

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES TRANSMISSÍVEIS POR
VIA HEMATOGENICA E RESPECTIVAS METODOLOGIAS DE
TRIAGEM E DIAGNÓSTICO EM HEMOBANCO DE CURITIBA**

**MONBIO
WODZYNSKI, Kely**

CURITIBA

2007

KELY WODZYNSKI

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES TRANSMISSÍVEIS POR
VIA HEMATOGENICA E RESPECTIVAS METODOLOGIAS DE
TRIAGEM E DIAGNÓSTICO EM HEMOBANCO DE CURITIBA**

Monografia apresentada à disciplina BP024
– Estágio em Patologia Básica, do curso de
Ciências Biológicas da UFPR, sob a
orientação da Prof Ida Cristina Gubert.

UFPR

2007

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivo.....	04
3. Revisão da Literatura.....	05
3.1 HTLV.....	05
3.2 Sífilis.....	06
3.3 Doença de Chagas.....	08
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1 Descrição do método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA) para auxílio no diagnóstico e triagem de portadores do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> , causador da Doença de Chagas.....	12
4.2 Descrição do método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA) qualitativo para detecção de anticorpos contra o vírus T-linfotrópico, tipos I e II (HTLV – I e HTLV – II) em soro ou plasma humano.....	13
4.3 Descrição do teste de floculação em lâmina para detecção de Sífilis.....	14
5. Resultados.....	17
5.1 Análise da ocorrência de doença de Chagas.....	19
5.2 Análise da ocorrência de HTLV I/II.....	21
5.3 Análise da ocorrência de Sífilis.....	23
6. Discussão.....	25
7. Conclusão.....	29
8. Referências Bibliográficas.....	30

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1: Número de voluntários, amostras coletas e percentagem de doadores inaptos na triagem por mês/ano.....17
2. Tabela 2: Número de coletas realizadas e número de sorologias realizadas por mês/ano.....18
3. Tabela 3: Número de sorologias realizadas e seu respectivo percentual mensal / anual do total de amostras pesquisadas..... 19
4. Tabela 4: Resultados de doença de Chagas em primeira análise e após a repetição em duplicada.....20
5. Tabela 5: Resultados das doações reagentes e resultados novas amostras coletadas para doença de Chagas.....21
6. Tabela 6: Resultados de HTLV I/II em primeira análise e após a repetição em duplicada.....22
7. Tabela 7: Resultados das doações reagentes e resultados novas amostras coletadas para HTLV I/II.....23
8. Tabela 8: Resultados de VDRL para Sífilis.....24

RESUMO

Com o desenvolvimento da área de Medicina e Saúde, hoje temos conhecimentos para realizar práticas cirúrgicas antes inimagináveis. Com isso, a área de Hematologia teve que se aprimorar pra acompanhar tais avanços, incluindo a melhoria na triagem e seleção de doações e de bolsas de sangue. Neste trabalho foi realizado o levantamento do número de casos reagentes para três patologias de importância que possuem infecções transmissíveis por via hematogênica: doença de Chagas, devido ao endemismo do inseto transmissor; HTLV I/II, por ser uma patologia ainda não muito bem divulgada e que causa danos irreversíveis nos portadores; e Sífilis, por ser uma moléstia que aflige a população mundial à décadas. Foram analisadas 45578 amostras de doações num período de 13 meses, que se estendeu de agosto de 2005 a agosto de 2006, no Instituto Paranaense de Hematologia e Hemoterapia – Hemobanco, da cidade de Curitiba-PR. Os dados encontrados mostram uma ocorrência mensal de casos reagentes na triagem de 0,13% para a doença de Chagas, 0,10% para HTLV I/II e 1% para Sífilis. Com base nestes dados, conclui-se que ainda são necessárias campanhas de conscientização ao voluntariado para doação de sangue, e principalmente à doação com responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Paranaense de Hematologia e Hemoterapia – Hemobanco, e seus coordenadores por permitirem que eu utilizasse os dados para realização desta pesquisa.

Ao Setor de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná e seus docentes, por me orientarem e me guiarem durante o trabalho.

Aos meus pais, por me mostrarem o caminho.

DEDICATÓRIA

Aos meus amigos Luis Pukanski, Tomaz Takeuchi, Flávia Fernandes, Fernanda Zanatta, Yart Schultz, Valéria Göss e Ricardo Wodzynski, e todos os outros que não tiveram seu nome aqui, por sempre estarem ao meu lado nos bons e maus momentos. E principalmente a Amanda Wodzynski e Juliana Wigozz, as minhas amigas mais especiais.

1. INTRODUÇÃO

Entre as atividades médicas que permitem que hoje exista maior expectativa de vida do que existia há alguns anos, com conforto e bem estar, está a área de Hematologia e Hemoterapia, que serve de apoio para realização de cirurgias, e transfusões de sangue, tendo como base a Imunologia. Muitos dos conhecimentos adquiridos que permitem tais avanços foram obtidos através das bases teóricas desta e de outras áreas, e infelizmente, muitos outros, somente através de tentativas e erros. Com o objetivo de minimizar eventuais possíveis reações adversas das diferentes práticas médicas, atualmente estas obedecem a regras, parâmetros e procedimentos obrigatórios.

A Medicina, sendo uma especialidade das Ciências da Saúde, não é completamente auto-suficiente, pois para manter o corpo e a mente saudáveis, ou seja, para que haja a possibilidade de cura ou de melhora do quadro clínico, faz-se necessário o diagnóstico das causas das moléstias. As Ciências Biológicas, e suas especializações, em vários momentos, constituem a base de apoio para o desenvolvimento da Medicina e isto é claramente visível quando se considera o sangue.

A Imunologia é a Ciência que estuda, dentre outros, os processos de respostas celulares a patógenos e corpos estranhos ao organismo, soroterapia, vacinas, reações de sensibilidade e respectivas regulações.

Foi na área de Imunologia, que se desenvolveu o mais utilizado método laboratorial de pesquisa de antígenos e anticorpos: o chamado ELISA. ELISA procede do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (JANEWAY, 1997), que traduzido para o português significa *Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática* (ABBAS, 1995), ou seja, um conjunto específico de ligações não covalentes entre antígenos e anticorpos em uma placa, com o auxílio de enzimas, para a verificação colorimétrica das reações. Este método, diariamente aplicado em muitos laboratórios, é de execução relativamente fácil. Atualmente, com o desenvolvimento da Biotecnologia, alguns laboratórios fornecem todo o material necessário em *kits* comercialmente adquiridos, restando ao laboratório que deseja utilizá-lo, alguns outros materiais e recursos humanos com conhecimento dos fundamentos básicos de Imunologia para realizar os testes e verificar e corrigir eventualidades que possam ocorrer durante o procedimento.

Embora pareça fácil, estes procedimentos requerem uma série de cuidados, como definem portarias e legislações. Como alerta RAMOS *et al* (2001), em seu trabalho com hormônios tireoideanos: "em alguns casos ocorre a ligação não específica com reagentes dos ensaios que vão, desta forma, interferir com as medidas". Outras normatizações relacionadas à doações de sangue devem ser seguidas, como diz o Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: atualmente é proibida a remuneração a doadores de sangue, "como medida preventiva de interesse nacional" (RUIZ, 2002). Sendo assim, existem normas estabelecidas para seleção, coleta, diagnóstico e tratamento dos doadores de sangue e das bolsas de sangue coletado.

Neste trabalho, o foco principal está na área da Sorologia, ou seja, na triagem laboratorial de algumas doenças transmitidas por via hematogênica, que são obrigatoriamente testadas em bancos de sangue, para que se possa utilizá-lo com qualidade em cirurgias, transfusões de sangue, transplantes, hemoterapias em geral e procedimentos diversos.

