

FARMANGUINHOS/FIOCRUZ

Curso de Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas

LUCIANA CADINELLI DE ALMEIDA

**“CONTROLE DE QUALIDADE DE REATIVOS PARA DIAGNÓSTICOS DE
BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ”**

Rio de Janeiro
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

A447c Almeida, Luciana Cadinelli de

Controle de qualidade de reativos para diagnóstico de Bio-
Manguinhos/ Fiocruz. / Luciana Cadinelli de Almeida. – Rio de Janeiro,
2014.

xv, 63f : il. ; 30 cm.
Orientador: Ricardo Brum

Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos –
Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais
Farmacêuticas, 2014.

Bibliografia: f. 72-78

1. Reativos para diagnósticos. 2. Controle de qualidade. 3. Bio –
Manguinhos. I. Título.

CDD 615.372

LUCIANA CADINELLI DE ALMEIDA

“CONTROLE DE QUALIDADE DE REATIVOS PARA DIAGNÓSTICOS DE BIOMANGUINHOS/ FIOCRUZ”

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à banca do Curso de Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas de Farmanguinhos/Fiocruz como requisito à obtenção do título Especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica.

Orientador: Mestre Ricardo C.S. Brum

Rio de Janeiro
2014

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Luciana Cadinelli de Almeida

Título: CONTROLE DE QUALIDADE DE REATIVOS PARA DIAGNÓSTICOS DE BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à banca do Curso de Especialização em Tecnologias Industriais Farmacêuticas de Farmanguinhos/Fiocruz como requisito à obtenção do título Especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica.

Data: __/__/____

Banca Examinadora

Nome: Hugo Garcia Tonioli Defendi

Titulação: Especialista em Farmacovigilância

Instituição: Instituto de Ciência Tecnologia e Qualidade

Assinatura: _____

Nome: Paulo Roberto Gomes dos Santos

Titulação: Mestre em saúde da Criança e do Adolescente

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Assinatura: _____

Nome: Ramon Lemos Calaça das Neves

Titulação: Doutor em Ciência (Microbiologia)

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me guiar em minhas escolhas, tornando cada momento vivido uma lição de vida.

Agradeço a minha mãe, Nereida, por ser meu alicerce, por sempre me apoiar e me ajudar por todos esses anos.

Agradeço ao meu pai, Luiz Carlos, e à sua mulher, Patrícia por sempre acreditar em meu sucesso, me incentivando e contribuindo para mais esta realização.

À minha irmã, Mariana, e ao meu padrinho Jobel, que sempre serão exemplos em minha vida e sempre me incentivaram.

Agradeço ao meu orientador, Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos Ricardo C.S. Brum, pela inestimável orientação. Obrigado por compartilhar seu grande conhecimento.

Agradeço às coordenadoras Carmem e Elizabeth e todos os professores que atenciosamente possibilitaram a realização deste curso e passaram seus conhecimentos com sabedoria e dedicação.

.

“É preciso ser um realista para descobrir a realidade.

É preciso ser um romântico para criá-la.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Palavras-chave: Reativos para diagnóstico, Controle de Qualidade, BioManguinhos.

Os reativos para diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos são insumos ou conjunto de insumos usados na detecção de antígenos ou anticorpos para a obtenção do diagnóstico laboratorial. Entre eles se incluem os reagentes, instrumentos e sistemas que em conjunto com as instruções para seu uso, contribuem para efetuar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa em uma amostra biológica.

O Laboratório de Controle de Reativos (LACORE) pertence ao Departamento da Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos, e é responsável pelo controle de qualidade dos reativos produzidos pela unidade. Atualmente é dividido em duas seções, a Seção de Controle de Processos Intermediários (SECPI) e Seção de Controle de Produtos Finais (SECPF), contando ainda com colaboradores do gabinete LACORE e controle de qualidade do kit NAT HIV/HCV.

Nesse trabalho, o objetivo foi descrever e avaliar as técnicas de Controle de Qualidade dos reativos de diagnóstico produzidos em Bio-Manguinhos com base nos procedimentos operacionais padrão (POP), manuais de instrução e documentos internos do LACORE, assim como ressaltar o descarte de resíduos. Como metodologia, foram discutidos os ensaios de desempenho e validação dos testes, desde a matéria-prima ao produto acabado, para as seguintes metodologias: ELISA, Imunofluorescência indireta, kit NAT HIV/HCV, testes rápidos (imunocromatográficos) e parasitológicos.

Os kits passam por teste de desempenho e são submetidos a diversos níveis de monitoramento que incluem: análise de produto intermediário, pré-kit e produto acabado, além de avaliação adicional por uma Instituição externa à Fiocruz. A incorporação de técnicas de controle cada vez mais eficazes confere um alto padrão agregado nos kits produzidos e distribuídos para o Ministério da Saúde, o que reflete positivamente na saúde pública do país.

Foi concluído que Bio-Manguinhos cumpre rigorosamente com as diretrizes estabelecidas pela portaria 686, de 27/8/1998, do Ministério da Saúde, e RDC 16/2013, da ANVISA, garantindo a qualidade do processo de produção e o controle dos fatores de risco à saúde do trabalhador por meio do descarte correto de resíduos.

ABSTRACT

Keywords: Reagents for diagnosis, Infectious Diseases, Bio-Manguinhos

The diagnostic's reagents produced by Bio-Manguinhos are input or set of inputs for detection of antibodies or antigens to obtain the laboratory diagnosis. These products include reagents, instruments and systems wick together with instructions for its use, contribute to a qualitative, quantitative or semi-quantitative determination in a biological sample.

The Reagents Control Laboratory (LACORE) belongs to the Quality Department (DEQUA) of Bio-Manguinhos, and it is responsible for quality control of reagents produced by the unit. It is currently split into two sections, the Intermediates Processes Section Control (SECPI) and Final Products Section Control (SECPF), still relying on reviewers LaCore cabinet and quality control of NAT HIV / HCV kit.

At this study, we aimed to describe the Quality Control techniques of diagnostic's reagents produced by Bio-Manguinhos based on standard operational procedures(Pops), manuals instructions and internal documents from LaCore, as well as highlight the waste disposal. As analysis methodology, we've discussed the tests performance and validation of tests, from raw material to finished product, to the following methods: ELISA, Immunofluorescence indirect, NAT HIV / HCV kit, rapid tests (immunochromatographic) and parasitological.

It was concluded that Bio-Manguinhos strictly complies with the guidelines established by Ordinance No 686 of 08.27.1998, the Ministry of Health, and RDC 16/2013, ANVISA, to ensure the quality of the production process and control of risk factors on workers' health through proper disposal of waste.

The kits are submitted on performance tests and undergo various levels of monitoring that include: analysis of intermediate product, pre-kit and finished product, plus additional assessment - in some cases - by an external institution to Fiocruz. Incorporating techniques increasingly effective control confers a high standard on aggregate produced and distributed kits to the Ministry of Health, which reflects positively on public health of the country.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Portifólio de reativos para diagnóstico de Bio-Manguinhos	17
Figura 2 –	Organograma da Vice Diretoria da Qualidade de Bio-Manguinhos	20
Figura 3 –	Representação da microplaca de EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos, com a disposição dos soros controles e das amostras na microplaca	44
Figura 4 –	Reações de ELISA	45
Figura 5 –	Densidade ótica dos soros controles para a validação do teste	45
Figura 6 –	Lâmina de IFI com a disposição do soro controle positivo (CP), soro controle negativo (CN) e as amostras nas diluições 1:40 e 1:80	46
Figura 7 –	Reações de IFI	47
Figura 8 –	Leitura da lâmina de IFI, com visualização de imunofluorescência nos parasitas no orifício do CP ou amostras reagente	47
Figura 9 –	Leitura da lâmina de IFI, com visualização de ausência de fluorescência nos parasitas no orifício do CN, ou amostra não reagente, assim como presença de “background”.	48
Figura 10 –	Esquema dos processos realizados numa reação de PCR.	49

Figura 11 –	Fluxo metodológico do KIT NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos	52
Figura 12 –	TR DPP Bio-Manguinhos e seus componentes	55
Figura 13 –	Suporte imunocromatográfico do kit TR DPP Bio-Manguinhos, com representação das linhas Testes e Controle, poços 1 e 2 para aplicação da amostra eluída e tampão de corrida, respectivamente; membrana absorvente e plataforma de duplo percurso (Tiras 1 e 2)	56
Figura 14 -	Tampão de eluição do kit TR DPP Bio-Manguinhos	56
Figura 15 -	Adição de Tampão de corrida após amostra no poço 1 do suporte do kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	57
Figura 16 -	Resultado não reagente no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	58
Figura 17-	Resultado reagente para HIV-1 no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	58
Figura 18 -	Resultado reagente para HIV-2 no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	59
Figura 19 -	Resultado indeterminado no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	59
Figura 20 -	Resultado inválido no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos	60

Figura 21 -	Ovos de helmintos detectáveis no kit HELM TEST Bio- manguinhos	61
Figura 22 -	Fluxograma de amostras – SEAMO – responsável pela amostragem para todos os laboratórios do DEQUA	63
Figura 23 -	Plano de amostragem para controle de qualidade de reativos	65
Tabela 1 -	Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA	38
Tabela 2 -	Componentes do KIT NAT HIV/HCV	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AESTM	Assessoria de Segurança do Trabalho e Meio Ambiente
AIDS	Síndrome da imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP,TTP	Nucleotídeos
CTP GTP	
Bio-	Instituto de Tecnologia em Imunobiológico
Manguinhos	
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
cDNA	DNA complementar
CN	Soro Controle Negativo
CP	Soro Controle Positivo
CQ	Controle de Qualidade
CTV	Centro Tecnológico de Vacinas
DEQUA	Departamento da Qualidade
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DEREM	Departamento de relações com o Mercado
DIPRE	Divisão de Produção de Reativos para Diagnóstico
dNTP's	Desoxinucleotídeos
DO	Densidade Ótica
DPP	Plataforma de Duplo Percurso
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
ELISA	Ensaio sorológico imunoenzimático
FAPERJ	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FTA-ABS	<i>Fluorescent treponemal antibody absortion test</i>
HA	Hemaglutinação passiva

HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOBRAS	Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPV	Papilomavirus humano
HTLV-III	Vírus Humano T Linfotrófico tipo III
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INCT-IDN	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em doenças negligenciadas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	União Internacional de Química pura e aplicada
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LACORE	Laboratório de Controle de Reativos
LAV	Vírus associado à linfadenopatia
LD	Limite de Detecção
LH	Leishmaniose Humana
LQ	Limite de Quantificação
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
mRNA	RNA mensageiro

NAT	Teste do Ácido Nucleico
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão fosfato/salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNDST/AIDS	Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
PNI	Política Nacional de Imunizações
POP	Procedimento Operacional Padrão
RPR	<i>Rapid Plasm Reagin</i>
SAC	Serviço de Atendimento ao Cidadão
SAM	Soroaglutinação microscópica
SEAMO	Setor de Amostragem
SECPF	Seção de Controle de produtos Finais
SECPI	Seção de Controle de Processos Intermediários
SEPLA	Seção de Processamento de plasma
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
TPHA	<i>Treponema pallidum</i> Hemagglutination Assay
TR	Teste Rápido
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USFDA	Órgão Administrador de drogas e alimentos dos Estados Unidos
VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 DIAGNÓSTICOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS	21
1.2.1 Doenças negligenciadas	23
1.2.2 AIDS	25
1.2.3 Sífilis	27
1.2.4 Leishmaniose Visceral	29
1.2.5 Doença de Chagas	31
1.2.6 Leptospirose	33
1.3 SISTEMA DA QUALIDADE	34
1.3.1 Validação	35
1.3.1.A <i>Parâmetros da validação</i>	38
1.3.1.A.1 <i>Especificidade/Seletividade</i>	38
1.3.1.A.2 <i>Intervalo de Trabalho</i>	39
1.3.1.A.3 <i>Linearidade</i>	39
1.3.1.A.4 <i>Sensibilidade</i>	39
1.3.1.A.5 <i>Exatidão</i>	39
1.3.1.A.6 <i>Precisão</i>	40
1.3.1.A.7 <i>Robustez</i>	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 Geral	41
2.2 Específicos	41
3 METODOLOGIA	42
4 DISCUSSÃO	42
4.1 REATIVOS PARA DIAGNÓSTICOS DE BIO-MANGUINHOS	42
4.1.1 Controle de Qualidade de reativos para diagnóstico	43
4.1.2 Ensaio Sorológicos	43
4.1.2.A <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	44
4.1.2.B <i>Imunofluorescência indireta (IFI)</i>	46
4.1.3 Ensaio Molecular - PCR	48
4.1.3.A <i>Projeto NAT HIV/HCV</i>	52

4.1.4	Imunocromatografia	53
4.1.4.A	<i>Testes Rápidos DPP Bio- Manguinhos</i>	54
4.1.4.B	<i>Imunoblot Rápido DPP HIV 1/2</i>	57
4.1.5	Helm Test	60
4.1.6	Transferência de tecnologia	61
4.2	DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS (DEQUA)	62
4.2.1	Laboratório de Controle de Reativos (LACORE)	63
4.2.1.A	<i>Seção de Controle de Processos Intermediários (SECPI)</i>	67
4.2.1.A.1	<i>Análise de matérias primas</i>	67
4.2.1.A.2	<i>Análise de insumos</i>	68
4.2.1.B	<i>Seção de Controle de Produto Final (SECPF)</i>	68
4.2.1.B.1	<i>Análise de Produto Terminado</i>	68
4.2.1.B.2	<i>Testes de estabilidade</i>	69
4.2.1.B.3	<i>Reanálises para SAC</i>	69
4.2.1.C	<i>Fluxo de descarte</i>	69
4.2.1.C.1	<i>Descarte de resíduos (lixo comum)</i>	69
4.2.1.C.2	<i>Descarte de resíduos biológicos</i>	70
4.2.1.C.3	<i>Descarte de resíduos perfurocortantes</i>	70
4.2.1.C.4	<i>Descarte de resíduos químicos</i>	70
5	CONCLUSÃO	71
6	REFERÊNCIAS	72

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), vinculada ao Ministério da Saúde, é uma fundação considerada um agente nacional da cidadania que promove a saúde e o desenvolvimento social, assim como visa a geração e difusão do conhecimento científico e tecnológico, oferecendo serviços de saúde variados, sempre articulados às suas atividades de ensino e pesquisa (FIOCRUZ, 2013).

Além da geração de conhecimento, a Fiocruz atua no desenvolvimento de produtos e processos com aplicação potencial, como aumento do número de patentes brasileiras, aprimoramento do sistema de saúde nacional, novas vacinas, medicamentos, biofármacos e reativos para diagnóstico que monitoram a saúde da população (FIOCRUZ, 2013).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), criado em 1976, é a Unidade da Fiocruz responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, kits reativos para diagnóstico e biofármacos que atendem prioritariamente às demandas da saúde pública nacional através da Política Nacional de Imunizações (PNI), convênios que permitem a distribuição de seus kits aos laboratórios públicos e também à demanda externa através da exportação da vacina contra a febre amarela. Através da sua Divisão de Produção de Reativos para Diagnóstico (DIPRE), conta com uma linha diversificada de reativos para diagnóstico de doenças virais, bacterianas e causadas por protozoários. (FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013; PALMIGIANI, 2005).

Os kits produzidos (Figura 1) são os Testes Rápidos (TR) DPP® (Plataforma de Duplo Percurso – do inglês *Dual Path Platform*) para triagem sorológica das doenças Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS – do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), Sífilis, Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e Leptospirose; Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 como teste confirmatório de infecção pelo vírus da AIDS; Ensaio Sorológico imunoenzimático (ELISA) para triagem sorológica da doença LVC, Imunofluorescência Indireta (IFI) como testes confirmatórios de diagnóstico de LVC, Leishmaniose Humana (LH) e Doença de Chagas; exame parasitológico *Helm-Test* que permite revelar ovos de helmintos

presentes nas amostras de fezes e o Teste de Ácido Nucléico (NAT – *do inglês Nucleic Acid Test*) que complementa os testes sorológicos oferecidos nos hemocentros do país, ampliando a segurança transfusional (FIOCRUZ, 2013).

Figura 1: Portifólio de reativos para diagnóstico de Bio-Manguinhos.

PORTIFÓLIO



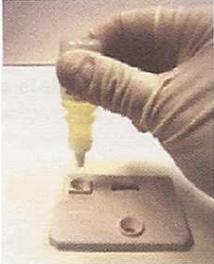
LVC
LH

Kit EIE Bio-Manguinhos
(Ensaio Imunoenzimático)



LH
CHAGAS

Kit IFI Bio-Manguinhos
(Imunofluorescência Indireta)



AIDS
SÍFILIS
LVC
LEPTO.

TR DPP e TR IMUNOBLot Bio- Manguinhos
(Imunocromatografia)






HELMINTOSES
INTESTINAIS

Kit Helm Test Bio-Manguinhos
(Kato-Katz)





HIV
HCV

KIT NAT HIV/HCV
Biologia Molecular PCR em tempo real




Fonte: Bio-Manguinhos, 2013.

A Portaria 686, de 27 de agosto de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que todos os estabelecimentos que fabriquem produtos para diagnóstico de uso *"in vitro"*, cumpram as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Controle estabelecidas nesse regulamento. Com início de implantação das BPF, em 1999, o controle interno da produção de imunobiológicos passou por uma série de reformulações, que visaram atender as expectativas da Unidade Bio-Manguinhos, conforme as recomendações do Ministério da Saúde e da ANVISA e também das normalizações de caráter internacional (ANVISA, 1998; FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013; PALMIGIANI, 2005).

Para manter tais certificações, Bio-Manguinhos é submetida a frequentes auditorias internas e externas (ANVISA e da Organização Mundial da Saúde (OMS)). Sendo a busca pela melhoria contínua um dos princípios da qualidade, ressalta-se o foco nos requisitos da BPF tanto para o produto acabado, quanto para as matérias primas necessárias à fabricação dos produtos. As auditorias avaliam o nível de qualidade dos produtos e processos, sendo a Auditoria da Qualidade um exame estabelecido, sistemático e independente de todo o sistema de qualidade de um fabricante, executado em intervalos regulares e com frequência suficiente para assegurar que tanto as atividades do sistema de qualidade quanto seus resultados satisfaçam os procedimentos especificados em seu sistema de qualidade, que esses procedimentos sejam implementados eficientemente e ainda que sejam adequados para alcançar os objetivos do sistema de qualidade (ANVISA, 2013; FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013).

O Laboratório de Controle de Reativos (LACORE) pertence ao Departamento da Qualidade (DEQUA) de Bio-manguinhos, e é responsável pelo controle de qualidade dos reativos produzidos pela unidade. Atualmente é dividido em duas seções, a Seção de Controle de Processos Intermediários (SECPI) e Seção de Controle de Produtos Finais (SECPF), contando ainda com colaboradores do gabinete LACORE e controle de qualidade do kit NAT HIV/HCV (FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013; PALMIGIANI, 2005).

O LACORE faz a validação analítica dos kits, análises de controle de qualidade e testes de estabilidade que concedem confiabilidade aos reativos para o posterior fornecimento dos mesmos ao Ministério da Saúde, conforme as normas de BPF e Boas Práticas de Laboratório (BPL) (FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013).

Os kits podem ser analisados nos métodos de Imunofluorescência (IFI), Ensaio Imunoenzimático (Elisa), Imunocromatografia de Fluxo (Teste Rápido), método parasitológico Kato-katz e PCR (reação em cadeia da polimerase – do inglês *polymerase chain reaction*) em tempo real (NAT) conforme cada especificação de sensibilidade e especificidade (FIOCRUZ, 2013).

O método Kato-Katz, para aplicação do Teste de Hemíntos (Helm test), tem o controle de qualidade realizado na área do Departamento de Reativos para diagnóstico (DERED) localizado no Pavilhão Rocha Lima. As exigências para a prática deste teste são facilmente atendidas, pois a sua análise consiste apenas em inspecionar visualmente o produto (a embalagem e os seus componentes). As análises das demais técnicas são realizadas na sala C18 no DEQUA (FERREIRA 2011).

