procedimentos junto aos técnicos e orientadora do estágio e por último aplicado rigorosamente as normas de biosegurança vigentes no Departamento de Imunologia (vide normas de biosegurança laboratorial e precauções dos testes nos anexos 1 e 2 respectivamente).

2.2.2. Amostras

Foram usadas 726 amostras HIV positivas provenientes dos Hospitais de Dia de Lichinga, Tete, Xai-Xai, Hospital Militar, Centro de Saúde do Alto-Maé e 1º de Maio para contagem laboratorial de linfócitos TCD4 de rotina como componente do seguimento laboratorial da infecção pelo HIV. Aquelas com contagem elevada de células TCD4 (+ de 800 células/mm³) foram submetidas à pesquisa laboratorial do HTLV.

2.2.3 Recepção e Registo das Amostras

Na sala de recepção e registo das amostras fez-se a confirmação do nome e o número de identificação do doente (NID) rotulados nos tubos das amostras com das requisições, atribuição de um novo código (interno) do Departamento e registo na respectiva pasta, o código, data, nome, sexo, idade, NID, proveniência da amostra, tipo do tubo, da análise e observação das condições das amostras. As amostras com quantidade insuficiente ou que se apresentavam com coágulos foram rejeitadas.

2.2.4. Processamento

2.2.4.1. Separação e Conservação do Plasma

Do sangue total foi separado o plasma a 1600 rotações minuto (1600 RPM) durante 15 minutos e aliqotado em viais que foram rotulados com o NID, proveniência e o novo código. As amostras de plasma foram conservadas entre 2°C a 8°C, (se o teste fosse realizado dentro de 7 dias após a colheita), ou congeladas a -20 °C até ao uso (se o teste não fosse realizado 7 dias após a colheita, até à realização dos testes).

2.2.4.2. Amostras para Testagem do HTLV

O teste de ELISA foi descrito pela primeira vez em 1971 e desde então tem sido considerado uma das técnicas mais importantes de diagnóstico. O ELISA pode ser utilizado para detectar a presença de antígenos ou anticorpos (presentes no soro ou plasma).

Amostras com CD4 elevado (+ de 800 células/mm³) foram testadas para HTLV-I/II usando o teste ELISA, ABBOTT-MUREX HTLV-I/II (Abbot, Japão) e a confirmação foi feita pelo teste Western Blot, GENELABS DIAGNOSTIC HTLV BLOT-I/II 2.4, usando um algoritmo serológico de testagem (figura 1).

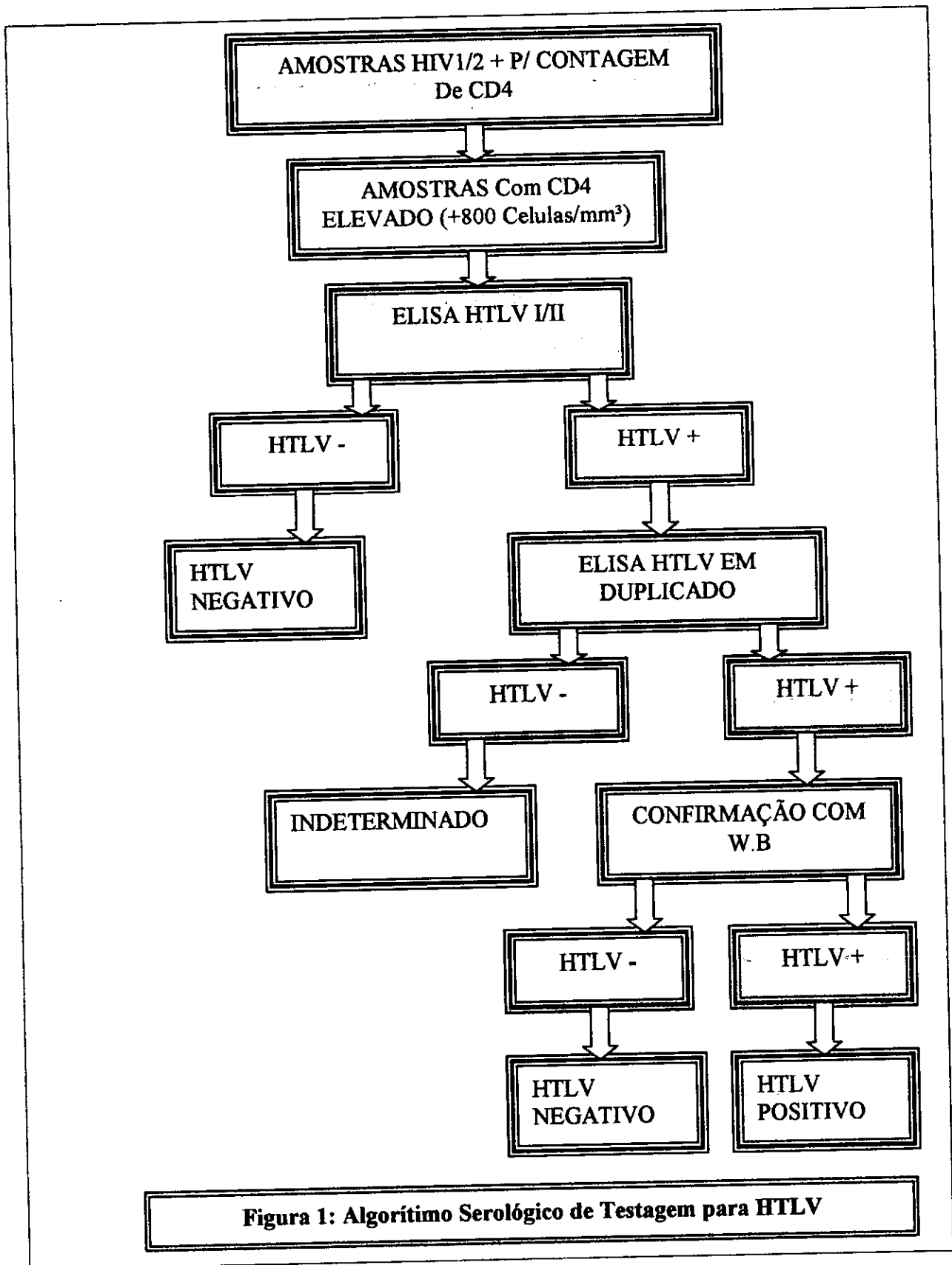


Figura 1: Algoritmo Serológico de Testagem para HTLV

Murex HTLV-I/II é um teste ELISA “sandwich” baseado em proteínas recombinadas derivadas das proteínas transmembranárias de HTLV-I e HTLV-II e peptídeos sintéticos de proteínas das membranas externas de HTLV-I e HTLV-II. Os antígenos são seleccionados de maneira a maximizar a especificidade e a sensibilidade para ambos agentes infecciosos, HTLV-I e HTLV-II, (Abbott, Japão). A componente da fase sólida é um antígeno, o anticorpo a ser detectado liga-se a este componente e a seguir adiciona-se um segundo anticorpo marcado com a enzima dirigido contra o anticorpo. Adiciona-se o substrato da enzima, produzindo um produto de reacção colorida que é medido espectofotometricamente (Stites, 2000). Segundo o fabricante, “Murex Biotech Limited”, este teste tem uma sensibilidade de 99,80% e especificidade de 99,94%. (Vide descrição dos componentes do kit no anexo 3.a).