Segundo a ANVISA, todas as amostras das doações devem ser testadas para Hepatite B e C, HIV-1 e HIV-2 (vírus da Imunodeficiência Humana), doença de Chagas, Sífilis, HTLV-1 e HTLV-2 (protovírus T-linfotrófico humano), sendo opcionais os testes de Malária e Citomegalovírus. Ou ainda como melhor especifica SAEZ-ALQUÉZAR (2007), para estabelecer um perfil sorológico, devem ser realizados dois testes de princípios diferentes para HIV-1 e -2, um teste anti-HTLV I/II, um teste para o antígeno Austrália da hepatite B (AgHBs), um teste para o anticorpo anti-hepatite B (Anti-HBc), um teste anti-HCV (pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C), um teste para Sífilis e um teste para Doença de Chagas. Todavia, estes testes são somente para triagem, e quando ocorrer casos positivos, outros exames complementares devem ser realizados, através de um ou mais testes específicos com metodologias diferenciadas para o diagnóstico confirmatório destas patologias.

Neste trabalho os estudos ficaram concentrados em apenas três: Doença de Chagas, Sífilis e o HTLV.

O principal motivo para a seleção de apenas estas três patologias é a característica tardia das manifestações clínicas que, na maior parte dos casos, só se revelam depois de semanas, meses ou até mesmo 15 ou 20 anos após o contágio.

Para a Doença de Chagas também é importante ressaltar a área de ocorrência do inseto transmissor, que é restrito às Américas (CRAIG, 1974) e a excelente adaptação do inseto à região peri-urbana, principalmente nas regiões rurais e de baixa renda (CIMERMAN, 1999).

No caso da Sífilis por ter sido uma doença controlada por muitos anos e hoje apresentar um número elevado de casos como resultado da epidemia HIV/AIDS.

Já o vírus HTLV por ser causador de uma patologia ainda não muito bem divulgada e que causa danos irreversíveis aos portadores e embora a literatura ainda seja incipiente, o mesmo não se pode dizer acerca do número de casos mundiais.

Para a descrição dos procedimentos e metodologias aplicados em triagens e diagnóstico de algumas patologias faz-se necessário o conhecimento de estruturas e de mecanismos do sistema imunológico para a melhor compreensão do princípio dos ensaios imunológicos.

A importância para a triagem sorológica em bancos de sangue é a síntese de anticorpos específicos pelos doadores contra corpos estranhos ao organismo, e/ou a presença de antígenos na corrente sanguínea, uma vez os métodos atualmente empregados para análise das amostras coletadas têm como base a pesquisa da presença de antígenos ou anticorpos nas amostras a serem analisadas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral descrever os ensaios laboratoriais utilizados atualmente para triagem e diagnóstico de patologias como Sífilis, Doença de Chagas e HTLV, em doadores voluntários de sangue do Instituto Paranaense de Hematologia e Hemoterapia – Hemobanco - da cidade de Curitiba (PR), bem como descrever alguns aspectos dos agentes causadores e dos portadores e realizar o levantamento da frequência de ocorrência de sorologias positivas para estas doenças no período de agosto de 2005 a agosto de 2006.

Objetivos específicos:

- descrever aspectos morfofisiológicos do agente causador;
- descrever aspectos sintomáticos do portador do patógeno;
- descrever as bases teóricas, metodologias, fundamentos e procedimentos laboratoriais de testes obrigatórios para um banco de sangue;
- realizar o levantamento da ocorrência de casos reagentes para HTLV I/II, Doença de Chagas e Sífilis no período de agosto de 2005 a agosto de 2006, especificamente no Hemobanco de Curitiba (PR).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. HTLV

O HTLV é um retrovírus da subfamília Oncoviridae, denominado protovírus T-linfotrópico humano 2. As manifestações clínicas, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, caracterizam-se por paraparesia espástica com sinais piramidais de evolução lenta e progressiva, graus variáveis de distúrbios esfínterianos e sensitivos e sorologia positiva para o vírus HTLV-I (CORAL, 1998). Segundo a pesquisa "Desinformação e medo ainda dominam pacientes de HTLV" publicada no site do Ministério da Saúde, grande parte das pessoas infectadas com o HTLV não desenvolve doença alguma, porém cerca de 3% dos infectados apresentam alguns sintomas.

O vírus da leucemia de células T infecta a mesma célula que o vírus da Aids (HIV) e seu desenvolvimento é gradual, o que faz com que a doença só se manifeste após vários anos. Por isso os pacientes infectados enquanto são jovens, têm maior probabilidade de desenvolver a doença no futuro. Outros sintomas descritos por portadores do vírus HTLV I são hipossensibilidade vibratória nos membros inferiores, incontinência urinária, dor lombar baixa com irradiação para as pernas, sinais de atrofia difusa dos segmentos medulares dorsais e cone medular, sinais de atrofia na região da medula toracolombar, visualizados por ressonância magnética, não se evidenciando anormalidades em outras estruturas. O vírus do HTLV também está relacionado a alveolites, síndrome de CREST*¹, síndromes vasculíticas, síndrome de Sjögren*² e outras manifestações clínicas tais como leucemia de células T humanas, dermatites infecciosas, poliartrite e uveítes (GÁLDINO, 2003).

Não se pode esquecer que durante a fase inicial, normalmente o portador não apresenta sinais clínicos de infecção. Em alguns casos os sintomas

*¹ A Síndrome de CREST (calcinose, fenómeno de Raynaud, alteração da motilidade esofágica, esclerodactilia, telangiectasias), é uma variante, mas nem sempre uma forma benigna da esclerodermia. A hipertensão pulmonar é uma das complicações possíveis (CARNEIRO, 2004).

*² A síndrome de Sjögren (SS) é doença sistêmica inflamatória crônica, de provável etiologia auto-imune, com distribuição mundial. Seu quadro clínico é responsável por considerável impacto na qualidade de vida de seus portadores (FELBERG, 2004).

aparecem cerca de um a vários anos após a infecção, segundo relatos de portadores.

O primeiro caso reportado em seres humanos foi isolado no início dos anos 1980 (SOARESA, 2003), com casos diagnosticados desde 1985 no Brasil e triagem sorológica obrigatória em hemobancos desde novembro de 1993. As regiões consideradas endêmicas são o Caribe, a África e o sudoeste do Japão. Suspeita-se que tenha sido trazido ao Brasil por intermédio de imigrantes japoneses. Os primeiros diagnósticos positivos foram notificados em 1986, em Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul.

Os meios de transmissão compreendem compartilhamento de agulhas contaminadas, transfusões de sangue, exposição ao sangue contaminado, realização de tatuagens com agulhas contaminadas, via sexual, aleitamento materno.

3.2. Sífilis

A Sífilis é uma doença sexualmente transmissível, causada pelo agente *Treponema pallidum*. Historicamente a Sífilis passou a ser conhecida na Europa no século XV, e há indicativos de que seria uma doença trazida do “Novo Mundo” por marinheiros. Segundo o site oficial do Ministério da Saúde uma vez introduzida na Europa, a doença teria se disseminado rapidamente devido a influências religiosas de controle moral e liberação sexual. No século XX, até os anos 60, estava praticamente desaparecida, tendo seu ressurgimento coincidindo com a revolução sexual nos anos de 1960-1970. Segundo o mesmo site do Ministério da Saúde brasileiro, estudos apontam que atualmente somente entre gestantes cerca de 48.000 estejam contaminadas, problema este que, quando comparado à ocorrência de casos de transmissão vertical de HIV, é alarmante, pois o vírus do HIV tem uma chance de transmissão durante a gestação de 25%, enquanto que a probabilidade de transmissão da espiroqueta causadora da sífilis é de 70 a 100%, na ausência de tratamento. Neste mesmo estudo divulgado, as estimativas apontam para 12.000 casos novos todos os anos, somente no Brasil. Segundo a revista NewsLab (2007), as estimativas apontam para cerca de 12 milhões de pessoas infectadas em todo mundo, sendo que 3 milhões destas estariam na América Latina.

Os sintomas da sífilis manifestam-se em três estágios: primária, secundária e terciária. Os sintomas da sífilis são descritos, no adulto, a curto e longo prazo.