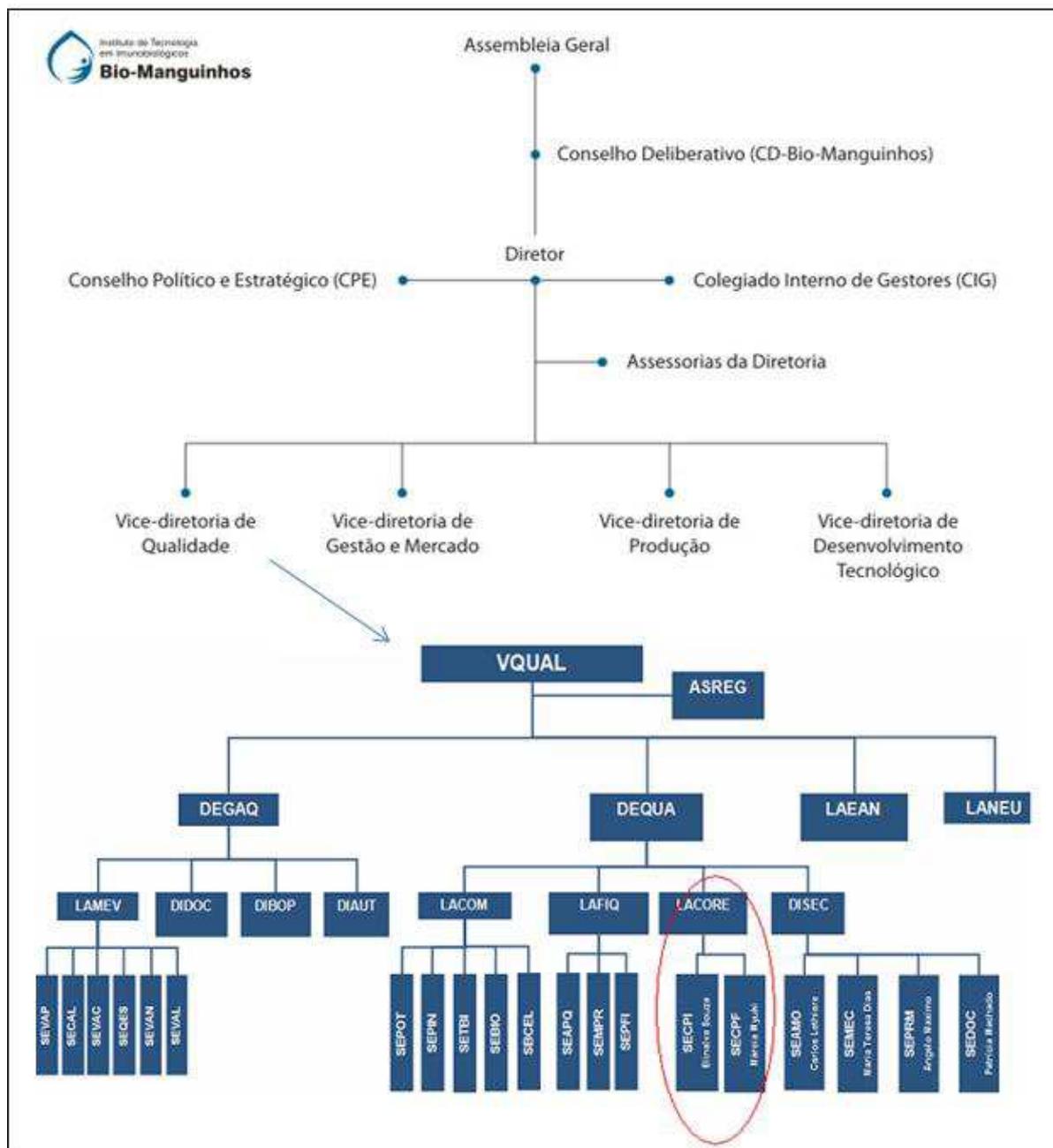
O laboratório foi criado em 1999 com a necessidade de se controlar os kits de reativos produzidos por Bio-Manguinhos. As análises eram incipientes e realizadas em uma pequena área da produção, fato que não condizia com a BPF. No ano seguinte, durante uma auditoria interna, o laboratório recebeu uma não-conformidade, pois o controle de qualidade dos produtos era realizado no ambiente da produção, pela própria produção, estando em desacordo com as legislações vigentes, onde o laboratório produtor não pode ser responsável pelas análises de controle de qualidade dos produtos, havendo a necessidade de adequação a fim de garantir uma maior confiabilidade aos reativos produzidos por Bio-Manguinhos (FERREIRA, 2011)

Após a auditoria foi iniciada a implementação do controle de reativos para diagnóstico através de um projeto patrocinado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), sendo o marco inicial do controle de qualidade de reativos. Apesar de todo esforço o espaço físico e a aquisição de equipamentos ainda era um problema. Neste mesmo ano o laboratório recebeu a ANVISA para auditoria externa, onde esta ratificou a não conformidade, sendo o laboratório realocado em uma área no quarto andar do prédio Rocha Lima de Bio-Manguinhos, adequada para as atividades realizadas. No ano de 2006 o laboratório foi alocado na área que ocupa até os dias de hoje, no Centro Tecnológico de Vacinas (CTV), DEQUA (FERREIRA, 2011).

Um ano depois, a fim de adequar este laboratório aos modelos

organizacionais de Bio-Manguinhos, este passou a se chamar Setor de Controle de Qualidade de Reativos, tendo a criação de um centro de custos para compra de equipamentos e contratação de pessoal capacitado, visto que a demanda dos produtos estava em constante crescimento. Com o intuito de adequar-se cada vez mais, passou a se chamar Laboratório de Controle de Reativos (LACORE) no ano de 2008, se dividindo ainda em duas subunidades organizacionais, de acordo com os processos realizados, sendo estas SECPI e SECPF, conforme figura 2 (FERREIRA, 2011).

Figura 2: Organograma da Vice Diretoria da Qualidade de Bio-Manguinhos



Fonte: PALMIGIANI, 2005.

1.2 DIAGNÓSTICOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS

As doenças infecciosas podem ser vistas como um confronto entre dois mundos: o mundo microbiológico e o da fisiologia humana. A apreciação da evolução de tais doenças e do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, assim como estratégias terapêuticas, requer uma compreensão entre os domínios da microbiologia, fisiologia humana e meio ambiente (WALDVOGEL, 2004).

Neste contexto, as transformações demográficas, ambientais e sociais que ocorrem no mundo criam condições para o surgimento constante de novas formas de expressão de doenças já conhecidas e para a emergência de novas. Os movimentos de emergência de novas doenças transmissíveis como a AIDS, de ressurgimento em novas condições de doenças “antigas”, como a cólera ou a dengue, de persistência de endemias importantes como a tuberculose e de ocorrência de surtos inusitados de doenças como a Febre do Oeste de Nilo nos Estados Unidos, demonstram que nem países em desenvolvimento nem mesmo os desenvolvidos estão livres das doenças infecciosas (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004; WALDVOGEL, 2004).

A presença mundial das doenças infecciosas é tão importante que os Objetivos do Milênio, descritos na Assembléia Geral das Nações Unidas de 2001, incluem o combate de doenças como HIV/AIDS e malária entre suas oito metas primárias, sendo essa consideração de real importância para dar um quadro atual da relevância das doenças transmissíveis (CARVALHEIRO, 2008).

Sendo assim, muitas doenças infecciosas comuns nos países como um todo são tratáveis e o acesso às drogas tem diminuído significativamente a mortalidade e a morbidade nas populações. Uma intervenção correta que seja eficaz tanto para os cuidados agudos, como para uma fase seguinte de doenças emergentes e reemergentes, depende da detecção rápida e segura do agente patógeno. Neste caso, métodos de diagnósticos mais rápidos certamente auxiliam a vigilância epidemiológica, pois doenças infecciosas que apresentam significativas consequências para a saúde pública poderão ser eficientemente controladas se identificadas precocemente. Em contrapartida, é ético e moderno consolidar decisões clínicas em evidências científicas definidas em bases epidemiológicas e estatísticas (CAVALCANTI, LORENA, GOMES, 2008; FLORES, 2005).

Dentre as doenças infecciosas, as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) são doenças com agravos de grande importância para a saúde pública, estando entre as dez principais causas de procura por serviços de saúde no mundo, segundo a OMS. Na maioria dos países, as listas de agravos de notificação compulsória elaboradas pelas autoridades de saúde incluem poucas doenças sexualmente transmissíveis e apenas algumas das principais síndromes das DST (BASTOS, CUNHA, HACKER, 2008; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2008).

Em 1999, a OMS estimou um total de 340 milhões de casos novos por ano de DST curáveis em todo o mundo, entre 15 e 49 anos, 10 a 12 milhões destes casos no Brasil. Outros tantos milhões de DST não curáveis (virais), incluindo o herpes genital, infecções pelo papilomavirus humano (HPV), hepatite B e infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana - do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) ocorrem anualmente. Entre suas consequências, em geral, estão a infertilidade feminina e masculina, a transmissão de mãe para filha, determinando perdas gestacionais ou doença congênita e o aumento do risco para infecção de HIV (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2006).

Em nível nacional, a DST que faz parte da lista de doenças de notificação compulsória compreende todos os casos de AIDS, incluindo gestantes HIV positivas, crianças expostas ao HIV; praticamente inexitem dados de incidência do restante das DST em nível nacional, estimados pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (PNDST/AIDS) (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2014).

Essa realidade exige o permanente fortalecimento de uma rede de vigilância epidemiológica que incorpore os hospitais de referência para doenças transmissíveis, em consonância com as unidades hospitalares voltadas para o atendimento pediátrico e de urgências, com os laboratórios de saúde pública e centros de saúde e ambulatórios com capacidade de monitorar os perfis epidemiológicos e suas alterações (CARVALHEIRO, 2008). O atendimento imediato de uma DST não é apenas uma ação curativa; é também uma ação preventiva da transmissão e do surgimento de outras complicações (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde instituiu pela Portaria Nº 2.031 de 23 de setembro de 2004, o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB).