As amostras não reactivas no teste ELISA foram consideradas negativas e as reactivas foram retestadas em duplicado usando o mesmo teste ELISA.

a) Procedimento do Teste ELISA

- Antes de iniciar o teste, as amostras e o kit para o uso eram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, reconstituía-se o conjugado, preparava-se a solução do substrato e a solução de lavagem (ver preparação dos reagentes no anexo 3.a);
- Adicionava-se 50 µl de diluente simples e 50 µl da amostra ou 50 µl do controlo nos respectivos poços. Em cada placa, o controlo negativo era pipetado para os três poços A1, até C1 e adicionava-se 50 µl do controlo positivo anti-HTLV no poço D1, na primeira coluna da placa;
- Cobria-se a placa e incubava-se durante 30 minutos a 37°C em banho maria;
- No fim da incubação lavava-se a microplaca em 5 ciclos, com solução de lavagem;

- Após a lavagem, adicionava-se 50 µl do conjugado em cada poço. Cobria-se a placa e incubava-se como na etapa anterior. No fim da incubação lavava-se obedecendo o procedimento da lavagem.
- Imediatamente após a lavagem, adicionava-se 100 µl de substrato em cada poço. Cobria-se a placa e incubava-se. Depois a placa era retirada directamente à luz havendo mudança de cor nos poços, onde a amostra fosse reactiva. Em seguida adicionava-se 50 µl de solução de paragem da reacção (0.5-2 M de ácido sulfúrico) em cada poço. Dentro de 15 minutos lia-se a absorvância a 450 nm usando a referência de 620 nm -690 nm. O teste foi executado e interpretado segundo o procedimento indicado pelo fabricante e traduzido no anexo 4.a.

2.2.4.3. Confirmação das Amostras HTLV Positivas por Western Blot

As amostras reactivas quando testadas em duplicado com o teste ELISA, foram posteriormente confirmadas usando a técnica do Western Blot comercial (GENELABS DIAGNOSTIC HTLV BLOT 2.4). O teste Western Blot, é considerado universalmente como teste serológico padrão para a confirmação e classificação das infecções pelo HTLV. Este teste foi concebido como um teste complementar para anticorpos, que pode caracterizar amostras repetidamente positivas nos testes de triagem iniciais para anticorpos contra HTLV-I/II. O teste HTLV BLOT 2.4, é um teste que assenta no princípio ELISA indirecto em tiras de nitrocelulose incorporadas com proteínas virais do HTLV-I, derivadas de partículas virais rompidas nativas e inativadas e proteínas obtidas por engenharia genética. Os antígenos virais, são separados por electroforese, em gel poliacrilamida de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Stites, 2000).

O tratamento do produto da lise viral com SDS confere uma carga negativa às proteínas. As proteínas virais são então submetidas a electroforese em gel de poliacrilamida. Devido ao facto de suas proteínas terem se tornado negativamente carregadas, a sua separação baseia-se no peso molecular quando submetidas a electroforese. As proteínas maiores permanecem na parte

superior do gel, enquanto as menores migram para a base do gel para uma matriz de suporte (Stites, 2000). Este método é suficientemente sensível para detectar quantidades mínimas de anticorpos específicos contra HTLV no soro ou plasma. Segundo o fabricante (Medical Technology Promedt, Japão) o teste tem uma sensibilidade de 99,9% e especificidade de 92,5%. As reacções são consideradas positivas quando surge uma linha de precipitação ou cor no peso molecular correcto para determinadas proteínas. As amostras positivas neste teste foram consideradas definitivamente como positivas. (Vide descrição dos componentes do kit no anexo 1.b.).

a) Procedimento do Teste Western Blot

- Usando a pinça, retirava-se o número necessário de fitas do tubo e colocava-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Incluía-se fitas para controlo reactivo fraco e não-reactivo.
- Adicionava-se 2 ml de solução tampão de lavagem diluída em cada poço.
- Incubava-se as fitas durante 5 minuto à temperatura ambiente na plataforma oscilante.
- Adicionava-se 2 ml de solução tampão para blotting em cada poço. Em seguida era adicionado 20 µl da amostra ou de controlo nos respectivos poços.
- Cobria-se a bandeja e incubava-se durante 1 hora à temperatura ambiente na plataforma oscilante.
- No fim da incubação aspirava-se a mistura dos poços e lavava-se cada fita 3 vezes com 2 ml de solução tampão de lavagem diluída, deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem.
- Adicionava-se 2 ml do conjugado de trabalhos a cada poço, cobria-se a bandeja e incubava-se durante 1 hora à temperatura ambiente na plataforma oscilante.

- No fim da incubação aspirava-se o conjugado dos poços, lavava-se como na etapa anterior. Seguidamente adicionava-se 2 ml de solução de substrato a cada poço cobria-se a bandeja e incubava-se durante 15 minutos.
- Findo a incubação aspirava-se o substrato e enxugava-se as fitas três vezes com água destilada para interromper a reacção.
- Usando a pinça, retirava-se cuidadosamente as fitas e eram colocadas sobre toalha de papel. Cobria-se com toalhas de papel e secava-se.
- Por fim as fitas eram montadas sobre folha de papel branco não absorvente e conservadas em local escuro. (O teste foi executado e interpretado segundo o procedimento indicado pelo fabricante e traduzido no anexos 4.b.)

3. APOIO CONCEDIDO POR PARTE DA UNIDADE DE ESTÁGIO

O Departamento de Imunologia disponibilizou todo o material necessário para o estágio assim como suportou todas as despesas. Este também efectuou a supervisão do estágio.

Nos trabalhos realizados, a estagiária sempre esteve na companhia dos técnicos e orientadora do estágio. Os mesmos sempre mostraram disposição em ajudar e esclarecer qualquer tipo de dúvida.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Considerações Gerais Sobre o HTLV

O Vírus linfotrópico humano de células T (HTLV) é um vírus que pertence à família dos retrovírus humanos (família *Retroviridae*), género *Deltaretrovirus*, com tropismo para as células T, particularmente linfócitos T CD4+, o seu efeito é transformante e não citopático resultando em proliferação celular das células infectadas (Walter e Ávila, 2001).

Existem 4 espécies de vírus:

- *Vírus linfotrópico T humano tipo I (HTLV-I)*;
- *Vírus linfotrópico T humano tipo II (HTLV-II)*;
- *Vírus linfotrópico T humano tipo III (HTLV-III)*;
- *Vírus linfotrópico T humano tipo IV (HTLV-IV)* (Wikipedia, the free encyclopedia, 2006).