A curto prazo, cerca de 2 a 3 semanas após a infecção, os dois primeiros estágios apresentam as características mais marcantes como feridas nos genitais, ínguas nas virilhas e posteriormente manchas pela pele e alopecia (PASSOS, 1995). Se não tratada, a doença continua a progredir no organismo silenciosamente, até o momento em que surgem complicações graves como cegueira, paralisia, doença cerebral, aneurismas, problemas cardíacos, podendo inclusive levar à morte, e se ocorrer em uma mulher gestante poderá causar aborto ou má formação fetal, como deformação óssea, cegueira, surdez, retardo mental e doenças neurológicas (VERONESI, 1991). Os sinais de sífilis para o bebê que nasce portador podem aparecer logo após o nascimento, mas na maioria dos casos, os sinais e sintomas estão presentes já nos primeiros meses de vida. (VERONESI, 1991).

O tratamento inicial para sífilis no século XV consistia de mercúrio, arsênico inorgânico e banhos sulfúricos; posteriormente, nos anos 1940, o tratamento foi substituído por penicilina obtendo até hoje ótimos resultados. A curiosidade é que este antibiótico era usado para "tratar" gripes e resfriados, mas muitos sífilíticos, que não suspeitavam ter a doença, eram curados (PASSOS, 1995). Os meios de transmissão da Sífilis são o contato sexual direto, enquadrando-a assim com uma Doença Sexualmente Transmissível (DST) de importância, pois a sua distribuição é mundial. O meio de contágio via transfusão sanguínea tende a ser extinto devido aos cuidados e testes realizados que detectam agente causal (PASSOS, 1995), e a transmissão congênita pode ocorrer em qualquer fase da gestação ou durante o parto.

Hoje em dia o diagnóstico da Sífilis é realizado por dois tipos principais de testes: os treponêmicos e os não-treponêmicos. Os treponêmicos são os testes de Hemaglutinação, ELISA, FTA-Abs (*Fluorescent Treponemic Antibody Absorption*) e o Western Blot; os não treponêmicos são o VDRL (do inglês *Veneral Disease Research Laboratory*), o USR (do inglês *Unheated Serum Reagin*), o TRUST (*Toluidini Unheated Serum Test*) e o PRP (*Rapid Plasma Reagin*).

3.3. Doença de Chagas

A doença de Chagas recebeu esta denominação devido aos estudos realizados por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em 1907, pesquisador brasileiro que descreveu o protozoário causador e como homenagem a seu amigo Oswaldo Cruz, denominou este agente de *Trypanosoma cruzi*. Chagas foi o primeiro cientista a estudar todos os estágios da doença.

A importância da triagem sorológica para esta doença em bancos de sangue no Brasil reside em sua incidência no Brasil. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), para novembro de 2007, as estimativas eram de que até 18 milhões de pessoas infectadas e cerca de 100 milhões constituindo população de risco. A área de ocorrência é extensa; inicialmente restringia-se à região neotropical porém, hoje em dia, segundo a OMS, distribui-se por 18 países americanos, e com o crescimento populacional, a expansão dos ambientes urbanos e o trânsito de pessoas pelo mundo, acredita-se numa extensão que vai desde o norte do México até a região noroeste da Argentina e norte no Chile. Ainda segundo a OMS, dentre os indivíduos infectados, cerca de 20.000 morrem todos os anos.

A infecção pelo *T. cruzi* se dá através de um ciclo biológico bastante extenso, que inicia com um hospedeiro intermediário conhecido popularmente por barbeiro, que é propriamente o vetor da doença de Chagas, um inseto da ordem Hemiptera. Segundo VINHAES (2000), das mais de 42 espécies de triatomíneos até então catalogados no Brasil, trinta estavam presentes no ambiente domiciliar, mas não mais do que cinco tinham participação direta na transmissão domiciliar da doença: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*. Segundo BARNES (1990), na ordem Hemiptera, os barbeiros especificamente, são hematófagos em todas as suas fases de vida, indiferentemente de macho ou fêmea. Até alguns anos atrás o habitat do barbeiro era o meio ambiente silvestre, porém com a colonização e crescimento populacional, que destruíram seu habitat natural, o barbeiro adaptou-se muito bem às regiões domiciliar e peridomiciliar, instalando-se nas frestas das casas de madeira e de "pau-a-pique" (comuns nas regiões mais pobres e de zona rural), que lhe proporcionam abrigo durante o dia e alimento de fácil acesso durante a noite. Sabe-se que o *T. cruzi* não causa efeitos no inseto vetor (BARNES, 1990).

Existem várias formas evolutivas do *T. cruzi* que, em diferentes momentos e hospedeiros, têm sua morfologia modificada. Nos insetos triatomídeos existe a

forma epimastigota, alongada com uma pequena membrana ondulante lateralmente disposta encontrada na porção média do intestino; e a tripomastigota metacíclica, de aspecto alongado com flagelo que forma uma extensa membrana ondulante e torna-se livre na porção anterior. Esta é a forma característica infectante de *T. cruzi* que é encontrada na porção posterior do intestino e nas fezes do inseto (NEVES, 1995). A forma esferomastigota (descrita somente por NEVES, 1995), é arredondada, representando uma transição entre a forma amastigota e as formas flageladas que são encontradas no estômago e intestino anterior.

A forma tripomastigota metacíclica é aquela que entra em contato direto com a pele da vítima picada e consegue dar continuidade ao ciclo no interior do corpo humano. Além desta forma, no homem ainda ocorre a forma amastigota, que é a forma encontrada na musculatura cardíaca, esôfago e cólon intestinal, causando propriamente a doença de Chagas; e a forma tripomastigota sanguínea, que é a forma comumente encontrada no sangue e de fácil diagnóstico.

O hospedeiro definitivo neste ciclo é o homem e a infecção ocorre quando, alguns minutos após a picada, o inseto barbeiro contaminado defeca sobre a pele da pessoa e pela abertura escarificada do local da picada a forma infectante tripomastigota metacíclica adentra o organismo. Uma vez no interior do corpo do hospedeiro, os macrófagos, numa tentativa de proteger o organismo contra agentes estranhos, englobam os protozoários, e estes se transformam em amastigotas e se multiplicam até o rompimento do macrófago, caindo assim na corrente sanguínea agora sob a forma de tripomastigota. Assim, atingem o tecido, penetram na célula se transformando novamente em amastigotas e se multiplicam por divisão binária, formando um aglomerado de formas amastigotas chamado de "ninho de Gaspar Vianna" (CAMPOS, 1994).

O fechamento do ciclo ocorre quando um inseto se contamina durante a picada com o tripomastigota presente no sangue periférico do hospedeiro definitivo; no processo de alimentação e digestão no inseto, a forma ingerida se transforma em epimastigota no intestino médio, seguido de divisão binária. Na porção posterior do intestino os epimastigotas se transformam em tripomastigotas novamente, que são as formas presentes de fato nas fezes do inseto, fechando então o ciclo, com a picada do inseto (NEVES, 1995).

A transmissão da doença de Chagas não ocorre somente através do inseto vetor, mas pode também se dar através de transfusões sanguíneas e transplante de

órgãos, transmissão congênita, manipulação de sangue contaminado, coleta de mamíferos silvestres, os quais também são fonte de alimento para o barbeiro e até mesmo pela ingestão acidental do inseto, como foi divulgado na mídia há alguns anos, onde o inseto estava presente em caldo de cana e de açaí.

Normalmente quando o protozoário entra através da mucosa ocular (fato bastante freqüente) ocorre uma inflamação local conhecida como sinal de Romaña caracterizada por grande edema que regride naturalmente após alguns dias. Quando o protozoário entra através da picada do triatomídeo, forma-se uma pequena pápula na pele, que não dói e dificilmente é percebida. A patogenia tem como fundamento a multiplicação das formas amastigostas no tecido infectado e os sintomas descritos para a patologia são divididos em fase aguda e fase crônica.

A fase aguda pode ou não apresentar sintomas, e quando isso ocorre estes compreendem febre de intensidade variável, mal-estar (CIMERMAN, 1999), linfadenopatia, anorexia, miocardia e hepatoesplenomegalia (VERONESI, 1991). A fase crônica aparece depois de muitos anos e pode ser diagnosticada pelo teste de ELISA e por pequenas alterações ao raio-X. A doença acomete principalmente a musculatura cardíaca, mas pode também ocorrer no trato digestório.