O SISLAB é um conjunto de redes nacionais de laboratório, organizadas em subredes por agravos ou programas, de forma hierarquizada por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância em saúde – compreendendo a vigilância epidemiológica, vigilância sanitária, vigilância em saúde ambiental, vigilância da saúde do trabalhador, e assistência médica (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

Dentro da estrutura do SISLAB, os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) são laboratórios de referências estaduais vinculados às secretarias estaduais de saúde que coordenam a rede de laboratórios privados e públicos que realizam análises de interesse em saúde pública, como a Fiocruz. Cabe ao LACEN encaminhar ao laboratório de referência regional amostras inconclusivas para a complementação de diagnóstico e aquelas destinadas ao controle de qualidade analítica, entre outras competências (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

1.2.1 Doenças negligenciadas

As doenças negligenciadas, muitas vezes denominadas de doenças tropicais negligenciadas, correspondem a um grupo de doenças infecciosas que afeta predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis e contribui para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social (INCT-IDN, 2013; WERNECK, HASSELMANN, GOUVÊA, 2010).

A OMS e os Médicos Sem Fronteiras propuseram a classificação das doenças em *globais* (ocorrem em todo o mundo), *negligenciadas* (mais prevalentes nos países em desenvolvimento) e *mais negligenciadas* (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essa classificação representa uma evolução da denominação “doenças tropicais” por contemplar os contextos de desenvolvimento político, econômico e social. Sinaliza, também, que o combate a essas enfermidades, que atingem particularmente as populações marginalizadas, é essencial para o cumprimento dos objetivos de desenvolvimento da Organização das Nações Unidas (ONU) para o milênio (INCT-IDN, 2013; MOREL, 2006).

Outra classificação é muito usada para caracterizar iniquidades em escala mundial: doenças dos grupos I, II e III (de alguns organismos ligados à OMS) que são equivalentes a doenças globais, negligenciadas e muito negligenciadas (de

organismos como Médicos Sem Fronteiras). Esta última é impregnada por um sentido confusamente humanitário misturado com forte presença de uma análise economicista. Os tradicionais indicadores de saúde foram sendo progressivamente substituídos por um novo conceito, a “carga da doença” traduzida por “dias de vida útil perdidos”. Atualmente, a maneira mais comum de assinalar gravidade de uma situação de saúde é medir essas perdas e, implicitamente associá-las ao grau de desenvolvimento (CARVALHEIRO, 2008).

Ao considerarmos as doenças negligenciadas no mundo, em particular nas Américas, deparamos com inúmeros casos de doenças já eliminadas em países desenvolvidos. Considerando as doenças parasitárias e bacterianas identificadas como negligenciadas em todo o mundo, incluem-se treze, entre elas, três verminoses transmitidas pelo solo (ascaridíase, ancilostomose e tricuriase), filariose, oncocercose, dracunculose, esquistossomose, doença de Chagas, doença do sono, leishmanioses, úlcera de Buruli, hanseníase e tracoma. Numa lista expandida incluem: dengue, treponematoses, leptospiroses, estrogiloidose, trematoidoses transmitidas por alimentos, neurocisticercose, sarna, e outras (CARVALHEIRO, 2008; WERNECK, HASSELMANN, GOUVÊA, 2010).

Essas doenças são assim denominadas porque os investimentos em pesquisa geralmente não se revertem em desenvolvimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos, vacinas e outras tecnologias para sua prevenção e controle. O problema é particularmente grave em relação à disponibilidade de medicamentos, já que as atividades de pesquisa e desenvolvimento das indústrias farmacêuticas são principalmente orientadas pelo lucro, e o retorno financeiro exigido dificilmente seria alcançado no caso de doenças que atingem populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, localizadas, majoritariamente, nos países em desenvolvimento (WERNECK, HASSELMANN, GOUVÊA, 2010).

No Brasil, foi realizada em 2006 a primeira Oficina de Prioridades em Doenças Negligenciadas, iniciado o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas no Brasil, no âmbito da parceria do Ministério da Saúde com o Ministério de Ciência e Tecnologia e Secretaria de Vigilância em Saúde. Em 2008, esses dois ministérios promoveram a segunda Oficina de Prioridades em Doenças Negligenciadas, elegendo dengue, doença de Chagas, leishmanioses, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose como as sete prioridades de

atuação do programa em doenças negligenciadas (INCT-IDN, 2013; WERNECK, HASSELMANN, GOUVÊA, 2010).

A Fiocruz executa papel crucial no controle das doenças negligenciadas, uma vez que incorpora o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de inovação em doenças Negligenciadas, rede internacional de grupos de pesquisa formada para estudar, estimular e promover a inovação em saúde, com foco nas doenças negligenciadas consideradas prioridades sanitárias no país. Vale ressaltar que embora necessárias, as atividades de pesquisa não são suficientes para o controle das doenças negligenciadas, mas apenas um componente de um complexo sistema de inovação em saúde (INCT-IDN, 2013).

1.2.2 AIDS

Dentre as doenças infecciosas, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS - do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) encontra-se atualmente no ranking das DSTs. A AIDS é uma doença que se manifesta progressivamente após a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - do inglês *human immunodeficiency vírus*). Esse vírus ataca diretamente as células de defesa do organismo, mais precisamente os linfócitos T-CD4. Em decorrência da diminuição dessas células no organismo, os indivíduos infectados tornam-se imunodeprimidos, onde o sistema de defesa do organismo mostra-se deficiente e incapaz de defender-se adequadamente ao ataque de microorganismos invasores, ficando o soropositivo vulnerável às chamadas doenças oportunistas (ADRIANO, 2013; CAMARGO, CAPITÃO, 2009).

As formas de transmissão e contágio mais conhecidas são transfusão de sangue e hemoderivados, contato com material perfuro-cortante contaminado, relações sexuais e transmissão vertical (da mãe para o filho por meio do parto ou amamentação). A infecção pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda, fase assintomática, também conhecida como latência clínica, fase sintomática inicial ou precoce e AIDS. As manifestações clínicas podem demorar em torno de 8 anos para se apresentarem e incluem doenças específicas e doenças sugestivas da imunodeficiência, dentre elas o sarcoma de Kaposi e a candidíase oral (ADRIANO, 2013; RIBEIRO, 2006).

Os primeiros testes diagnósticos para O HIV foram liberados em 1985,

baseados na detecção de anticorpos anti-HIV, estabelecendo o ensaio imunoenzimático ELISA para HIV-1 como a primeira ferramenta de triagem diagnóstica. A sua implantação ocorreu, primeiramente, nos Serviços de Hemoterapia e, posteriormente, como método diagnóstico para os indivíduos de risco para a infecção pelo HIV-1 (RIBEIRO, 2006). Atualmente, o diagnóstico pode ser feito também por testes rápidos imunocromatográficos para triagem sorológica e confirmatória, testes imunoenzimáticos como as técnicas de ELISA e o IFI, e testes moleculares, como PCR em tempo real, que complementa os testes sorológicos de triagem (FIOCRUZ, 2013).

Dados recentes do Relatório Mundial da OMS revelaram que apesar da redução da taxa de infecção em alguns países, o número de pessoas vivendo com HIV continua a crescer em todas as regiões do mundo. O número de casos atingiu seu maior nível em 2005 com cerca de 40,3 milhões de pessoas infectadas. Mais de três milhões de pessoas morreram de doença relacionada à AIDS em 2005, dessas, 500.000 eram crianças (RIBEIRO, 2006).

Na verdade, a pandemia de HIV/AIDS não dá sinais de que vá diminuir num futuro próximo, especialmente nos países em desenvolvimento e, assim, governos e organizações internacionais vêm planejando abordagens multissetoriais para prevenir a transmissão do HIV/AIDS. Em geral, é a área de saúde que assume a liderança nesses esforços, inclusive procurando modos de disponibilizar terapias anti retrovirais. Em muitos países, e dentro das organizações internacionais de assistência técnica e custeio, foram criados órgãos dedicados explicitamente à coordenação de atividades relativas ao HIV/AIDS, como o PNDST/AIDS no Brasil. Dado que cerca de 80% dos casos de HIV no mundo são transmitidos sexualmente, e outros 10% por via parenteral ou amamentação, a área da saúde tem se voltado para os programas de saúde sexual e reprodutiva a fim de encontrar liderança e orientação na prevenção da transmissão, e mais recentemente, para oferecer tratamento e cuidados (ASKEW, BERER, 2006).

Ao longo das últimas décadas, pesquisadores têm documentado certo número de fatores estruturais que facilitam a transmissão do HIV e sua concentração em áreas geográficas e populações particulares. Estes fatores podem ser agrupados em três categorias distintas, mas interconectadas, como (sub) desenvolvimento econômico e pobreza; mobilidade, incluindo migração, trabalho sazonal, e convulsão social em razão de guerras e de instabilidade política, que interagem frequentemente

com a pobreza, condicionando a vulnerabilidade relacionada ao HIV/AIDS e desigualdades de gênero, colocando as mulheres, bem como homens desviantes com relação ao gênero (por exemplo, travestis), em situações de vulnerabilidade acentuada à infecção pelo HIV (PARKER; JUNIOR, 2000).

1.2.3 Sífilis

A sífilis é uma doença infecciosa crônica que desafia há séculos a humanidade. A doença acomete praticamente todos os órgãos e sistemas com manifestações cutâneas temporárias e apesar de ter tratamento eficaz e de baixo custo, vem-se mantendo como problema de saúde pública até os dias atuais. Seu agente etiológico, o espiroqueta *Treponema pallidum* (*T. pallidum*), foi descoberto em 1905. (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006; MS, 2004).

A classificação da doença envolve os múltiplos estágios do estado de infecção. A carga bacteriana e conseqüentemente a infectividade são maiores nos estágios mais recentes (ALQUEZAR et al, 2007). A história natural da sífilis mostra evolução que alterna períodos de atividade com características clínicas, imunológicas e histopatológicas distintas (sífilis primária, secundária e terciária) e períodos de latência (sífilis latente). A sífilis divide-se ainda em sífilis recente, nos casos em que o diagnóstico é feito em até um ano depois da infecção, e sífilis tardia, quando o diagnóstico é realizado após um ano (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006).