O HTLV-I e HTLV-II são retrovírus geneticamente relacionados, pertencentes à subfamília *Oncovirinae*. São constituídos por partículas esféricas com 100 nanômetros de diâmetro, compostas de core central eletrondenso e envelope externo glicoprotéico. A porção central do vírião contém duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) de fita única (contendo 9 quilobases), a enzima transcriptase reversa, proteínas da matriz viral e o capsídeo proteico (Walter e Ávila, 2001). O genoma proviral está constituído pelos seguintes genes estruturais e regulatórios: env, pol, gag, tax e rex. As glicoproteína da transmembrana (gp21) e a glicoproteína externa do envelope (gp46) são codificadas pelo gene env; a enzima transcriptase reversa (p99), RNase, endonuclease e protease são codificadas pelo gene pol; por sua vez as proteínas do core viral (p15, p19 e p24) são codificadas pelo gene gag e o gene tax codifica a proteína (p40) enquanto que o gene rex codifica a proteína (p27) (Walter e Ávila, 2001).

O HTLV-I, primeiro retrovírus humano a ser identificado em 1980 nos E.U.A. tem sido associado etiologicamente a Leucemia das células T do adulto (ATL-Adult.T-cel-Leukaemia), a paraparesia espástica tropical, a polimiosite, artrite, uveíte (inflamação do globo ocular), lesões

dermatológicas entre outras doenças (Semmes e Hammarskjold, 2006). Este vírus infecta preferencialmente as células T, embora outros tipos celulares possam ser infectados *in vitro*. Estudos *in vitro* já demonstraram o seu poder transformante sobre as células, levando a desordens linfoproliferativas. Em geral os linfócitos T transformados são subpopulação CD4 e raramente CD8 (Stites, 2000).

O HTLV-II foi identificado em 1982 e tem 66% de homologia genética com o tipo I. Contudo, ainda não está claramente associado com nenhuma patologias, embora existam relatos da sua co-ocorrência com doenças neurológicas semelhantes às associadas ao HTLV-I (Catalan-Soares *et al*, 2004). Os vírus HTLV-I/II, são transmitidos por contacto sexual, transfusão de sangue infectado, injeção de drogas intravenosas com material contaminado, e quanto a transmissão vertical, não existe evidência directa de transmissão transplacentária do HTLV-I, entretanto, é comum a ocorrência de transmissão do lactente através do leite materno (Stites, 2000).

O HTLV-III foi a primeira designação do HIV nas antigas literaturas que relatam casos do SIDA mas que desde então caiu em desuso. O HTLV-III, foi descoberto e descrito em 1984. Provavelmente o vírus tenha sido transmitido a partir de macacos, através das mordeduras e arranhaduras aos seus caçadores (Wikipedia, the free encyclopedia, 2006).

O HTLV IV foi identificado em 2005, mas não há estudos detalhados sobre ele e por isso não se conhece os seus aspectos de patologia e epidemiologia. (Wikipedia, the free encyclopedia, 2006).

Os níveis mundiais, estimam que cerca de 20-30 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-I. Este vírus é endémico em número bem definido de regiões geográficas que incluem o Sul do Japão, Bacia das Caraíbas, América do Sul e Central e Oeste de África, enquanto que o HTLV-II é endémico na América e Índia. (Cruz *et al*, 2005).

Apesar de infectar cerca de 20-30 milhões de indivíduos no mundo, principalmente em algumas Ilhas do Japão, Caraíbas, África e no Brasil, o vírus HTLV-I é um problema de saúde pública pouco divulgado (Catalan- Soares *et al*, 2004). As primeiras descrições do vírus ocorreram na década 80, nos Estados Unidos e no Japão (Abbott, 2005). Deste período em diante, novos estudos acerca da infecção pelo HTLV-I foram efectuados, assim como sobre o vírus HTLV-II, que tem algumas semelhanças com HTLV-I mas que até agora não foi considerado como causador de doença (Stites, 2000).

Em Moçambique não há dados sólidos sobre a prevalência desta infecção na população geral. Segundo Samo Gudo *et al* (2004), num estudo em dois campos de refugiados moçambicanos na Suazilândia foram encontradas prevalências de HTLV-1 de 2.8 e 5.4 %. Num outro estudo feito no Departamento de Imunologia do INS, foi encontrada prevalência de HTLV-I/II de 5% em 700 indivíduos infectados pelo vírus de HIV (dados não publicados).

Neste momento, está a decorrer um estudo no Departamento de Imunologia, sobre comparação de sub-população de linfócitos T em pacientes Moçambicanos co-infectados pelos vírus linfotrópicos HIV e HTLV-1. Segundo Samo Gudo *et al*. (2004) estudos de pacientes co-infectados pelo HIV e HTLV é uma matéria nova nos membros clínicos, membros de pesquisa e saúde pública em Moçambique. Os estudantes, clínicos, pesquisadores terão maior oportunidade para adquirir conhecimentos sobre a patogênese, diagnóstico e manejo de pacientes co-infectados por HIV e HTLV-1.

Embora a maior parte dos indivíduos infectados por HTLV-I ou HTLV-II permaneça assintomática por toda a vida, com período de incubação de 30 a 50 anos, reconhece-se o papel etiológico do HTLV-I em algumas doenças, como é o caso da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL/L), a paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-I, além de síndromes inflamatórias tais como uveítes, polimiosite, artropatias e dermatopatias, assim como a dermatite infecciosa (Walter e Ávila, 2001).

4.1.2. Leucemia/Linfoma de Células T de Adulto (ATL/L)

A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL/L) caracteriza-se como uma leucemia de linfócitos T maduros. Incide preferencialmente em adultos e apresenta-se como adenomegalia generalizada, acompanhada de hepatosplenomegalia, lesões osteolítica, hipercalcemia e frequentes manifestações cutâneas. No sangue periférico caracteristicamente se encontram linfócitos com morfologia atípica, exibindo núcleos multilobulados (células ATL).

A ATL/L apresenta-se sob diferentes formas clínicas:

- Aguda, com os sintomas acima descritos, acompanhados de hipercalcemia e elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica. Nesses casos encontra-se células ATL em número elevado no sangue periférico;
- Crónica, onde predominam a linfonomegalia e a hepatosplenomegalia, acompanhadas de leucocitose. A calcemia é normal podendo-se observar elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica. Células mononucleares periféricas atípicas correspondem a menos de 10% do total de leucócitos;
- Indolente, com manifestações dermatológicas apenas. Nesta forma clínica a calcemia e os níveis séricos de desidrogenase láctica são normais. Células ATL representam 0,5% a 3% apenas dos leucócitos periféricos;
- Ou ainda sob forma linfomatosa, com linfonomegalia e sem linfócitos atípicos circulantes.