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas é realizado através do método de esfregaço de sangue, pouco invasivo, no qual uma gota do sangue do paciente é dispensada entre lâmina e lamínula, para visualização ao microscópio óptico; eventualmente são utilizados corantes para melhor visualização na pesquisa das formas tripomastigotas do protozoário. Na ausência das formas circulantes o paciente é diagnosticado como falso negativo. Ainda existem outras formas de diagnosticar a presença do parasita, tais como biópsia do tecido infectado; cultura de células sangüíneas ou de tecido, que leva dias até que o desenvolvimento dos protozoários possa ser detectado; inoculação em cobaias, que também é um processo lento; xenodiagnóstico, um método bastante antigo que consiste em deixar que triatomíneos "limpos" criados em laboratório piquem o suspeito da doença e observar o desenvolvimento dos protozoários no inseto (NEVES, 1995). O maior problema é que o desenvolvimento no inseto leva de 30 a 40 dias.

E por fim os diversos testes imunológicos: Guerreiro-Machado (reação de fixação do complemento), reação de imonofluorescência indireta (IFI), Ensaio imunoenzimático (ELISA), hemaglutinação indireta (HAI), e moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), entre outros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Atualmente a legislação vigente exige, dos hemobancos, a realização de vários exames específicos nas amostras coletadas para doações, de acordo com as definições da ANVISA. Porém os testes realizados são apenas de triagem, de modo que mediante resultados positivos exames complementares devem ser realizados, mas para cada patologia existe um ou mais testes específicos com metodologias diferenciadas para o diagnóstico confirmatório.

Este trabalho teve por objetivos estudar três patologias importantes em hemobanco: doença de Chagas, Sífilis e HTLV.

Quando os potenciais doadores se apresentam ao hemobanco, são realizados os exames sorológicos das amostras coletadas e os resultados diferentes de negativo são analisados com mais cautela. As amostras são definidas como reagentes (positivas ou indeterminadas) ou não-reagentes (negativas) pelo valor de ponto de corte determinado em um espectrofotômetro. Desta maneira, aquelas amostras que apresentam valores inferiores ao valor de corte são consideradas como não-reagentes, e as que apresentam valores muito próximos, iguais ou superiores ao valor de corte são repetidas em duplicata. A partir do resultado da repetição é dado o *status* final da doação, que pode ser não-reagente ou reagente.

O procedimento de análise dos resultados foi realizado com a observação direta das planilhas, no registro impresso que é arquivado. Este arquivo foi consultado e todas as amostras foram analisadas, uma a uma. Durante o período de abrangência, que foi de 13 meses, todas as amostras que apresentaram reatividade para os marcadores da doença de Chagas, de HTLV I e II e de Sífilis foram observados e revisados, e os resultados das repetições foram rastreados nas próprias planilhas, analisados, comparados com o primeiro resultado da triagem e conferidos pelo sistema informatizado da Instituição. Em alguns casos foram observadas também as novas amostras coletadas.

Os números de doação ou qualquer outro tipo de identificação de amostra ou de doador foram excluídos deste trabalho, primeiro pelo veto imposto pela ANVISA na RDC nº153, que diz que "o sigilo das informações prestadas pelo doador antes, durante e depois do processo de doação de sangue deve ser absolutamente preservado". Outro motivo pelo qual as identificações foram excluídas foi para preservar o anonimato dos doadores e o sigilo de suas informações.

4.1. Descrição do método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA) para auxílio no diagnóstico e triagem de portadores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas.

O Ensaio Imunoenzimático para detecção de Anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi* em soro ou plasma humano foi realizado no Instituto Paranaense de Hematologia e Hemoterapia (Hemobanco) com o *kit* Biozima Chagas, produzido por Polychaco S.A.I.C. / Laboratório Lemos de Buenos Aires, Argentina.

Este ensaio é considerado um método indireto, heterogêneo e não competitivo, que pesquisa os anticorpos contra *T. cruzi* em amostras de soro ou plasma humano, e não o agente causal ou seus produtos .

O procedimento realizado segue estritamente uma seqüência que se inicia com a obtenção de uma amostra de soro do doador. Após a separação, o soro é adicionado a uma placa de poliestireno previamente sensibilizada com antígenos purificados de *T. cruzi*. Em cada placa podem-se testar 92 amostras, utilizando-se dois controles negativos e um controle positivo e, ainda no caso específico do Hemobanco de Curitiba (PR), é utilizado mais um controle positivo, somando um total de quatro controles. O último controle positivo é uma amostra devidamente diagnosticada como positiva, que é adicionada no último poço disponível, para fins de controle interno. Os controles positivos do *kit* são uma amostra fornecida pelo fabricante, consistindo de uma diluição do soro reagente, de baixo título, com estabilizadores protéicos, pronto para uso. Estes controles são adicionados à placa após terem sido adicionadas todas as amostras a serem testadas.

Para a interpretação dos resultados, são utilizados os controles como padrão de comparação. O controle negativo é incolor ou pode apresentar uma coloração celeste suave. O controle positivo, que é de baixo título, possui coloração celeste diferente do controle negativo. As amostras incolores ou com coloração celeste suave, semelhante ao controle negativo, são consideradas presumivelmente não reativas para anticorpos contra *T. cruzi*. As amostras que evidenciam uma coloração azul ou celeste claramente distinguível do controle negativo são consideradas presumivelmente reativas para anticorpos contra *T. cruzi*. Com o emprego de solução de parada e um espectrofotômetro para a leitura das amostras, as definições de amostras positivas e negativas são dadas por um valor de corte ou limite de decisão - também denominado de cut-off ou ponto de corte - que é

calculado somando-se a densidade óptica (D.O) média do controle negativo + 0.100

Com este cálculo, a amostra será considerada presumivelmente não reativa para anticorpos de *T. cruzi* se seu valor de D.O.(densidade óptica) for menor que o valor limite do *cut-off* e uma amostra será considerada presumivelmente reativa para *T. cruzi* se seu valor de D.O. for igual ou maior que o limite do *cut-off*.

Para que esses valores de D.O. e *cut-off* sejam aceitos, ou seja, para que o teste tenha critério de aceitabilidade, devem ser preenchidos os seguintes critérios:

- a D.O.média do controle negativo deve ser menor que 250nm;
- a D.O. média do controle positivo deve ser maior ou igual ao *cut-off*.

Se estas condições não forem observadas, os testes deverão ser repetidos para descartar uma possível falha operacional ou funcionamento inadequado do *kit*. Antes da emissão dos resultados definitivos, no caso de uma amostra positiva, a mesma deve ser testada novamente para confirmação. Se o resultado for negativo no segundo teste, a amostra é considerada não reativa. Se a amostra reproduzir o resultado positivo, recomenda-se nova coleta, repetição do teste de ELISA e ainda a realização de um outro exame confirmatório.

4.2. Descrição do método de Enzima Imuno Ensaio (ELISA) qualitativo para detecção de anticorpos contra o vírus T-linfotrópico, tipos I e II (HTLV – I e HTLV – II) em soro ou plasma humano.

O Ensaio Imunoenzimático qualitativo para detecção de anticorpos contra o vírus T-linfotrópico, tipos I e II (HTLV – I e HTLV – II) em soro ou plasma humano, é realizado no Hemobanco de Curitiba (PR), com o *kit* Murex HTLV I + II, produzido por Murex Biotech Limited do Reino Unido.

O princípio do teste consiste na pesquisa de anticorpos na amostra, estando as microcavidades revestidas com peptídeos sintéticos representando regiões imunodominantes das proteínas do envelope do HTLV-I e HTLV-II e uma proteína transmembrânica recombinante do HTLV-II (antígenos). O conjugado é uma mistura dos mesmos peptídeos de antígenos e da proteína transmembrânica recombinante do HTLV-I, ambos marcados com peroxidase de rábano.

As amostras de teste e soros controles são incubadas nas cavidades, e anticorpos contra HTLV-I ou contra HTLV-II presentes na amostra ou soro controle, ligam-se aos antígenos das microcavidades. Com a adição do conjugado, este se

liga a qualquer anticorpo específico já ligado aos antígenos nas cavidades, formando assim um complexo antígeno-anticorpo-antígeno. A amostra que não contém anticorpos específicos não permite a formação do complexo.