A sífilis primária caracteriza-se por apresentar lesão inicial denominada cancro duro ou protossifiloma, que surge em 1 a 2 semanas. O cancro duro, usualmente, desaparece em 4 semanas, sem deixar cicatrizes. As reações sorológicas para sífilis tornam-se positivas entre a 2ª e a 4ª semanas do aparecimento do cancro. A sífilis secundária é marcada pela disseminação dos treponemas pelo organismo. Suas manifestações ocorrem de 4 a 8 semanas do aparecimento do cancro e as reações sorológicas são sempre positivas. No estágio terciário, os pacientes desenvolvem lesões localizadas envolvendo pele e mucosas, sistema cardiovascular e nervoso. Em geral a característica das lesões terciárias é a formação de granulomas destrutivos (gomas) e ausência quase total de treponemas. Podem estar acometidos ainda ossos, músculos e fígado. Na sífilis latente não existem manifestações visíveis, mas há treponemas localizados em determinados tecidos (assim o diagnóstico só é obtido pelas reações sorológicas). Há ainda a sífilis congênita

consequente à infecção do feto pelo *T. pallidum* por via placentária e a neurosífilis, onde ocorre invasão das meninges pelo treponema (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006; MILANEZ, AMARAL, 2008; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

A sífilis congênita, segundo a OMS, é um dos mais graves desfechos adversos preveníveis da gestação. Aproximadamente 40% das gestações resultam em perdas fetais e perinatais e, nas restantes, em torno de 50% dos recém-nascidos poderão sofrer sequelas físicas, sensoriais ou do desenvolvimento. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, embora a subnotificação de casos de sífilis congênita seja alta, alguns dados disponíveis indicam a elevada magnitude deste problema. São notificados 4,5 mil casos por ano, mas estima-se que o número real seja muito maior, podendo chegar a 48 mil. A sífilis congênita causa grande impacto social, que se traduz em custos indiretos para a economia do País, os quais, somados aos custos diretos decorrentes das internações e procedimentos necessários para o tratamento de suas complicações, elevam muito os custos totais (KOMKA, LAGO, 2006; MILANEZ, AMARAL, 2008).

É importante ressaltar que a doença pode ser transmitida de diferentes maneiras: contato sexual, de mãe para filho e, ocasionalmente, por transfusão de sangue e hemocomponentes, sendo feitos testes sorológicos na triagem de doadores de sangue para interromper a transmissão. Estes testes são indiretos e podem ser agrupados em duas categorias: treponêmicos e não treponêmicos (cardiolipínicos) (ALQUEZAR et al, 2007).

O controle da sífilis é a interrupção da cadeia de transmissão e a prevenção de novos casos. Evitar a transmissão da doença consiste na detecção e no tratamento precoce e adequado do paciente e do parceiro, ou parceiros. Na sífilis primária e em algumas lesões da fase secundária, o diagnóstico poderá ser direto, feito pela demonstração do treponema, sendo considerado prova definitiva, pois não está sujeita à interferência de mecanismos cruzados, isto é, falso positivo. A microscopia de campo escuro é a maneira mais rápida e eficaz para a observação do treponema, que se apresenta móvel (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006).

A utilização da sorologia poderá ser feita a partir da segunda ou terceira semana após o aparecimento do cancro, quando os anticorpos começam a ser detectados. O *T. pallidum* no organismo promove o desenvolvimento de dois tipos de anticorpos: as reaginas (IgM- imunoglobulinas M e IgG- imunoglobulina G) contra cardiolipina (antígeno da bactéria), dando origem aos testes não treponêmicos, e

anticorpos específicos contra o *T. pallidum*, que originaram os testes treponêmicos. Os testes não treponêmicos são úteis para triagem em grupos populacionais e monitorização do tratamento, enquanto os treponêmicos são utilizados para confirmação do diagnóstico (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006).

Os métodos de diagnóstico mais utilizados são os testes não treponêmicos de reações de VDRL (do inglês *Venereal Disease Research Laboratory*) que é uma técnica de microaglutinação que utiliza a cardiolipina como antígeno e testes rápidos não treponêmicos RPR (do inglês *Rapid Plasm Reagin*), que são testes quantitativos e de alta sensibilidade. Há ainda os testes treponêmicos de imunofluorescência indireta FTA-ABS (do inglês *Fluorescent treponemal antibody absorption test*), hemoaglutinação TPHA (do inglês *Treponema pallidum Hemagglutination Assay*), ELISA, *western blotting* e testes rápidos (partículas de látex ou imunocromatográficos), que são testes qualitativos de alta especificidade. No início dos anos 90 duas técnicas de PCR foram descritas e passaram a ser empregadas, principalmente para detecção de antígenos treponêmicos na sífilis primária, com altas sensibilidade e especificidade (ALQUEZAR et al, 2007; AVELLEIRA, BOTTINO, 2006; MILANEZ, AMARAL, 2008; MS, 20SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

1.2.4 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose considerada uma doença tropical negligenciada com alta taxa de morbidade. Ela afeta cerca de 500.000 pessoas por ano, principalmente em áreas rurais pobres da África Oriental, sul da Ásia e América Latina, sendo endêmica em 62 países (DOURADO et al, 2007; EL-MOAMLY, EL-SWEIFY, HAFEEZ, 2012).

A doença é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (ou *Leishmania chagasi*), o qual é transmitido de um hospedeiro reservatório ao suscetível, pela picada de flebotomíneos (sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie envolvida). Os cães são implicados como os principais reservatórios no ciclo zoonótico de transmissão, particularmente no ambiente doméstico, sendo responsáveis pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, quer pela alta prevalência da doença nestes animais, quer pela presença de formas amastigotas na pele, sendo a sua eliminação um dos alvos estratégicos de ação para controle da doença em

humanos. (AZEVEDO, 2009; FREITAS et al, 2011; SANTOS et al, 2010).

A patogênese da LVC envolve diversos fatores, e um fator decisivo na progressão da doença está associada com a resposta imune que o animal desenvolve contra o parasito. Neste caso, ao invés dos anticorpos possuírem uma função protetora, tornam-se altamente prejudicial, participando de processos inflamatórios e sendo responsáveis pela maioria dos sinais clínicos associados com a LVC. O quadro clínico dos animais com a enfermidade é semelhante ao quadro humano da doença. Apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final. O parasitismo ocorre frequentemente na medula óssea e têm sido relatadas alterações hematológicas e bioquímicas. (AZEVEDO, 2009; FREITAS et al, 2011)

Devido a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, a patologia é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus HIV, tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. O tratamento da LV requer injeções dolorosas de antimônio pentavalente durante 30 dias, sendo um tratamento caro e com toxicidade significativa. Além disso, nenhuma vacina está disponível e o diagnóstico clínico apresenta-se como um grupo de sintomas inespecíficos (AZEVEDO, 2009; DOURADO et al, 2007; EL-MOAMLY, EL-SWEIFY, HAFEEZ, 2012).

Sendo assim, a necessidade de testes de diagnósticos simples, precisos, rápidos e baratos são cruciais para o manejo e controle da doença. Os exames diretos como o parasitológico direto de linfonodo, pele, medula óssea, fígado entre outros são seguros quanto à positividade dos casos, porém não tão eficazes para realizar uma cobertura completa de pacientes positivos para doença. Assim, foram desenvolvidos os testes sorológicos visando o diagnóstico rápido, sendo muito sensíveis e específicos. Alguns pesquisadores, porém, observaram reações cruzadas com Leishmaniose Tegumentar, Doença de Chagas, Tripanossomíase, Esquistossomose e até sarna demodécica, sendo, portanto, necessária a confirmação por outras metodologias (AZEVEDO, 2009; DOURADO et al, 2007; EL-MOAMLY, EL-SWEIFY, HAFEEZ, 2012).

Assim, o diagnóstico pode ser realizado de várias formas, dentre as quais se destacam ELISA, IFI e testes rápidos imunocromatográficos, os exames parasitológicos diretos com pesquisa do protozoário em esfregaço de material biológico; e mais recentemente, métodos moleculares como o PCR (AZEVEDO,

2009; DOURADO et al, 2007; EL-MOAMLY, EL-SWEIFY, HAFEEZ, 2012).

1.2.5 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo importante causa de mortalidade de adultos jovens. Esta doença ainda é um importante problema de saúde pública, particularmente em lugares pobres onde as casas são feitas de barro, pois este tipo de construção favorece a infestação do inseto vetor *Triatoma infestans* (DIAS et al, 2008; LUNARDELLI et al, 2007).

Na evolução natural da doença de Chagas se distinguem três fases. A fase aguda, qualquer que seja a via de contágio, se inicia no momento em que se adquire a infecção e dura de dois a quatro meses, com pouca manifestação clínica e elevada concentração do parasita. A fase intermediária é assintomática e pode perdurar por toda a vida. A fase crônica da doença se desenvolve em 30-40% dos pacientes infectados e corresponde à lenta destruição das células infectadas pelo parasita. Há importante cardiopatia, agravada pelo desenvolvimento de reações autoimunes e, em menor extensão, dano intestinal e no sistema nervoso autônomo. A fase crônica da doença é altamente incapacitante podendo induzir à falência cardíaca e à morte. Foi estimado pela OMS, que 16 a 18 milhões de pessoas apresentam a infecção crônica (LUNARDELLI et al, 2008).

Curiosamente, a doença foi descoberta no Brasil em 1909 por Carlos Chagas na cidade Lassance em MG, e a maior parte de seu conhecimento tem sido desvendada na América Latina por investigadores do Brasil, da Argentina e da Venezuela. A fase aguda, descrita por Carlos Chagas, constituía uma infecção predominantemente de crianças na primeira década de vida. Chagas descreveu minuciosamente 29 casos agudos, todos sintomáticos, quase invariavelmente com manifestações febris e edematosas, exames parasitológicos diretos positivos e óbitos por miocardite ou meningoencefalite aguda em 37,9% deles (DIAS, 2001; PINTO et al, 2008).