A proliferação leucémica da ATL/L é caracteristicamente monoclonal, com células de fenótipo CD33+, CD4+ CD25+, HLA-DR+. Esta neoplasia hematológica possui prognóstico sombrio, especialmente quando se apresenta sob a forma aguda. Os pacientes com ATL/L exibem reacções serológicas positivas para HTLV-I

4.1.3. Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao Vírus HTLV-I

A paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada a HTLV-I (HAM/TSP) caracteriza-se como uma mielopatia crónica, lentamente progressiva, que provoca paralisia espástica com libertação piramidal, preferencialmente em membros inferiores. Incide geralmente entre a 4.^a e 5.^a décadas de vida, especialmente em mulheres. O quadro paraparéstico é geralmente acompanhado de distúrbios esfínterianos (retenção urinária e/ou fecal) e de distúrbios sensoriais discretos. Na investigação diagnóstica complementar dos pacientes encontram-se ainda reacções serológicas positivas para infecções por HTLV-I e reacções imunológicas positivas para este retrovírus no liquor. A evolução lenta e progressiva do quadro neurológico leva frequentemente os pacientes a quadros incapacitantes (Walter e Ávila, 2001).

4.1.4. Diagnóstico Laboratorial do HTLV-I/II

O diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-I ou HTLV-II pode ser necessário em diferentes situações clínicas:

- Frente a um paciente que apresenta sintomas e/ou sinais sugestivos de doença causada por retrovírus, para confirmação do suposto diagnóstico clínico;
- Na triagem diagnóstica de indivíduos expostos a HTLV-I ou HTLV-II, como, por exemplo, em comunicantes familiares ou parceiros sexuais de portadores dessas infecções;
- Na triagem obrigatória de doadores assintomáticos de sangue.

4.1.4.1. Testes Serológico

A serologia constitui o método utilizado para identificar a maioria das infecções de origem viral (Murray *et al*, 2002). O diagnóstico rotineiro de infecção por HTLV-I/II baseia-se na detecção serológica de anticorpos e/ou antígenos. Existem testes serológicos que servem para triagem dos pacientes dos quais o mais usado é o teste ELISA —“Enzyme Linked

Immunoabsorbent Assay". Amostras reactivas ao ELISA são posteriormente confirmadas pela técnica de Western Blot, que é mais específica (Walter e Moraes, 2001).

ELISA é um teste imunoenzimático, que utiliza anticorpos secundários marcados com uma enzima para detectar anticorpos contra um antígeno específico. É um método que se baseia num anticorpo de captura e fixado a uma placa de plástico, que imobiliza o analisado na amostra. A seguir, adiciona-se um segundo anticorpo, que reconhece uma parte diferente da molécula do analisado. Este segundo anticorpo está conjugado a uma enzima. A presença de anticorpos no material testado é revelado pela acção da enzima no substrato, ocasionando mudança de cor do liquido sobrenadante. O teste possui muitas variações e pode ser também utilizado para detectar antígenos (Peakmar e Vergani 1999).

Este método é um componente integral dos Laboratórios de Imunologia clínica, em virtude do seu elevado grau de sensibilidade e ainda ser automatizado para testagem simultânea de grande número de amostras de soro ou plasma e com o mínimo de pessoal. É uma técnica simples e prática, os resultados são obtidos rapidamente (3 a 4 horas), os reactivos marcados com enzima são estáveis, podendo ser conservados por longo tempo. (Stites, 2000).

O Western Blot é um método usado para detectar proteínas em um homogenato (células bem trituradas). Usa a técnica de electroforese de proteínas em gel para separar as proteínas desnaturadas segundo o seu peso molecular (PM). As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde se usam anticorpos como sonda específica à proteína (Peakmar e Vergani 1999).

5. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIDADE DE ESTÁGIO

Durante o estágio foi possível adquirir conhecimentos sobre os aspectos práticos e científicos que dizem respeito as normas de biosegurança vigentes no Laboratório incluindo, normas de recepção e registo de amostra assim como normas de procedimento dos testes ELISA e Western Blot.

5.1. RESULTADOS

No período em que decorria o estágio foram submetidas à pesquisa laboratorial do HTLV-I/II 726 amostras (100%) colecionadas com o nível de células TCD4 acima de 800 células por mm³ das quais 91 amostras (12.54%) apresentaram uma reactividade ao teste ELISA ABBOTT MUREX HTLV-I/II. As 91 amostras, quando retestadas em duplicado com o mesmo teste ELISA e confirmadas com o teste Western Blot 75 amostras (10.33%) foram reactivas. (ver tabela 1)

Os resultados das amostras foram posteriormente reportados e enviados as suas proviniências para se fazer o seguimento e tratamento dos indivíduos em questão.

Tabela 1: Resultado Serológico para o HTLV-I/II no Teste ELISA e W.B.

	Nº	%
Amostras reactivas ao teste ELISA	91	12.53%
Amostras reactivas aos testes ELISA e W.B	75	10.33%
Amostras não reactivas os testes	651	89.77%
Total de Amostras	726	100%

6. PERSPECTIVAS CRÍTICAS DO ESTÁGIO NO LABORATÓRIO

6.1. DISCUSSÃO

Durante o estágio as amostras eram recebidas numa zona de recepção de amostras dentro do Departamento e distribuídas para os respectivos laboratórios. O Departamento de Imunologia obedece as normas de recepção de amostras o que vai de acordo com as normas estabelecidas pela OMS (2004), que recomenda aos laboratórios que recebem grande número de amostras para terem uma sala ou zona especial para tal efeito.

Para o transporte de amostras dentro do Laboratório, utilizava-se para além do suporte de amostras recipientes secundários tais como, transportadores de amostras biológicas. O que vai de acordo com as normas da OMS (2004), que recomenda o uso de recipientes secundários, como por exemplo caixas munidos de separações para que os recipientes com amostras se mantenham em posição vertical de modo a evitar derrame accidental. Estes recipientes secundários podem ser de metal ou de plástico e devem ser regularmente desinfectadas.

Amostras com contagem elevados de células TCD4 foram submetidas à pesquisa laboratorial do HTLV uma vez que, pacientes co-infectados pelos vírus HIV e HTLV, apresentam linfocitose (aumento dos linfócitos TCD4). De acordo com Stites (2000), o HTLV infecta preferencialmente as células TCD4 e estudos *in vitro* já demonstraram o seu poder transformante sobre as células, levando a desordens linfoproliferativas.

As 91 amostras 12.53% reactivas ao teste ELISA, quando retestadas em duplicado com o mesmo teste ELISA e confirmadas com o teste Western Blot, 75 amostras (10.33%) apresentaram-se reactivas. A não reactividade de algumas amostras na confirmação, deve-se provavelmente, à contaminação dos poços das placas durante a manipulação das amostras ou então aos resultados falsos positivos. Segundo Stites, (2000), uma vez que os métodos de triagem sorológica para HTLV, os ensaios imunoenzimáticos, apresentam frequentes reacções falso-positivas, o imunodiagnóstico dessa retrovirose depende da confirmação da soro-

reactividade, através de Western Blot. O algoritmo empregue para detecção sorológica inicial preconiza a utilização de testes imunoenzimáticos com amostras de soro ou plasma em duplicado.