Cada placa deve ser considerada separadamente ao calcular e interpretar os resultados do teste. Para a determinação do valor de *cut-off* deve-se calcular a média dos controles negativos. Se uma das cavidades apresentar valor de absorbância 0,15nm acima da média de todas as outras três, esta deve ser descartado e nova média deve ser calculada a partir das duas duplicadas remanescentes.

O valor de corte para determinação das amostras reagentes e não-reagentes deve ser calculado adicionando-se 0,2nm à média das replicatas do controle negativo.

A aceitação do teste como confiável exige que sejam preenchidos os seguintes critérios:

- a absorbância do controle negativo não deve ultrapassar o valor de 0,2nm;
- a absorbância do controle positivo deve ser maior que 0,8nm acima da absorbância média do controle negativo;

Para a interpretação dos resultados, utiliza-se os controles como padrão para comparação. O controle negativo apresenta uma coloração rosa devido à adição do substrato. O controle positivo possui coloração alaranjada depois da adição da solução de parada. Visualmente, as amostras de cor rosa, semelhantes à do controle negativo são consideradas não reagentes para anticorpos contra HTLV I-II e as alaranjadas são consideradas reagentes. As amostras reagentes em primeiro teste, no caso específico do Hemobanco, são repetidas em duplicata. Se elas reproduzirem o resultado positivo, é solicitada do doador uma nova amostra para ser retestada. Se ainda sim o resultado for positivo, aconselha-se a realização de um outro tipo de teste confirmatório, como por exemplo, Western Blot.

4.3. Descrição do teste de floculação em lâmina para triagem de Sífilis

No caso específico do Hemobanco, o teste utilizado para detecção de anticorpos contra o agente causal da sífilis (*Treponema pallidum*) é o Immutrep USR Antigen, fabricado por Omega Diagnostics Ltd do Reino Unido.

Este teste é baseado no método de floculação para detecção qualitativa ou semi-qualitativa de anticorpos no soro ou plasma. O Immunotrep USR é uma

modificação do Immuntrep-VDRL Antigen do qual foi obtido um reativo estabilizado e pronto para uso. Os reagentes do *kit* contêm material de origem humana confirmadamente negativo para anticorpos contra HCV, HIV I e HIV II e também HbsAg. Quando se mistura o antígeno com as reaginas contidas na amostra, as partículas produzirão uma floculação visível ao microscópio. A ausência de floculação indica um resultado negativo.

O teste é realizado em uma lâmina de vidro esmerilhada que possui 12 cavidades largas, de cerca 2cm de diâmetro, e são bastante rasas (cerca de 0,2-0,3mm de profundidade). O procedimento de análise deve ser realizado com amostras de soro ou plasma frescos, não hemolisados, contaminados ou lipêmicos, pois estes podem interferir no resultado. As amostras não devem ser diluídas. Os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8°C, mas no momento da realização do teste devem estar à temperatura ambiente (20-25°C) e devem ser agitados antes de serem utilizados, mas sem produzir espuma. O teste qualitativo segue o seguinte procedimento:

- pipetar 50µl de soro na cavidade da placa;
- adicionar 22µl de antígeno homogeneizado à cada amostra;
- agitar a placa durante 4 minutos a 180 rotações por minuto;
- imediatamente após os 4 minutos, observar o resultado ao microscópio com aumento de 100x;

Para interpretação dos resultados, o *kit* fornece um controle positivo com título de cerca de 1/4 que deve ser utilizado como parâmetro de comparação. Caso o controle positivo não esteja dentro da especificação ou dos níveis de controle, toda a bateria de teste deve ser repetida. Um resultado é considerado positivo se na observação ao microscópio a amostra apresentar grumos (floculação). Não apresentando, ela é considerada não reativa. Caso a amostra apresente floculação, o teste deve ser repetido, e reproduzindo, deve ser feita a diluição (titulação), como descreve o procedimento abaixo:

O teste semi-quantitativo: preparar uma série de diluições do soro a ser testado (1/2, 1/4, 1/8, 1/12, 1/32, 1/64);

- pipetar 50µl de amostra de diferentes diluições em diferentes poços na placa;
- pipetar 22µl de antígeno homogeneizado a estas diluições;
- agitar a placa durante 4 minutos a 180 rotações por minuto;

- imediatamente após os 4 minutos, observar o resultado ao microscópio com aumento de 100x;
- o título é a última diluição a produzir um resultado positivo (com grumos).

Alguns testes podem apresentar resultado falso-positivo quando o doador é portador de outras infecções além da Sífilis. Se o teste apresentar um resultado positivo, recomenda-se a realização de testes confirmatórios com uma nova amostra.

5. RESULTADOS

O período de abrangência da pesquisa foi de agosto de 2005 a agosto de 2006, totalizando assim 13 meses, num total de 52486 voluntários; foram coletadas 44922 doações e 45578 amostras foram testadas. Os números de voluntários e de coletas não são os mesmos, pois muitos dos potenciais doadores não passam pela triagem clínica, e o número de sorologias realizadas não é igual ao número de coletas realizadas devido aos procedimentos internos do laboratório.

Não só na triagem clínica, mas inclusive por outros motivos, como não portar documentação adequada, muitos voluntários acabam por não poderem doar sangue e conseqüentemente não têm amostra coletada para teste, e estão assim excluídos do levantamento.

A Tabela 1 mostra a diferença entre o número de voluntários e o número de amostras coletadas, e a partir destes dados, o percentual de doadores que não realiza a doação. A Tabela 2 mostra o número de coletas realizadas e o número de testes realizados.

Tabela 1: Número de voluntários, amostras coletadas e percentagem de doadores inaptos na triagem por mês/ano.

Ano	Mês	Número de doadores voluntários	Número de coletas realizadas	% de inaptos na doação
2005	Agosto	5248	4362	16,88
	Setembro	3788	3355	11,43
	Outubro	3294	2794	15,18
	Novembro	3569	3250	8,94
	Dezembro	4281	3846	10,16
2006	Janeiro	3984	3594	9,79
	Fevereiro	3162	2674	15,43
	Março	4467	4095	8,33
	Abril	4056	3298	18,69
	Maiο	3932	3271	16,81
	Junho	3962	3303	16,63
	Julho	4269	3693	13,49
	Agosto	4474	3387	24,30
Total		52486	44922	14,41

Analisando estes dados pode-se observar que em média 14,41% dos doadores não realizam a doação de sangue por inaptidão na triagem.

Tabela 2: Número de coletas realizadas e número de sorologias realizadas por mês/ano.

Ano	Mês	Número de coletas realizadas	Número de sorologias realizadas
2005	Agosto	4362	4405
	Setembro	3355	3335
	Outubro	2794	2890
	Novembro	3250	3096
	Dezembro	3846	3826
2006	Janeiro	3594	3636
	Fevereiro	2674	2814
	Março	4095	3949
	Abril	3298	3451
	Maiο	3271	3202
	Junho	3303	3371
	Julho	3693	3726
	Agosto	3387	3877
Total		44922	45578

Analisando os dados da Tabela 2 é perceptível a diferença entre o número de coletas e o número de testes realizados. Isso se deve aos procedimentos internos do laboratório, muitas vezes impedem o término das análises e a liberação do resultado da amostra em um dia, às vezes em dois dias. Para facilitar o levantamento dos dados, foi usado como base o número de sorologias realizadas por período de tempo.

Nos meses de agosto de 2005 a 2006 foram coletadas 45578 doações que foram testadas para HTLV I/II, doença de Chagas e Sífilis, entre outras patologias, totalizando 100% da amostragem pesquisada. No ano de 2005, o mês de agosto teve uma parcial de 9,66% do total das amostras pesquisadas, setembro 7,32%, outubro 6,34%, novembro 6,79% e dezembro 8,39%. As amostras do ano de 2006 tiveram percentuais de 7,98% em janeiro, 6,17% em fevereiro, 8,66% em março 7,57% em abril, 7,03% em maio, 7,40% em junho, 8,17% em julho e 8,51% em

agosto. Do total de amostras averiguadas, 17552 (38,51%) foram testadas em 2005 e 28026 (61,49%) em 2006, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Número de sorologias realizadas e seu respectivo percentual mensal / anual do total de amostras pesquisadas.