A doença é endêmica somente no continente Americano, prevalente a partir do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, na Patagônia. No Brasil, a Amazônia é considerada a região mais endêmica da doença, uma vez que a região nunca foi livre da presença do *T. cruzi*, o qual participa de um ciclo enzoótico muito

bem estabelecido entre animais silvestres da região. Outra zona endêmica fora da Amazônia vai desde o Estado do Maranhão ao Estado do Rio Grande do Sul, com exceção do Estado de Santa Catarina (DIAS et al, 2008; LUNARDELLI et al, 2007; PINTO et al, 2008).

O contato com as fezes ou urina contaminadas do vetor infectado é a causa mais comum de infecção. Contudo, *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por vias alternativas, como a contaminação laboratorial acidental, a via oral, o transplante de órgãos, a transmissão congênita, a transfusão sanguínea, a atividade sexual, o uso de drogas intravenosas e o leite materno (LUNARDELLI et al, 2007).

Avanços no controle de populações de triatomíneos domésticos na América do Sul e, particularmente, no Brasil, têm contribuído para a redução da transmissão vetorial. Em consonância, reduções adicionais nas transmissões por transfusões sanguíneas e transmissões congênitas ocorrem por meio de um programa de transfusão de sangue limpo bem estruturado e programas de diagnóstico e tratamento para as mulheres de idade fértil (DIAS et al, 2008).

O tratamento da doença de Chagas é complexo e difícil na fase crônica, não havendo maior interesse comercial para as grandes empresas internacionais no sentido do desenvolvimento de fármacos específicos. O controle da doença, como já mencionado, com base em melhoria de habitação, combate químico aos vetores e seleção de doadores de sangue, é viável e depende fundamentalmente de vontade política e de um programa com a continuidade e a contiguidade necessárias. Disto, e por ser a Doença de Chagas característica de populações pobres ou excluídas, a lógica do controle da endemia passa pela formulação de nova ética social – em que o Estado assume e garante a proteção dos cidadãos (saúde como dever do Estado) – e não pela lógica das economias de mercado (DIAS, 2001).

O diagnóstico depende comumente do resultado de provas sorológicas, sobretudo na fase crônica da infecção parasitária. A disponibilidade de tais procedimentos não só possibilita o reconhecimento etiológico, como também permite, entre outras utilidades, realizar inquérito epidemiológico, controle de tratamento específico e triagem de doadores de sangue. Proeminentes na prática clínica são utilizados testes sorológicos usando antígenos *T. cruzi*., hemoaglutinação passiva (HA), IFI e ELISA (LUNARDELLI et al, 2007).

1.2.6 Leptospirose

A leptospirose, enfermidade causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*, é uma das zoonoses mais difundidas no mundo, considerada um importante problema de saúde pública. Pode ser adquirida pelo contato com reservatórios animais ou ambientes contaminados por sua urina (BROWN et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009; TASSINARI et al, 2004).

Os roedores são os principais reservatórios da doença, sendo-lhes atribuída a maior responsabilidade pela sua transmissão, importância especial conferida à espécie *Rattus norvegicus*, principal espécie transmissora em centros urbanos, conhecida como ratazana de esgotos. Sua proliferação é verificada em grandes cidades, onde as redes pluviais e de esgotos não recebem tratamento adequado e, com frequência, se interconectam possibilitando uma maior contaminação ambiental (OLIVEIRA, GUIMARÃES, ZULMA, 2009).

Contudo, outros animais, especialmente os cães, participam da cadeia de transmissão da doença. Estes, quando infectados, podem eliminar leptospirosas por meio da urina, durante meses, sem apresentar sintomas (OLIVEIRA, GUIMARÃES, ZULMA, 2009).

O homem é considerado um hospedeiro acidental e terminal dentro da cadeia de transmissão, sendo pouco eficiente na transmissão da doença. A leptospirose possui diversas formas clínicas e a gravidade da doença pode depender do sorotipo, variando desde uma infecção assintomática a uma doença fatal que envolve os rins, o fígado e outros órgãos vitais (BROWN et al, 2008). A letalidade depende, entre outros fatores, dos sorovares infectantes, da gravidade da forma clínica, da precocidade do diagnóstico, do tratamento prescrito e da faixa etária do paciente. As formas graves da doença produzem uma taxa de letalidade que pode variar entre 5% e 40% (ZUNINO, PIZARRO, 2007).

Nos países temperados, a leptospirose humana ocorre predominantemente de forma esporádica, principalmente em grupos ocupacionais particularmente expostos, como agricultores, fazendeiros, magarefes, tratadores de animais, veterinários, militares e outras profissões que tenham contato com ratos ou água contaminada (TASSINARI et al, 2004).

Apesar da ampla distribuição mundial, a leptospirose é mais frequente em região tropical do que em região de clima temperado. Isto ocorre, sobretudo, em

razão das condições ambientais de calor e umidade que favorecem a manutenção da bactéria no meio ambiente. A doença é sazonal nos países de clima tropical com epidemias observadas em estações chuvosas ou após desastres naturais (OLIVEIRA, GUIMARÃES, ZULMA, 2009).

Devido às dificuldades associadas ao isolamento das bactérias, o diagnóstico em seres humanos baseia-se em especificamente em testes sorológicos, sendo a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) a mais utilizada (BROWN et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009).

1.3 SISTEMA DA QUALIDADE (CQ)

A palavra “Qualidade” tem múltiplos significados. Ela consiste nas características de um produto que vão ao encontro das necessidades dos clientes e dessa forma proporcionam a satisfação em relação ao produto. Em consonância, pode se entender como ausência de falhas. O conjunto de Normas que visa padronizar e melhorar continuamente a qualidade dos produtos e serviços oferecidos pelas empresas no mundo inteiro é conhecido como ISO 9000 (do inglês *International Organization for Standardization*). O foco principal é o cliente: atendimento na íntegra e em conformidade com requisitos especificados, bem como sua crescente satisfação (MEIRELLES et al, 2008).

O Controle de Qualidade (CQ) é um sistema para verificação e manutenção de um nível desejado de qualidade em um produto ou processo, por planejamento cuidadoso, uso de equipamento apropriado, inspeção continuada e ação corretiva quando necessária. Para qualquer organização que deseja ser bem sucedida, a contribuição de sua função produtiva é vital, sendo a qualidade um dos fatores de desempenho de qualquer operação de produção. Bom desempenho de qualidade em uma operação não apenas leva à satisfação de consumidores externos, mas também torna mais fácil o dia-a-dia das pessoas envolvidas na operação. Tão importante quanto gerar produtos de qualidade, é ter a garantia de que os produtos gerados tenham sua qualidade auferida corretamente (MEIRELLES et al, 2008).

O capítulo XVII da RDC 17 de 16 de abril de 2010, contempla as Boas Práticas de Controle de Qualidade. Segundo a normativa, cada fabricante detentor de uma autorização de fabricação deve possuir um departamento de CQ, sendo fundamental sua independência em relação ao setor de produção (ANVISA, 2010).

As atribuições do CQ se resumem em estabelecer, validar e implementar todos os procedimentos de controle de qualidade, assim como avaliar, manter e armazenar os padrões de referência, garantir a rotulagem correta dos reagentes, padrões e outros materiais de sua utilização, garantir que a estabilidade dos ingredientes ativos e medicamentos seja monitorada, participar da investigação de reclamações relativas à qualidade do produto e participar do monitoramento ambiental. Todas essas operações devem ser realizadas em conformidade com procedimentos escritos e, quando necessário, registradas (ANVISA, 2010).

O CQ não deve resumir-se apenas às operações laboratoriais, devendo participar e ser envolvido em todas as decisões que possam estar relacionadas à qualidade do produto e seu pessoal deve ter acesso às áreas de produção para amostragem e investigação. Todas as atividades realizadas pelo laboratório são diretamente conduzidas por um programa de Garantia da Qualidade que assegura a qualidade de todo o processo (ANVISA, 2010; SOUZA, AMOR, 2010).

As BPL são normas que disciplinam a organização, o funcionamento e as condições sob as quais as análises do controle são planejadas, registradas, liberadas e como as amostras são preservadas e descartadas e os resultados arquivados. Essas normas incluem atividades pré-analíticas (treinamento do pessoal técnico); atividades analíticas (manual de procedimentos para processamento das análises; descrição dos métodos e / ou das técnicas; plano de ação corretiva quando os resultados esperados não são obtidos) e atividades pós-analíticas (informações verbais, escritas ou notificadas por meios eletrônicos) (SOUZA, AMOR, 2010). Neste contexto, a fase de validação dos métodos usados nas práticas laboratoriais é de crucial importância para as atividades do CQ.

1.3.1 Validação

A necessidade de se mostrar a qualidade de técnicas analíticas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para tal, o bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBANI et al, 2004; RIBEIRO et al, 2007).

O desenvolvimento de um método analítico, adaptação ou implementação de um método já conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório, denominado como validação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos (BRITO et al, 2003). A validação de métodos analíticos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica, sendo um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica até ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Objetiva primordialmente a demonstração de que o método é adequado para o seu propósito (BARROS, 2002; RIBANI et al, 2004).

Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso. No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/05/2004 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (BARROS, 2002; RIBANI et al, 2004; RIBEIRO et al, 2007).

Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos, o que aumenta o custo das análises. Estabelecer um bom procedimento de validação requer um compromisso entre validar rápido, e com um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental. Os métodos de ensaios usados para avaliar a conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (BRITO et al, 2003; RIBEIRO et al, 2007).

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infraestrutura internacional de medições está sendo implementada, e verifica-se a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir este processo de reconhecimento mútuo a nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais, de certificação e de credenciamento devem ser observados. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da

validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem Especificidade/Seletividade, Intervalo de Trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão, Precisão e Robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (BRITO et al, 2003; RIBANI et al, 2004).

Estes parâmetros têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da Conferência Internacional de Harmonização (ICH – do inglês *International Conference on Harmonization*) na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI et al, 2004).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela ISO10. A norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O Órgão Administrador de drogas e alimentos dos Estados Unidos (USFDA - do inglês *United States Food and Drug Administration*) também tem proposto guias sobre validação de métodos (RIBANI et al, 2004).

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item *validação de métodos analíticos* como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. Como estes organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios, é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI et al, 2004).

1.3.1.A Parâmetros da Validação

A tabela 1 representa os parâmetros de validação dos órgãos nacionais INMETRO e ANVISA.