Do número total de amostras HIV positivas, colecionadas com contagem elevada de células TCD4 (acima de 800 células mm^3) 75 amostras (10.33%) apresentaram-se reactivas aos teste ELISA e Western Blot. Estes resultados mostram a presença do vírus de HTLV em pacientes infectado com HIV o que indica casos de co-infecção por HIV e HTLV. Segundo Samo Gudo *et al* (2004), estudos conduzidos por Schechter *et al*, (1994 e 1995), Beilke *et al* (1994), e Fantry *et al* (1995) em indivíduos co-infectados observaram que a doença evoluía com contagens elevadas de linfócitos TCD4+ a despeito da progressão da doença por HIV.

Apesar de não ter sido feito neste trabalho, um estudo de prevalência da infecção por HTLV, os resultados obtidos durante o estágio, mostram que há um aumento de nº de infecção por HTLV comparando com os resultados obtidos noutros estudos. Segundo Samo Gudo *et al* (2004), num estudo em dois campos de refugiados moçambicanos na Suazilândia foram encontradas prevalências de HTLV-1 de 2.8 e 5.4 %. Em outros estudos sobre a prevalência de HTLV em pacientes Moçambicanos infectados com o vírus de HIV, feitos em 2004 e 2006 no Departamento de Imunologia do INS por Pedro e Bahat, foi encontrada prevalências de HTLV-I/II de 3% em 400 indivíduos e 5% em 700 indivíduos infectados pelo vírus de HIV respectivamente. Ainda, segundo Walter e Ávila 2001, Inquéritos mais recentes, com emprego de testes sorológicos confirmatórios (Western Blot), demonstraram soroprevalência de 10% entre pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida em São Paulo.

7. CONCLUSÕES

No que se refere às técnicas e procedimentos laboratoriais no diagnóstico serológico do HTLV, observados ao longo do estágio, concluiu-se que:

- A identificação dos portadores do HTLV-I/II é importante para prevenir a transmissão da infecção, bem como identificar sintomas iniciais de doenças associadas aos vírus, ajudando deste modo a fazer um melhor controlo e tratamento das doenças causadas pelos vírus;
- Neste laboratório, a infecção causada por HTLV-I/II é detectada por imunoensaio enzimático (ELISA) e a confirmação dos testes reactivos é com base no teste Western Blot;
- Especificamente, a estagiária aprendeu as normas de biosegurança vigentes no Laboratório incluindo, normas de recepção e registo de amostra assim como normas de procedimento dos testes ELISA e Western Blot;
- A estudante aplicou os conhecimentos e capacidades adquiridas ao longo do curso, adquiriu habilidades técnicas necessária para o desenvolvimento de actividades do laboratório.

8. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se:

- Que se assegure uma formação contínua sobre medidas de segurança;
- A disponibilização dos teste de HTLV-I/II para familiares de indivíduos infectados e dadores de sangue;
- A introdução dos testes nas consultas pré-natal, aconselhamento e acompanhamento dos infectados em centros de referências para evitar a disseminação silenciosa do HTLV;
- Redução de nº de parceiros sexuais e o uso de preservativos em relações sexuais ocasionais;
- Que se façam estudos de prevalência do HTLV em mulheres grávidas nas consultas pré-natais dos centros de saúde da cidade de Maputo ou em outras províncias do país;
- Por ultimo recomenda-se que mais estudantes finalistas optem pelo estágio em instituições ou empresas ligadas á Biologia, por ser uma excelente oportunidade de desenvolver o interesse pela profissão e capacidade para executar tarefas diferenciadas e integração nas actividades regulares de uma instituição.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott Murex. (2001). Murex HTLV I+II. 7pp. UK.

Catalan-Soares, B., A. Carneiro-Proietti e F.A. Proietti (2004). Vírus Linfotrópico Humano em Familiares Candidatos a Doação de Sangue Seropositivos. Rev Panam Salud Publica, 16 (6): 387-394.

Cruz, B.P., B. Catalan-Soares e F. Proietti (2005). Manifestações Reumáticas Associadas ao Vírus Linfotrópico Humano de Células T do Tipo I (HTLV-I). Rev Bras Reumatol, 2 (45): 7-71.

Genelabs Diagnostics. (2004). HTLV BLOT 2.4 TESTE WESTERN BLOT 10pp. SA.

Ministério da Saúde. (2005). Regulamento Interno do Instituto Nacional de Saúde. 16pp. Maputo, Moçambique.

Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi e M.A. Pfaller (2002). Microbiologia Médica. 4ª edição, 762pp Guanabara Koogan, RJ, Brasil.

Organização Mundial de Saúde (2004). Manual de Segurança Biológica em Laboratório. 3ª edição, 223pp. Genebra.

Peakman, M. e D. Vergani (1999). Imunologia Básica e Clínica. 1ª edição, 762pp. Guanabara Koogan, RJ, Brasil.

Samo Gudo, E., A. Melembe, A. Zango, D. Bila, H. Nzwalo, J. Samo Gudo, N. Batt, I. Manhiça, I. Jani (2004). Comparação de Sub-populações de Linfócitos T em Pacientes Moçambicanos Co-infectados pelos Vírus Linfotrópicos HIV e HTLV-I. Protocolo de Pesquisa. 17pp. Maputo, Instituto Nacional de Saúde, Departamento de Imunologia.

Semmes, O.J. e M.L. Hammarskjold (2006). Molecular pathogenesis of HTLV-1. 7pp. Department of Microbiology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville. VA, USA.

Stites, D.P., A.I.Terr e T.G.Pakslow (2000). Imunologia Médica 9ª edição, 689pp. Guanabara, Koogan, RJ, Brasil.

Walter, A.F. e S.L.M Ávila (2001). Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2ªedição, 780pp. Guanabara Koogan, RJ, Brasil.

Wikipedia, the free encyclopedia. (2006). Human T-lymphotropic virus, 5pp.