Ano	Mês	Número de sorologias realizadas	% das amostras testadas por mês	% das amostras testadas por ano
2005	Agosto	4405	9,66	38,51
	Setembro	3335	7,32	
	Outubro	2890	6,34	
	Novembro	3096	6,79	
	Dezembro	3826	8,39	
2006	Janeiro	3636	7,98	61,49
	Fevereiro	2814	6,17	
	Março	3949	8,66	
	Abril	3451	7,57	
	Mai	3202	7,03	
	Junho	3371	7,40	
	Julho	3726	8,17	
	Agosto	3877	8,51	
Total		45578	100,00	100,00

Estes resultados permitem concluir que há uma certa estabilidade no volume de amostras coletadas ao longo dos anos.

5.1. Análise da ocorrência de doença de Chagas

Do total de 45578 amostras averiguadas, no caso da doença de Chagas, 260 doações (0,57%) tiveram resultado diferente de negativo na triagem sorológica e foram re-testadas para o marcador. Destas, 201 (77,31% das amostras reagentes em primeira análise) apresentaram na repetição em duplicata resultado não reagente, 33 (12,69%) resultado indeterminado e 26 (10,00%) se mostraram positivas, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de doença de Chagas em primeira análise e após a repetição em duplicata.

Ano	Mês	Número de sorologias realizadas	Número de casos reagentes em primeira análise	Resultados obtidos após a repetição em duplicata		
				Número de resultados negativos	Número de indeterminado	Número de positivos
2005	Agosto	4405	31	27	2	2
	Setembro	3335	22	21	0	1
	Outubro	2890	37	34	3	0
	Novembro	3096	20	16	0	4
	Dezembro	3826	15	9	2	4
2006	Janeiro	3636	28	27	1	0
	Fevereiro	2814	9	5	0	4
	Março	3949	9	6	3	0
	Abril	3451	8	4	3	1
	Maiο	3202	3	1	2	0
	Junho	3371	7	6	1	0
	Julho	3726	20	13	3	4
	Agosto	3877	51	32	13	6
Total		45578	260	201	33	26

Até o início do ano de 2007, para o caso da Doença de Chagas, após a repetição em duplicata da primeira amostra coletada, as amostras definidas como reagentes (indeterminadas ou positivas), a rotina do Hemobanco tinha como procedimento, convocar o doador para coletar uma nova amostra visando a confirmação dos resultados. Porém das 59 amostras que apresentaram tais resultados, até a data de 03 de dezembro de 2007, apenas 34 (57,63%) tiveram realmente uma nova amostra coletada e um doador trouxe à Instituição um laudo com resultado realizado em outro laboratório.

Destas novas amostras, 24 confirmaram resultado anterior, ou seja, 5 repetindo o resultado positivo e 19 repetindo o resultado indeterminado. Apenas 7 amostras negativaram, sendo 1 de resultado positivo e 6 de resultado anterior indeterminado. E as três amostras restantes, que haviam apresentado resultado indeterminado, com a nova análise se mostraram positivas para doença de Chagas, conforme indicado na Tabela 5. Para as novas amostras definidas como negativas

presume-se que no momento da doação, ou em algum momento antes da doação, tenha ocorrido algum tipo de contaminação, tais como ingestão de alimentos gordurosos, uso de alguns medicamentos, ou até mesmo partículas de poeira presentes no ar ou na pele do doador, entre outros. As diversas possibilidades de contaminação em qualquer momento durante o processo em que a amostra pode estar exposta, podem alterar e/ou interferir nas ligações específicas das moléculas no teste.

Tabela 5: Resultados das doações reagentes e resultados de novas amostras coletadas para doença de Chagas.

Resultado da primeira amostra coletada	Resultado da nova amostra	Número de amostras
Positivo	Positivo	5
	Negativo	1
	Indeterminado	0
Indeterminado	Positivo	3
	Negativo	6
	Indeterminado	19
	Resultado externo negativo*	1
Total		35

*Resultado de outro laboratório trazido pelo doador.

5.2. Análise da ocorrência de HTLV I/II

Do total de 45578 amostras averiguadas, para o caso de HTLV I/II, 143 doações (0,31%) tiveram resultado diferente de negativo na triagem sorológica, e destas, 99 (69,23% das amostras reagentes em primeira análise) apresentaram na repetição em duplicata resultado não reagente, 16 (11,19%) resultado indeterminado e 28 (19,58%) se mostraram positivas, conforma indicado na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados de HTLV I/II em primeira análise e após a repetição em duplicada.

Ano	Mês	Número de sorologias realizadas	Número de casos reagentes em primeira análise	Resultados obtidos após a repetição em duplicata		
				Número de resultados negativos	Número de indeterminados	Número de positivos
2005	Agosto	4405	21	19	1	1
	Setembro	3335	8	3	1	4
	Outubro	2890	12	10	0	2
	Novembro	3096	12	10	1	1
	Dezembro	3826	10	5	3	2
2006	Janeiro	3636	8	6	0	2
	Fevereiro	2814	11	7	3	1
	Março	3949	20	10	4	6
	Abril	3451	10	9	1	0
	Maio	3202	10	7	2	1
	Junho	3371	6	3	0	3
	Julho	3726	11	9	0	2
	Agosto	3877	4	1	0	3
Total		45578	143	99	16	28

Quando as amostras apresentam resultado reagente em primeira amostra coletada para HTLV I/II (indeterminadas ou positivas) o procedimento rotineiro no Hemobanco é de convocar o doador para nova coleta visando a confirmação dos resultados. Das 99 amostras com resultados positivos, até a data de 03 de dezembro de 2007, somente 35 (35,35%) tiveram uma nova amostra coletada e uma doação teve um resultado realizado em outro laboratório para confirmação do resultado.

Destas novas amostras, 19 confirmaram resultado anterior, sendo 12 repetindo o resultado positivo e 7 repetindo o resultado indeterminado. Quinze amostras negativaram, sendo 6 de resultado positivo, 6 de resultado anterior indeterminado e 3 de confirmatório por Immunoblot (uma amostra que tinha resultado indeterminado) e Western Blot (2 amostras que tinham resultados positivos). Uma das amostras de resultado indeterminado foi constatada como positiva e uma

amostra que tinha status de positiva, com a nova amostra ficou como resultado indeterminado para HTLV I/II, conforme mostra a Tabela 7. Para as novas amostras definidas como negativas presume-se que no momento da doação, tenha ocorrido algum tipo de contaminação.

Tabela 7: Resultados das doações reagentes e resultados de novas amostras coletadas para HTLV I/II.

Resultado da primeira amostra coletada	Resultado da nova amostra	Número de amostras
Positivo	Positivo	12
	Negativo	6
	Indeterminado	1
Indeterminado	Positivo	1
	Negativo	6
	Indeterminado	7
	Resultado externo negativo*	3
Total		36

*Resultado de Western Blot e Immunblot realizado em outros laboratórios.

5.3. Análise da ocorrência de Sífilis

No caso específico da triagem sorológica para Sífilis, as amostras que têm resultado positivo em primeira análise, são repetidas no mesmo momento e é feita ainda titulação da amostra, para definir semi-quantitativamente a positividade da amostra. Do total de amostras analisadas, 240 tiveram resultados reagentes, como mostra a Tabela 8, variando na titulação de 1:1 até 1:128.

Tabela 8: Resultados de VDRL para Sífilis.