Tabela 1: Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de Calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade	
Exatidão	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (Precisão intra corrida)
Precisão Intermediária	Precisão intermediária (precisão inter corrida)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	

Fonte: RIBANI et al, 2004.

1.3.1.A.1 Especificidade/ Seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar com exatidão o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz da amostra. O processo para demonstrar a especificidade do método depende do seu objetivo. Em diversas técnicas analíticas (como nas análises cromatográficas, por exemplo) esse parâmetro pode ser estabelecido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Outra maneira de avaliar a especificidade envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo (BARROS, 2002; BRITO et al, 2003).

1.3.1.A.2 Intervalo de Trabalho

O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão o resultado desejado, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear (BRITO et al, 2002)

1.3.1.A.3 Linearidade

Linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico (BARROS, 2002; BRITO et al, 2003).

1.3.1.A.4 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido (BRITO et al, 2003).

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O LD é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada, mas não precisamente quantificada, pela técnica instrumental, enquanto o LQ é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório, em condições usuais (BRITO et al, 2003; RIBEIRO et al, 2007).

1.3.1.A.5 Exatidão

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da

validação. Pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz limpa da amostra ou ainda na matriz da amostra (BARROS, 2002; BRITO et al, 2003).

A ANVISA estabelece que a exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata (RIBEIRO et al, 2007).

1.3.1.A.6 Precisão

Precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. Em outras palavras, é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. A precisão é expressa em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo (BARROS, 2002; BRITO et al, 2003).

A precisão pode ser considerada no nível de repetibilidade, de precisão intermediária e de reprodutibilidade. A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. A precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros. A reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias (BRITO et al, 2003; RIBEIRO et al, 2007).

1.3.1.A.7 Robustez

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão. É uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar,

sem perder a confiabilidade, e sua estimativa depende do tipo de metodologia analítica utilizada (RIBEIRO et al, 2007).

A robustez deve ser investigada na etapa de desenvolvimento do método e normalmente é feita avaliando seus parâmetros, simultaneamente, aplicando técnica estatística de planejamento de experimento. Com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros nos resultados, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final. Indica confiabilidade do método durante uso normal (BARROS, 2002; BRITO et al, 2003).

A ANVISA e o ICH indicam uma lista de parâmetros a serem avaliados nos testes de robustez de metodologias analíticas para as técnicas de preparo de amostras, espectrofotometria, cromatografia líquida e cromatografia gasosa. O INMETRO indica o teste de Youden, feito por um delineamento que envolve sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos (CÉSAR, PIANETTI, 2009; RIBEIRO et al,2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

O objetivo geral deste trabalho é descrever e avaliar como é realizado o Controle de Qualidade de Reativos para diagnóstico de Bio-Manguinhos / Fiocruz, de acordo com as diretrizes de qualidade pré-estabelecidas pela Portaria 686/1998, RDC 16/2013 e 17/2010 da ANVISA.

2.2 Específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho são: aprofundamento descritivo nas técnicas empregadas nos reativos de diagnósticos produzidos por Bio-Manguinhos e nas atividades do LACORE, discutindo os procedimentos do controle e soros padrões utilizados como materiais de referência para a validação dos testes em consonância com os preconizados pelas agências regulatórias, assim como ressaltar a importância do Controle de Qualidade realizado no produto intermediário e produto final.

3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para elaboração desta monografia fundamentou-se primeiramente em pesquisa bibliográfica em busca de considerações e conceitos que possam ser utilizados como referência. Outra forma de busca utilizada de pesquisa fundamentou-se pela análise de documentos como procedimentos operacionais padronizados, nos manuais de Bio-Manguinhos e a Regulação de BPF.

Por se tratar de um processo específico de Bio-Manguinhos, o material consultado é restrito, portanto, o passo seguinte consistiu na observação *in loco* dos procedimentos na rotina diária na Unidade.

4 DISCUSSÃO

4.1 REATIVOS DE DIAGNÓSTICOS DE BIO-MANGUINHOS

Os reativos para diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos são insumos ou conjunto de insumos usados na detecção de antígenos ou anticorpos para a obtenção do diagnóstico laboratorial. Entre estes produtos se incluem os reagentes, instrumentos e sistemas que em conjunto com as instruções para seu uso, contribuem para efetuar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa em uma amostra biológica (FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013).

Através da DIPRE, Bio-Manguinhos conta com uma linha diversificada de reativos para diagnóstico de doenças virais, bacterianas e causadas por protozoários e tem sua produção dimensionada para atender às demandas do Ministério da Saúde, através de convênios que permitem a distribuição de seus kits aos laboratórios públicos (FERREIRA, 2011; FIOCRUZ, 2013).

Os kits produzidos são os Testes Rápidos DPP® para triagem sorológica de AIDS, Sífilis, LVC e Leptospirose; Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 como teste confirmatório de infecção pelo vírus da AIDS; ELISA para triagem sorológica da doença LVC; IFI como testes confirmatórios de diagnóstico de LVC, LH e Doença de Chagas; exame parasitológico *Helm-Test* que permite revelar ovos de helmintos presentes nas amostras de fezes, tais como: *Ascaris*, *Schistosoma*, *ancilostomídeos*, *Trichuris*, *Taenia* e com menos frequência os de *Enterobius* e *Strongyloides* e o Teste de Ácido Nucléico – NAT, que complementa os testes sorológicos oferecidos nos

hemocentros do país, ampliando a segurança transfusional (FIOCRUZ, 2013).

Estes conjuntos de diagnóstico são para uso *in vitro* e contêm produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, o manuseio de qualquer reagente deve ser feito com as precauções de biossegurança necessárias, como utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) (BIO-MANGUINHOS, 2013).

4.1.1 Controle de Qualidade de Reativos para diagnóstico

O controle de qualidade dos reativos para diagnóstico, ou kits para diagnóstico, tanto nos testes de triagem quanto nos testes confirmatórios, é de essencial importância para a confiabilidade do diagnóstico das doenças que afetam a população. Os reativos devem possuir sensibilidade e especificidades adequadas, evitando a ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos. Resultados falso-negativos acarretam risco sanitário, constituindo agravo à saúde enquanto resultados falso-positivos expressam prejuízo social ao paciente (RIBEIRO, 2006).

A sensibilidade analítica é avaliada pela incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em questão. A especificidade analítica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente não reagentes para a doença em questão. Sendo assim, o papel do Controle de Qualidade é assegurar os resultados dos kits garantindo confiabilidade sobre o diagnóstico de uma dada doença. (RIBEIRO, 2006).

4.1.2 Ensaio Sorológicos

Os ensaios sorológicos constituem uma importante ferramenta para o diagnóstico de várias doenças, tendo no portfólio de Bio-Manguinhos os testes ELISA e IFI usados para identificar sorologicamente anticorpos contra os antígenos dos agentes infecciosos causadores de LVC, LH e doença de Chagas (FIOCRUZ, 2013).

4.1.2.A Ensaio Imunoenzimático - ELISA

O kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major like*, em soros ou plasmas de cães. O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir da cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/"strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida. A figura 3 representa a microplaca previamente adsorvida com os antígenos, e a disposição que devem ser adicionados os soros controles e as amostras nas mesmas (BIO-MANGUINHOS, 2014).

Figura 3: Representação da microplaca de EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos, com a disposição dos soros controles e das amostras na microplaca.

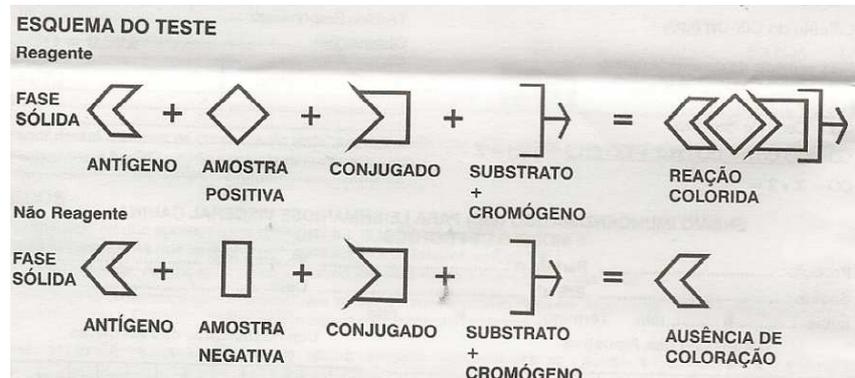
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CP	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	
B	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83	
C	CN	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84	CP - Controle Positivo
D	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85	CN - Controle Negativo
E	CN	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86	
F	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87	SS - Sem Soro
G	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88	
H	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89	

Fonte: Bio-Manguinhos, 2014.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina). A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reage). Os resultados podem ser avaliados por meio de

um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450nm. A figura 4 representa o esquema das reações (BIO-MANGUINHOS,2014).

Figura 4: Reações de ELISA.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2014.

A validação do teste ocorre quando os valores da densidade ótica (DO), obtidos após a leitura no espectrofotômetro, estiverem na faixa descrita a seguir:

Figura 5: Densidade ótica dos soros controles para a validação do teste

Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO
Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO

Fonte: Bio-Manguinhos, 2014.

O ensaio deve ser repetido se os valores acima citados estiverem fora dos limites especificados. Para a interpretação dos resultados, deve-se fazer o cálculo do *cut-off*, onde calcula-se a média das densidades óticas dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas. As amostras reagentes são as que apresentam DO igual ou superior ao *cut-off* e as não reagentes apresentam DO inferior ao *cut-off*. (BIO-MANGUINHOS, 2014).

Estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz. Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de LV Americana dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras coletadas em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no ELISA. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard"), e os seguintes índices foram

encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76% (BIO-MANGUINHOS, 2014).