ANEXOS

Anexo 1. Norma de Biosegurança

a) Acesso

- Só o pessoal autorizado deve entrar nas áreas de trabalho do laboratório.
- As portas do laboratório devem permanecer fechadas.
- As crianças não devem entrar nas áreas de trabalho do laboratório.

b) Protecção Individual

- Deve utilizar-se sempre batas nos trabalhos de laboratório.
- Deve utilizar-se luvas apropriadas em todos os trabalhos que impliquem contacto directo ou accidental com sangue, fluidos corporais e materiais potencialmente infecciosos. Após utilização, deve tirar-se as luvas de forma asséptica e lavar bem as mãos após manusear material infeccioso e antes de sair da área de trabalho do laboratório.
- Deve utilizar-se óculos de segurança, máscaras, sempre que for necessário proteger os olhos e a cara de salpicos.
- Roupa de protecção laboratorial não deve ser utilizada fora do laboratório (cantina, cafetaria, escritórios, biblioteca, salas do pessoal e quartos de banho).
 - Sandálias e chinelos não devem ser utilizados nos laboratórios.
 - É proibido comer, beber, fumar, maquilhar-se e pôr lentes de contacto nas áreas de trabalho do laboratório.
 - É proibido guardar comidas e bebidas nas áreas de trabalho do laboratório.
 - A roupa de protecção laboratorial utilizada no laboratório não deve ser guardada nos mesmos cacifos ou armários da roupa normal.

c) Áreas de Trabalho do Laboratório

- O laboratório deve estar arrumado, limpo e sem materiais que não sejam pertinentes para as suas actividades.
 - As superfícies de trabalho devem ser disinfectadas após qualquer derrame de material potencialmente perigoso e no fim de um dia de trabalho.
 - Todos os materiais contaminados e espécimes devem ser disinfectados antes de serem descartados ou limpos para reutilização.

d) Recipientes de Amostras

- Os recipientes de amostras devem ser de vidro ou de preferência de plástico. Devem ser resistentes com tampa ou rolha correctamente colocada. O exterior dos recipientes não deve ter traços do material. Os recipientes devem ser correctamente etiquetados para facilitar a identificação. Os formulários de pedidos ou de especificação de amostras não devem ser embrulhados com os recipientes mas metidos em envelopes de preferência impermeáveis.

e) Abertura de Embalagens

- O pessoal que recebe e desembulha os recipientes com amostras deve conhecer os riscos potenciais para a saúde que isso implica, e deve ser treinado para adoptar medidas de precaução, especialmente no caso de recipientes partidos ou que vertem. Os recipientes de amostras devem ser abertos numa câmara de segurança biológica. Devem ter-se à disposição desinfectantes.

f) Uso de Pipetas e Meios de Pipetar

- Deve utilizar-se sempre um meio de pipetar. Não se deve pipetar com a boca;
- Todas as pipetas devem ter um tampão de algodão para reduzir a contaminação dos dispositivos para pipetas;
 - Nunca se deve soprar com a pipeta num líquido contendo agentes infecciosos;
 - Não misturar materiais infecciosos aspirando e soprando alternadamente através de uma pipeta;
 - Não soprar na pipeta para expelir os líquidos;
 - Deve dar-se preferência a pipetas graduadas que não necessitam de expulsar as últimas gotas;
- As pipetas contaminadas devem ser imersas num desinfectante apropriado contido num recipiente inquebrável. Devem ficar no desinfectante durante o tempo que for indicado antes de serem eliminadas;

- Um recipiente para as pipetas a eliminar deve ser colocado no interior e não no exterior da câmara de segurança biológica;
- Não se devem utilizar seringas com agulha hipodérmica para pipetar;
- Devem utilizar-se dispositivos para abrir frascos com cápsula que permitem a utilização de pipetas e evitam a utilização de seringas e agulhas hipodérmicas;
- Para evitar a dispersão de material infeccioso caído de uma pipeta, a área de trabalho deve ser coberta com um material absorvente que depois deve ser eliminado como resíduo infeccioso;

g) Separação de Soro

- A separação do soro só deve ser realizado por pessoal devidamente formado;
- Devem utilizar-se luvas e protecção para os olhos e as membranas mucosas;
- Projecções e aerossóis só podem ser evitados ou minimizados com boas técnicas de laboratório. O sangue e o soro devem ser pipetados cuidadosamente e não vazados de um recipiente para outro;
- Depois de utilizadas, as pipetas devem ser completamente submergidas num desinfectante apropriado. Devem ficar no desinfectante durante o tempo que for indicado antes de serem eliminadas;
- Tubos de amostras contendo coágulos de sangue, destinados a ser eliminados devem ser tapados com as suas tampas e colocados em recipientes apropriados para serem descartado;
- Desinfectantes adequados devem estar disponíveis para limpar salpicos e derrames.

h) Utilização de Centrifugadoras

O bom funcionamento mecânico de centrifugadoras de laboratório é um requisito prévio de segurança microbiológica na sua utilização.

- As centrifugadoras devem ser utilizadas segundo as instruções do seu fabricante;
- As centrifugadoras devem ser colocadas de maneira que a pessoa a utilizar possam ver o

interior do cubo para colocar correctamente os recipientes e os copos;

- Os tubos e recipientes de amostras para centrifugação devem ser feitos de vidro espesso ou de preferência de plástico e antes de serem utilizados devem ser inspeccionados para detectar defeitos eventuais;
- Os tubos e recipientes de amostras devem ser sempre bem tapados (se possível com rolhas de rosca) para centrifugação;
- Os tubos devem ser equilibrados e devidamente fechados, devem ser postos aos pares segundo o peso;
- Para equilibrar os tubos vazios deve utilizar-se água destilada ou álcool (propanol a 70%). Não se devem utilizar soluções salinas nem hipocloreto pois corroem os metais;
- Ao utilizar rotores angulares, é preciso assegurar-se que os tubos não estejam demasiado cheios pois podem verter;
- O interior do cubo da centrifugadora deve ser inspeccionado todos os dias para verificar se há manchas ou sujidades a nível do rotor;
- Os rotores e copos da centrifugadora devem ser inspeccionados todos os dias para detectar sinais de corrosão e rachas finas;
- Copos, rotores e cubos das centrifugadoras devem ser desinfectados depois de cada utilização;
- Depois de utilizados, os copos devem ser guardados invertidos para secar o líquido que serviu para equilibrar;

Contudo, uma boa técnica de centrifugação e tubos cuidadosamente tapados oferece protecção apropriada contra aerossóis infecciosos e partículas dispersas.

Anexo 2: Precauções Durante o Processamento dos Testes

- Deve-se evitar a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar aliquotas dos frascos originais;
- As amostras dos testes, as placas, as fitas de nitrocelulose e os controlos reactivos e não reactivos, devem ser manuseadas como agentes potencialmente infecciosos.
- Durante a realização dos testes é imprescindível o uso do vestuário de laboratório e luvas descartáveis. As luvas devem ser descartadas em sacos plásticos exclusivos para lixo biológico perigoso. E em seguida lavar bem as mãos;
- É altamente recomendado que os testes sejam realizados em uma camara adequada para material biológico perigoso;
- Em caso de acidente ou contacto com os olhos, lavar imediatamente com água em abundância e procurar ajuda médica;
- Consultar imediatamente um médico caso sejam ingeridos materiais contaminados ou haja contacto deste com feridas abertas ou outros ferimentos;
- Derramamento de materiais infecciosos devem ser imediatamente enxugadas com papel absorvente e limpar a área contaminada com solução de hipoclorito de sódio a 1 % antes de continuar o trabalho. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em derramamento que contém ácidos, a não ser que a área seja primeiro enxugada com papel absorvente. O material usado (incluindo luvas descartáveis) deve ser descartado como sendo material biológico potencialmente perigoso;