Ano	Mês	Número de sorologias realizadas	Número de casos positivos para VDRL
2005	Agosto	4405	30
	Setembro	3335	15
	Outubro	2890	17
	Novembro	3096	21
	Dezembro	3826	30
2006	Janeiro	3636	17
	Fevereiro	2814	14
	Março	3949	20
	Abril	3451	20
	Maio	3202	12
	Junho	3371	17
	Julho	3726	12
	Agosto	3877	15
Total		45578	240

6. DISCUSSÃO

Com base nos dados apresentados na Tabela 3 pode-se perceber que o número de doações realizadas ao longo dos anos tem uma certa estabilidade. E não poderia ser diferente em função da necessidade contínua de sangue nos Hemobancos para atender à demanda crescente por este elemento vital. Todavia, há a necessidade da conscientização da população sobre a importância da doação de sangue e de políticas governamentais eficazes de estimulação ao voluntariado.

Os resultados de ensaios imunoenzimáticos realizados para triagem sorológica, muitas vezes apresentam resultados falso-positivos ou falso-negativos; por esse motivo, recomenda-se que para os casos de amostras reagentes em primeira análise seja repetido o ensaio em duplicata e observados os valores de *cut-off* mostrados. A reprodutibilidade das amostras é um parâmetro que deve ser cuidadosamente observado, mesmo para identificar problemas de procedimento.

De acordo com dados internos do Hemobanco, onde se sabe que em média 4% das doações realizadas todo mês apresentam sorologia positiva para alguma das patologias testadas e comparando com os resultados aqui pesquisados, pode-se concluir que a ocorrência de casos reagentes, após nova análise da mesma amostra coletada, para doença de Chagas representa aproximadamente 0,13% das doações mensais reagentes. Para HTLV I/II a ocorrência de casos representa aproximadamente 0,10% e para Sífilis a ocorrência representa aproximadamente 1% das doações mensais. As amostras que tem resultados reagentes após a repetição em duplicata têm os hemocomponentes descartados por medida de segurança, assim como aqueles que apresentam resultados negativos, mas com valores de *cut-off* ligeiramente mais altos.

Resultados de ELISA não são considerados definitivos, ainda mais em se tratando de triagem sorológica. Devido ao grande volume de testes realizados e mesmo levando em consideração a alta especificidade e sensibilidade dos testes disponíveis atualmente, não se pode diagnosticar uma patologia somente por estas análises. Considerações clínicas e outros testes confirmatórios são recomendados.

A respeito do número de novas amostras, o ideal seria que todas as doações tivessem uma nova análise de uma nova amostra, pois muitas vezes o que acontece é a presença de algum contaminante ou interferente, tais como a ingestão de alimentos gordurosos, que podem alterar o pH e às vezes a conformação das moléculas que participam da reação; hemácias hemolisadas; uso de alguns

medicamentos; partículas de poeira ou de outras substâncias, que podem estar presentes no ar, na pele do doador ou no material indevidamente esterilizado utilizados durante o processamento da amostra; entre outros, todavia, o retorno do doador à Instituição para coleta de uma nova amostra é um fato que depende do interesse pessoal do doador, o que muitas vezes não acontece ou o prazo de retorno é muito longo, o que explica muitos resultados sem confirmação.

No que se refere ao número de coletas vale ressaltar que os resultados analisados levaram em conta a data de realização dos testes sorológicos, o que facilitou a coleta dos dados. Porém, o uso desta metodologia implicou numa disparidade na contabilização dos dados no que diz respeito ao número de casos em relação ao número de coletas usando como subgrupos os meses dos anos investigados, pois a partir da contagem das amostras, principalmente de final e de começo de mês, estas muitas vezes eram computadas nas classes de meses diferentes. Por exemplo, uma amostra de doação do último dia de um mês, acabava por entrar na contagem como sendo uma amostra do primeiro dia do mês seguinte.

Isso aconteceu devido ao procedimento laboratorial de preparação das amostras, uma vez que a amostra coletada não é imediatamente processada. Os procedimentos recomendados para separação do soro e dos elementos figurados incluem um tempo de descanso das amostras antes mesmo de serem centrifugadas, permitindo a formação do coágulo, uma vez que os tubos onde são depositadas as amostras não possuem anticoagulante. Desta maneira, há uma maior garantia de que as amostras estarão com a menor quantidade possível de interferentes, pois com a retração do coágulo as substâncias mais pesadas presentes no sangue total serão "retidas" no emaranhado formado pela própria coagulação.

Outro motivo para a demora na realização dos testes é o uso de equipamentos com sistema simultaneidade restrita, em que os vários testes são realizados por bateria. Logo, para formação da bateria é necessário que as amostras sejam acumuladas. Na verdade, este sistema é mais eficaz em nível de triagem sorológica devido ao volume de amostras que é realizado, pois assim é possível fazer uma quantidade maior de testes em menos tempo.

Devido a estes e outros motivos, foi então realizada a contagem das amostras somente pela data de realização dos ensaios com as amostras. Existe um

sistema de conferência implantado no Hemobanco que garante que todas as amostras coletadas tenham a sorologia realizada.

A agilidade no processo assegura que os resultados sejam mais rapidamente liberados, o que é extremamente necessário em se tratando de banco de sangue, pois há toda uma demanda de hemocomponentes que deve ser suprida.

O número de voluntários para doação não coincide com o número de coletas realizadas em função de alguns critérios de seleção, estabelecidos na RDC nº. 153 (BRASIL, 2004), que impedem a doação. Estas medidas são tomadas para evitar riscos tanto aos receptores de hemocomponentes, como aos próprios doadores e aos funcionários do banco de sangue. Estas medidas ajudam a garantir a qualidade dos hemocomponentes produzidos, pois são de extrema importância para quem os recebe.

Fatores como anemia, realização de tatuagens e/ou cirurgias, uso de alguns medicamentos, peso abaixo dos 50 kg, idade abaixo de 18 ou acima de 65 anos, praticas sexuais consideradas de risco, frequência de doações acima de 3 meses para mulheres e 2 meses para homens, histórico de algumas doenças (como doenças hematológicas, cardíacas, renais, pulmonares, hepáticas, auto-imunes, diabetes, hipertireoidismo, entre outras), pulso anormal, pressão arterial alterada, gravidez, evidência de alcoolismo ou suspeita de uso de drogas, entre outros, são critérios que não permitem que a doação seja realizada. Desta maneira, o doador entra para o registro de voluntários, mas não tem seu sangue coletado nem mesmo para análises sorológicas.

Em 0,57% dos casos potencialmente reagentes na triagem para Doença de Chagas, foram incluídas também aquelas repetições devido a erros de procedimento. Desta forma, uma percentagem de 77,31% de amostras falso-positivas na triagem, não é um fato alarmante. Há também que se levar em consideração eventuais problemas com o *kit* utilizado, com os materiais de laboratório e com falha humana, dentre outros. A partir disso, as amostras que foram determinadas como reagentes na segunda análise, teriam que apresentar reprodutibilidade no caso de coleta de nova amostra. Este dado pode ser verificado na Tabela 5, em que dos 35 casos reagentes que tiveram nova amostra, 77,14% reproduziram o resultado nos testes de ELISA.

Em 0,31% de coletas potencialmente reagentes na triagem para HTLV, os resultados seguem o mesmo parâmetro que a avaliação para doença de Chagas;

foram incluídas também aquelas repetições devido a erros de procedimento. Neste caso obteve-se 69,23% de amostras falso-positivas na triagem. Observando a Tabela 7, verifica-se uma reprodutibilidade de 55,55%.

Para HTLV é recomendada a realização do Western Blot e do Immunoblotting. Para doença de Chagas são também utilizados o teste de Imunofluorescência indireta e o teste de esfregaço sanguíneo. Porém este último pode apresentar resultados falso-negativos, pois se presentes em pequeno número na circulação, os parasitos podem não ser detectados no esfregaço sanguíneo.

Analisando os resultados para as amostras positivas para Sífilis, por exemplo, recomenda-se a análise por outras metodologias. O método mais comumente utilizado é o teste de Imunofluorescência indireta, conhecido também por FTA-Abs do inglês *Fluorescent Treponemic Antibody Absorption*, no qual pesquisa-se anticorpos IgM e IgG contra a espiroqueta no soro do doador. Outro teste bastante utilizado em conjunto é o de floculação.

Em trabalho publicado por MENDES (1996), realizado na cidade de Ribeirão Preto (SP) foram analisadas 16127 amostras por VDRL e confirmadas por FTA-Abs, resultando, dentre outras conclusões, em 9,0% de falso-positivos por VDRL na triagem.