- Antes do descarte, o material usado e contaminado deve ser desinfectado em solução de hipoclorito de sódio a 5% durante 30 a 60 minutos em recipientes para o lixo biológico perigoso;
- Desinfectar todos os produtos químicos e reagentes usados adicionando um volume suficiente de hipoclorito de sódio de forma a obter uma concentração final de pelo menos 1%. Deixar agir durante 30 minutos para garantir uma desinfeção eficiente;
- Não é recomendável a reutilização de placas e bandejas de incubação;

i) Avisos

- a) Os kits são para o uso exclusivo em diagnóstico in vitro.
- b) Exclusivamente para uso profissional.
- c) Solicita-se consultar a documentação dos produtos para informações sobre componentes potencialmente perigosos.

ii) Informações de Saúde e Segurança

Os kits contém material de origem humana; Nenhum método dos testes pode oferecer garantia total que os produtos de sangue humano não transmitirão infecções; As amostras assim como os controlos devem ser manuseados como agentes potencialmente infecciosos; Recomenda-se manusear as amostras e os controlos de acordo com as boas práticas de laboratórios. O descarte deverá ser realizado de acordo com os procedimento de segurança vigente. manusear as amostras e os controlos de acordo com as boas práticas de laboratórios.

iii) Precauções Analíticas

- Para garantir um desempenho perfeito dos testes é necessário seguir com rigor os procedimentos descritos nos manuais de instruções. A inobservância destes procedimentos pode acarretar resultados anormais;
- Não modificar nem substituir reagentes de um lote do kit por outro. Os controlos, as placas, as fitas de western blot foram combinados entre si para oferecer o melhor desempenho. Usar somente reagentes fornecidos com os kits;
- Não usar componentes do kit além da data de validade expressa na caixa do kit;
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar aliquotas dos frascos originais pois a contaminação reduzirá prematuramente a vida útil dos kits e fornecerá resultados errôneos. Usar técnicas assépticas como pipetas ou pontas de pipetas descartáveis para retirar aliquotas dos frascos;
- Em cada processamento de amostra de pacientes deve-se testar os controlos do kit em paralelo, usar uma ponta de pipeta nova para cada aliquta de amostra, para evitar contaminação cruzada;
- Para melhores resultados, aplicar todos os reagentes enquanto ainda estiverem frios e retorne-os ao armazenamento entre 2°C e 8°C, o mais depressa possível;
- Recomenda-se que os recipientes a serem usados com os reagentes seja lavados com água destilada antes do uso;
- Usar somente água destilada, para diluir os reagentes. E antes do uso devem ser bem misturadas;
- A solução de conjugado de trabalho, a solução-tampão de lavagem diluída e a solução para blotting devem serem preparadas logo antes do uso;
- A solução de conjugado de trabalho, deve ser preparada usando um recipiente ou béker de polipropileno;
- Não expôr os reagentes nem realizar testes em áreas contendo altos níveis de vapores de desinfectantes químicos (p.ex. vapores de hipocloritos) durante as etapas de armazenamento ou de incubação. O contacto inibe a reacção a colorido. Da mesma forma não expôr os reagentes á luz intensa;

- Os testes devem preferencialmente serem realizados á temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$);
- Certificar-se de que as fitas do teste estão voltadas para cima;
- Para a prova de Western blot, é importante usar um agitador de plataforma oscilatória e não um agitador rotativo. Caso contrário o desempenho do kit estará comprometido. A velocidade e o ângulo de inclinação recomendados para o agitador são de 12 a 16 ciclos por minutos, e 5 a 10 graus respectivamente;
- Se usar equipamento automático confirmar se está aferido antes do uso;
- Certificar-se de que as amostras são adicionadas no local onde a solução-tampão é colectada na extremidade inferior. Isto evita a formação de manchas escuras devido á adição de amostras na fita;
- Evitar o uso de congeladores de descongelamento automático para armazenar reagentes e amostras;

Anexo 3: Componentes dos kits, Material e Equipamentos**a) Descrição dos Componentes do kit para ELISA, Preparação e Quantidades Fornecidas**

- Uma placa ou cinco placas com 96 poços impregnadas com antígeno HTLV-I/II. A placa a ser usada deve estar a uma temperatura de 18°C-30°C depois de retirada do kit. O resto das placas deve ser mantidas a uma temperatura de 2°C-8°C.
- **Solução de diluente simples** Um frasco contém 36 ml de diluente e detergente.
- **Conjugado:** Um frasco contendo conjugado antígeno HTLV de peroxidase "horseradish". Quando reconstituído cada frasco contém 7 ml ou 36 ml suficientes para uma placa ou 5 placas.
- **Diluente do conjugado:** Um frasco contendo 7 ml ou 36 ml de uma solução vermelha consistindo em "buffe" proteína e detergente. Cada frasco de diluição de conjugado é suficiente para reconstituir um frasco de conjugado.
- **Reconstituição do conjugado:** Pipetou-se 2 ml ou 5 ml de diluente do conjugado para o frasco do conjugado deixou-se rehidratar por 5-10 minutos. Depois transferiu-se o volume do diluente do conjugado para o frasco do conjugado reidratado usando uma pipeta de transferência e mistou-se bem. Em seguida o frasco foi rotulado.
- **Controlo positivo anti-HTLV:** Um frasco contendo 1.5 ml de soro humano inativado contendo anticorpos para HTLV mas negativos para hepatite B "surface" antígenos (HbsAg) e negativo para anticorpos do HIV-1 e HIV-2 e HCV diluído no frasco.
- **Controlo negativo:** Um frasco contendo 2.5 ml do soro humano normal, não reactivo para HbsAg e anticorpos para HIV-1 e HIV-2, HCV, HTLV-I/II diluído no frasco.
- **Diluente do Substrato:** um frasco contém 35 ml de diluente.
- **Substrato concentrado:** um frasco contendo 35 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB).
- **Solução de lavagem:** Um frasco contendo 125 ml de solução de lavagem concentrada 20X para diluir com água destilada e obter um volume final de 2500 ml.

b) Descrição dos Componentes do kit para Western Blot, Preparação e Quantidades Fornecidas