Assim, projetando este percentual, e fazendo uma comparação, estima-se que das 240 amostras reagentes para VDRL, aproximadamente 20-22 apresentem resultados falso-positivos se testados pelo método FTA-Abs.

No momento de entrega dos resultados de triagem do Hemobanco, os profissionais da área médica orientam que o doador realize o(s) teste(s) com metodologias mais específicas para confirmação do resultado, como no caso das doações reagentes para HTLV, em que os doadores retornaram à Instituição com resultados de Immunoblot e Western Blot.

No caso do exame externo trazido pelo doador para a doença de Chagas, não foi possível verificar a metodologia utilizada. Devido ao volume de amostras que são triadas diariamente em bancos de sangue, fica inviável a confirmação de todos os resultados, por este motivo é indicado ao doador uma outra instituição para a realização do exame confirmatório.

7. CONCLUSÃO

Comparando os dados obtidos neste trabalho com dados publicados do Hemocentro de São Paulo, pode-se verificar que a incidência de casos reagentes para HTLV, doença de Chagas e Sífilis é muito semelhante. Em pesquisa realizada no ano de 2001 (SALLES, 2003) demonstra que, em relação ao número de casos reagentes na triagem por testes de ELISA para HTVL e doença de Chagas e por VDRL para Sífilis e assim como os dados levantados nesta pesquisa, foram encontrados percentuais de 0,06% das amostras reagentes para HTLV, 1,10% para sífilis e 0,14% para doença de Chagas.

Conforme observação do trabalho de SALLES (2003), a tendência para os resultados reagentes em triagem sorológica é diminuir, por diversos motivos, como a introdução de um sistema informatizado em rede que impede novas doações por indivíduos com sorologia anteriormente reativa e triagem clínica, em que doadores em situações de risco são impedidos de doar, dentre outros.

Desta maneira faz-se necessária uma conscientização dos doadores em relação a prática segura da doação de sangue, pois ainda hoje em dia, muitas pessoas dirigem-se aos bancos de sangue, não pelo seu altruísmo, mas sim para realizar os testes de maneira confiável e gratuita e certificar seu estado geral de saúde. Porém, o Sistema Público de Saúde o faz, sem comprometer o desperdício de materiais, funcionários e os receptores destas doações, pois sabe-se que muitas pessoas faltam com a verdade na avaliação clínica para poderem doar, sem levar em consideração a janela imunológica e outros fatores que comprometem os resultados dos testes.

Existem várias situações em que um paciente necessita de uma transfusão de sangue, desde um volume abaixo do normal, até uma ineficiência de transporte de oxigênio pelas células, passando por uma deficiência na coagulação, entre outros. Mas enfim, quando há necessidade de uma transfusão, de um transplante ou de uma cirurgia de grande porte, a condição já debilitada do paciente não o permite que no caso de uma contaminação por algum patógeno, o processo de cura e de melhora do quadro clínica seja aperfeiçoado, deixando este paciente numa situação certamente comprometida, pois seu sistema imunológico também está. Desta maneira a veracidade das informações por parte do doador faz-se de extrema importância.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. & POBER, Jordan S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

BARNES, Robert D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4ª edição. São Paulo: Livraria Roca, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº153 de 14 de junho de 2004**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>>. Acesso em: 29nov.2007.

CAMPOS, Carlos Alberto Moreira. **Roteiro Ilustrado de Parasitologia: Estudo esquemático de protozoários e helmintos da área Biomédica**. Natal: UFRN, Ed. Universitária, 1994.

CARNEIRO, Ana C.; BARBOSA, Isabel P. & CARNEIRO CHAVES F. **Síndrome de Crest e Hipertensão Pulmonar: Prognóstico sombrio**. Acta Méd Port 2004; 17: 409-414.

CIMERMAN, Benjamin; CIMERMAN, Sérgio. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

CORAL, Luiz Carlos; QUEIROZ, Luiz Paulo de; GRZESIUK, Anderson Kuntz. **Paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-I**. Arq. Neuropsiquiatria 1998;56(1):120-122.

CRAIG, Charles Franklin & FAUST, Ernest Carroll. **Parasitologia Clínica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Waissman Koogan, 1974.

FELBERG, Sergio; DANTAS, Paulo Elias Correa. **Diagnóstico e tratamento da síndrome de Sjögren**. Arq Bras Oftalmol. 2006;69(6):959-63

GALDINO, Cleide. Diário de Pernambuco. **Primo da Aids, vírus HTLV se alastra em Pernambuco.** Pernambuco, 2003.
<<http://www.sistemas.aids.gov.br/imprensa/Noticias.asp?NOTCod=49957>>.
Acesso em: 25 nov. 2007.

JANEWAY JR., Charles A. & TRAVERS, Paul. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.** 2ª. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

MENDES KHC, et al. **Soropositividade para sífilis em amostras sangüíneas, procedentes de quatro regiões (136 bairros) da cidade de Ribeirão Preto - SP.** Medicina, Ribeirão Preto, 29: 123-129, jan./mar. 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil, 2005. **Sífilis e Aids: semelhanças e diferenças.** 26 de outubro de 2005. Disponível em:
<<http://www.aids.gov.br/main.asp?ViewID=%7BDA56F374%2D128A%2D40FB%2DB16F%2DD08A1F5DD07B%7D¶ms=itemID=%7B4ADE05AF%2D2A5D%2D4E22%2D92AF%2D2EF4F1E455DC%7D;&UIPartUID=%7BD90F22DB%2D05D4%2D4644%2DA8F2%2DFAD4803C8898%7D>>. Acesso em 21 nov. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil, 2007. **Sífilis preocupa mais que HIV em gestantes.** 26 de outubro de 2007.

Disponível em:
<<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISDA56F374ITEMID0B3C92995F904437A1091936187EED42PTBRIE.htm>>. Acesso em 21 nov. 2007.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 9ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 1995.

NORONHA, Sílvia. **Desinformação e medo ainda dominam pacientes de HTLV.** Correio da Bahia - Aqui Salvador. 26/5/2004. Disponível em:
<<http://sistemas.aids.gov.br/imprensa/Noticias.asp?NOTCod=56963>>. Acesso em 25 nov 2007.

PASSOS, Mauro Romero Leal. **DST: Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Cultura Mídia, 1995.

RAMOS, Helton E., ALBERTI Gianna C., HAUCK, Patrícia R., GRAF, Hans & CARVALHO, Gisah A. **Interferência de Anticorpos em Testes de Função Tireoideana: Relato de Caso**. SEMPR - Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. vol. 45, nº 2, Abril 2001.

RUIZ, Milton A. **A Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia na coleção SciELO – Brasil**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2002, 24(1): 3-7.

SÁEZ-ALQUÉZAR, Amadeo. NEWSLAB A revista do laboratório moderno. **Triagem sorológica para Sífilis em doadores de sangue**. Ano XIV nº 82 jun/jul 2007.

SÁEZ-ALQUÉZAR, Amadeo. NEWSLAB A revista do laboratório moderno. **Doença de Chagas: Diagnóstico e triagem sorológica**. Ano XIV nº 83 ago/set 2007.

SALLES, Nanci A.; SABINO, Ester C.; BARRETO, Claudia C.; BARRETO, Angela M. E.; OTANI, Marcia M.; CHAMONE, Dalton F. **Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo**. Revista Panamericana de Salud Pública: vol.13 no.2-3 Washington Feb./Mar. 2003.

SOARESA, Bernadette Catalan; PROIETTI, Anna Bárbara de F Carneiro, PROIETTI, Fernando Augusto e GIPH (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa do HTLV-I/II). **HTLV-I/II e doadores de sangue: determinantes associados à soropositividade em população de baixo risco**. Revista Saúde Pública 2003; 37(4):470-6.

VERONESI, Ricardo. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

VINHAES, Márcio C.; DIAS, João Carlos Pinto. **Doença de Chagas no Brasil.**
Cadernos de Saúde Pública vol.16. suppl.2. Rio de Janeiro, 2000.