- **Fitas de nitrocelulose:** (18-36 fitas) Incorporado com HTLV-I/II lisado viral, antígeno de envelope recombinante, e um controlo de adição de soro (o anti-humano IgG) ;
 - **Controlo não-reactivo:** Soro humano normal, não-reactivo para HbsAg nem para anticorpos contra HCV, HIV-1/2 e HTLV-I/II. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes;
 - **Controlo reactivo forte I:** (1 frasco com 80 microlitros) soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HTLV-I e não reactivo para HbsAg nem para anticorpo contra HCV E HIV-1/2;
 - **Controlo reactivo forte II:** (1 frasco com 80 microlitro) Soro humano inativo contendo títulos elevados contra HTLV-II e nao-reactivo para HbsAg nem para anticorpos contra HCV e HIV1/2 ;
 - **Solução tampão:** estoque liofilizada (1 ou 2 frascos, cada um a ser reconstituído para completar 100ml) com proteínas de origem animal e não animal inativadas pelo calor;
 - **Solução Tampão de lavagem concentrada (20x)** (1 frasco com 70ml) — tris com tween-20, contém tiomersal como conservante;
 - **A solução tampão de lavagem diluída (20x):** deve ser preparada logo antes do uso. Dilua 1 volume de solução-tampão de lavagem concentrada (20X) com 19 volumes de água destilada. Misturar bem.
 - **Conjugado:** (1 frasco com 120microlitros) – Anticorpo caprino anti IgG humano conjugado a fosfatase alcalina.
 - **Solução de conjugado do trabalho:** A solução de conjugado do trabalho deve ser preparado, diluindo o conjugado a 1:1000 em solução-tampão para blotting, p.ex. 10 microlitros de conjugado para 10ml de solução -tampão para blotting.
- Nota: A solução deve ser preparada em um recipiente ou beker de polipropileno.
- **Substrato** (1 frasco com 100ml) – Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indoli-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazolio (NBT).

- **Solução do Substrato:** (pronta para uso). Distribua directamente o volume necessário do frasco. Usar pipeta limpa. Fechar bem após o uso.
- Pó para blotting (10 embalagens 1g cada) – Leite desnatado em pó;
- **Solução tampão para blotting:** Reconstituir cada frasco do tampão estoque liofilizado com 100 ml de água destilada. Misturar bem para dissolver. Esta solução tampão estoque reconstituída mantém-se estável durante 6 semanas se conservada entre 2°C e 8°C. Agitar novamente antes de aplicar.
- Bandejas de incubação 9 poços cada (Zou 4 bandejas);
- Manual de instruções (1 exemplar);
- Pinça (1 peça).

Soluções não Fornecidas

- Solução de paragem da reacção (ácido sulfúrico 0.5-2M);
- Água destilada, hipoclorito de sódio para desinfecção.

c) Material

- Papel absorvente;
- Pontas de pipetas de 5-300 microlitros;
- Pontas de pipetas de 0.5-5 ml;
- Micropipetas multicanais de volumes apropriado;
- Micropipetas para distribuição das amostras (50-1000 microlitros);
- Provetas graduadas;
- Recipiente para descarte de material contaminado;
- Sacos plásticos para lixo Biológico;
- Crioviais com tampa;
- Pipetas para transferência das amostras;
- Contentor plástico para material contaminado;
- Suporte de crioviais para bancada;

- Pipetas graduadas descartáveis de 5-10 ml;
- Suporte para pontas de micropipetas;
- Marcadores permanentes;
- Rolo parafilme;

d) Equipamento

- Sistema de lavagem para microplacas;
- Sistema de leitura para microplacas;
- Plataforma oscilatória (com velocidade de agitação na faixa de 2 a 16 oscilações por minuto e com capacidade de inclinação entre 5 e 7 graus, para lavagem uniforme das membranas);
- Sistema de aspiração e contenção em hipoclorito de sódio;
- Banho maria para incubação de microplacas à 37°C;
- Termómetro; Centrifugador.

Anexo 4. Interpretação dos Resultados do Teste ELISA

Co=cut-off (valor calculado a partir da média dos controlos para classificar as amostras em reactivas ou não reactivas.

Co= média dos controlos negativos + 0.200

S=absorvância das amostras (lida no Espetofotómetro).

Resultados não reactivo: Amostras dando uma absorvância baixa do que o valor de "cut-off" são consideradas não reactivas no Murex HTLV -I/II.

Resultados Reactivos: Amostras dando uma absorvância igual ou maior do que o valor do "cut-off" são consideradas inicialmente reactivas no teste Murex. Tais amostras devem ser retestadas em duplicado usando o soro original. Amostras que forem reactivas em pelo menos um dos duplicados retestados são consideradas repetidamente reactivas em Murex HTLV-I/II. E presume-se que contém anticorpo contra HTLV-I/II. Tais amostras devem ser reconfirmadas usando outros testes. Amostras que não forem reactivas em ambos os poços da retestagem devem ser consideradas não- reactivas contra anticorpo HTLV-I/II.

Não adição das amostras: Em poços sem amostras, mas adicionado todos os outros reagentes, obtém-se um valor de absorvância significativamente alto em relação ao do controlo negativo.

Anexo 5. Interpretação dos Resultados do Teste Western Blot

A banda de controle de soro serve como um controle de adição da amostra na prova. A ausência desta banda indica que não foi adicionado à fita nenhum soro do teste ou o conjugado ou o substrato, ou que ocorreram outros erros operacionais.

Deve-se localizar e identificar as bandas nas fitas processadas com os controlos reativos fortes. Estas fitas serão então usadas para identificar as bandas presentes na fita que contém as amostras sobre o teste.

Padrão	Interpretação
1. Nenhuma reactividade com proteínas específicas do HTLV	SERONEGATIVO
2. Reactividade com moléculas codificadas pelo gene GAG (p19 com ou sem p14) e com duas codificadas por ENV (GD21 e rgp46-I).	SEROPOSITIVO PARA HTLV-I
3. Reactividade com moléculas codificadas por GAG (p24 com ou sem p19) e com duas por ENV (gd 21 e rgp46-II).	SEROPOSITIVO PARA HTLV
4. Reactividade com moléculas codificadas por GAG (p19 e p24) e por ENV (GD21) - Seropositivo para HTLV-I indicado se $p19 \geq p24$ - Seropositivo para HTLV-II indicado se $p19 < p24$	SEROPOSITIVO PARA HTLV*
5. Detecção de bandas específicas para o HTLV, mas que não preenchem os critérios de seropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV. No entanto, os seguintes padrões de bandeamento classificados como indeterminados podem ser interpretados como SERONEGATIVOS: - Padrões de western blot com GAG do HTLV-I indeterminado	INDETERMINADO**

<p>(HGIP), exibindo presença de p19, p26, p28, p32, p36, p53 porém ausência de qualquer proteína codificadas por ENV</p> <ul style="list-style-type: none"> - Qualquer combinações de proteínas codificadas por GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53) porém ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por ENV. - Qualquer proteína de GAG sozinha (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53). 	
--	--

* Amostras seropositivas para HTLV nas quais não é possível fazer a tipagem podem ser melhor solucionadas usando o algoritmo de Wiktor *et al* na ausência de rgp46-I e de rgp46-II. Este algoritmo usa a reatividade relativa de p19 e de p24 e mostrou-se eficiente para diferenciar os dois serotipos.

** A interpretação como indeterminado baseia-se nas diretrizes da OMS de 1990. No entanto, vários estudos sugeriram que alguns padrões de bandas indeterminados (conforme indicado) podem ser interpretados como seronegativos, em especial quando provenientes de doadores de sangue sadio.

Anexo 6. Figura que Ilustra a Centrifugação das Amostras



Anexo 7. Figura que Ilustra o Procedimento do Teste ELISA