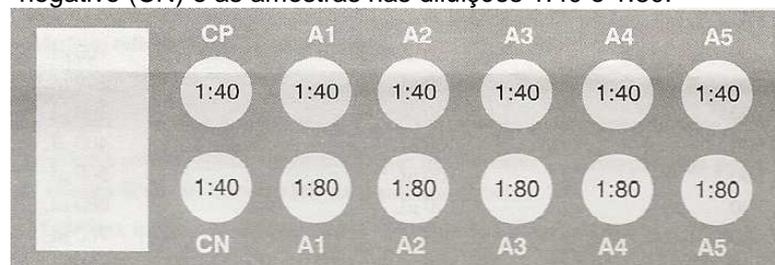
Diversos estudos foram realizados nos laboratórios de Bio-Manguinhos utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetibilidade. As conclusões permitiram determinar um período mínimo de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade (BIO-MANGUINHOS, 2014).

4.1.2.B *Imunofluorescência Indireta - IFI*

O Kit IFI CHAGAS Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *T.cruzi* (agente causador da doença de chagas) em soros ou plasmas humanos e o Kit IFI LEISHMANIOSE HUMANA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra Leishmania em soros humanos (BIO-MANGUINHOS, 2012).

O teste de IFI consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas com os parasitas, que são fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado com isotiocianato de fluoresceína para evidenciação da reação. São adicionados nos orifícios das lâminas os soros controle positivos e negativos, assim como as amostras, todos devidamente diluídos em uma solução de PBS (tampão fostato/salina) e Azul de Evans 0,1% (Figura 5) (BIO-MANGUINHOS, 2012).

Figura 6: Lâmina de IFI com a disposição do soro controle positivo (CP), soro controle negativo (CN) e as amostras nas diluições 1:40 e 1:80.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2012.

A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência

e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que foram incluídos em cada lâmina (BIO-MANGUINHOS, 2012). A figura 7 representa o esquema do teste.

Figura 7: Reações de IFI.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2012.

Para a leitura e interpretação das reações, utiliza-se microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X, focalizando o orifício do soro controle positivo para observação de fluorescência presente nos parasitas (Figura 8), e focalizando o orifício do soro controle negativo para observação da ausência da fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo “*background*” (Figura 9). Em seguida, focaliza-se os orifícios das amostras, ou soros testes, para a observação da presença de fluorescência ou não, identificando-as como reagentes (positivo) ou não-reagentes (negativo) (BIO-MANGUINHOS, 2012).

Figura 8: Leitura da lâmina de IFI, com visualização de imunofluorescência nos parasitas no orifício do CP ou amostra reagente.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2012.

Figura 9: Leitura da lâmina de IFI, com visualização de ausência de fluorescência nos parasitas no orifício do CN, ou amostra não reagente, assim como presença de “background”.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2012.

Os kits IFI Chagas Bio-Manguinhos e os kits IFI Leishmaniose Humana aprovados e comercializados possuem índice de sensibilidade e especificidade superior ou equivalente a 90%. Diversos estudos foram realizados nos laboratórios de Bio-Manguinhos utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões permitiram determinar um período mínimo de 12 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade (BIO-MANGUINHOS, 2012).

4.1.3 PCR em tempo real - KIT NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos

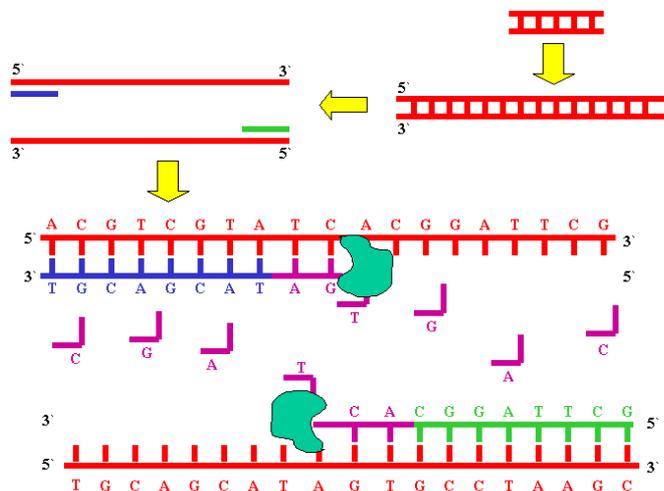
A reação PCR reproduz *in vitro* a replicação da molécula de DNA em grande escala. A reação sempre parte de um DNA molde, extraído convenientemente da amostra, ou de uma amostra de RNA, convertida para cDNA (DNA complementar). O ideal é que o ácido nucléico esteja livre de impurezas (proteínas, lipídeos, outro ácido nucléico, reagentes de extração, etc.) e numa concentração mínima de 5µg/mL, apesar de quantidades bem menores poderem ser utilizadas (CAVALCANTI, LORENA, GOMES, 2008; VIEIRA, 2013).

Os desoxinucleotídeos (dNTP's) são a matéria-prima propriamente dita para a

síntese das fitas filhas. São compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. São adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe. Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação. Os dNTP's são ligados à fita mãe pela polimerase numa área delimitada pelos *primers*, que são pequenas sequências de DNA (12 a 35 bases) complementares às bordas (VIEIRA, 2013).

Resumidamente, após a desnaturação das fitas molde, ocorre o pareamento dos *primers* e em seguida a enzima polimerase adiciona os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos (Na⁺, Cl⁻, K⁺, entre outros) que otimizam as condições de reação (VIEIRA, 2013). A figura 10 representa a reação.

Figura 10: Esquema dos processos realizados numa reação de PCR. Após a desnaturação das fitas molde, ocorre o pareamento dos *primers*. A enzima, representada em verde, adiciona os desoxinucleotídeos complementarmente às fitas-mãe.



Fonte: VIEIRA, 2013.

A PCR em tempo real é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a técnica, o acúmulo de *amplicons*, ou material genético amplificado, é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas seqüência-específicas ou *primers* usados na reação. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da

emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (ALMEIDA, SADDI, 2007).

O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de RNA mensageiro mais simples e precisa. Esta reação é composta de duas partes: a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita. Seu principal diferencial é que na verdade esta reação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra; a amostra fornece o RNA, que é convertido em cDNA. Ferramenta útil em estudos de expressão gênica, pois avaliando o RNA mensageiro (mRNA), podemos detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas. No entanto, o estudo direto do RNA (principalmente o mRNA) é inviável, devido à sua alta sensibilidade a vários fatores e a altas temperaturas. O primeiro passo da reação consiste na síntese de uma fita de DNA utilizando como *template* uma fita de RNA numa reação catalisada por uma transcriptase reversa. Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR. É importante ressaltar que o *round* de transcrição reversa não altera o número de fitas de RNA ou DNA (VIEIRA, 2011).

O KIT NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos é um teste para detecção de Ácido Nucléico de HIV e HCV (Vírus da hepatite C) em serviços de hemoterapia, visando diminuir o risco transfusional causado por esses agentes. Os componentes do kit estão representados pela tabela 2 (BIO-MANGUINHOS, 2013).

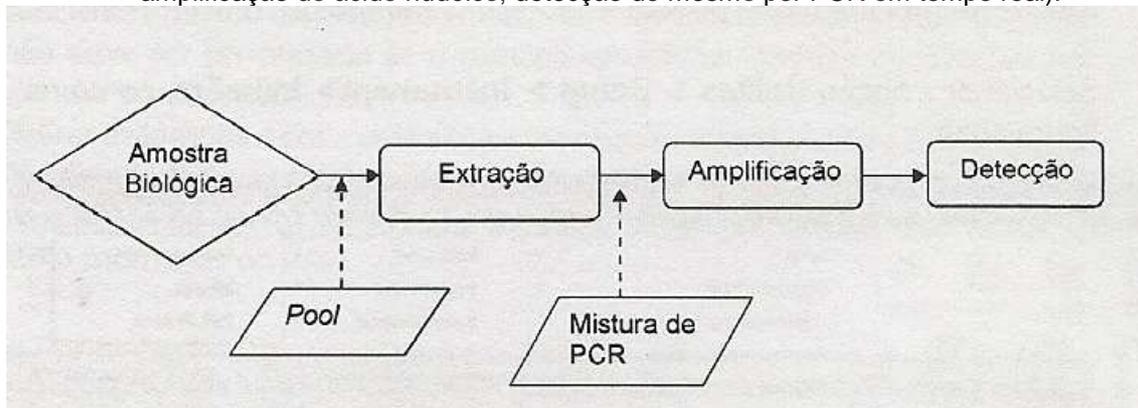
Tabela 2: Componentes do kit NAT HIV/HCV:

MÓDULO	COMPONENTES	VOLUME
CONTROLE	CONTROLE POSITIVO	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 800µL CADA
	CONTROLE NEGATIVO	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 800µL CADA
	PARTÍCULA CALIBRADORA	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 800µL CADA
MÓDULO	COMPONENTES	VOLUME
EXTRAÇÃO	TAMPÃO DE LISE	1 FRASCO BRANCO COM 33mL
	CARREADOR DE RNA	1 FRASCO TRANSPARENTE LIOFILIZADO
	TAMPÃO DE LAVAGEM 1	1 FRASCO BRANCO COM 83mL
	TAMPÃO DE LAVAGEM 2	1 FRASCO BRANCO COM 68mL
	TAMPÃO DE ELUIÇÃO	9 FRASCOS TRANSPARENTES COM 2,0mL CADA
	FLUIDO TE	4 FRASCOS TRANSPARENTES COM 1,4mL CADA
	PLACA DE VÁCUO	1 UNIDADE DE 96 POÇOS
	PLACA DE ELUIÇÃO	1 UNIDADE DE 96 POÇOS
	PLACA DE REAÇÃO	1 UNIDADE DE 96 POÇOS
	PROTEASE	1 FRASCO ÁMBAR DE 6mL COM PROTEASE LIOFILIZADA
	SOLVENTE DE PROTEASE	1 FRASCO BRANCO COM 6mL
	RECIPIENTES DESCARTÁVEIS	2 UNIDADES COM CAPACIDADE DE 33mL
	PLACA ÓPTICA	1 UNIDADE DE 96 POÇOS
	SELO ÓPTICO	1 UNIDADE NAS DIMENSÕES DA PLACA ÓPTICA
	TUBO DE 5 mL	1 UNIDADE COM CAPACIDADE DE 5 mL
	MANUAL DE INSTRUÇÃO	1 UNIDADE
CARTÃO BIO	1 UNIDADE DE PAPEL CARTÃO	
MÓDULO	COMPONENTES	VOLUME
AMPLIFICAÇÃO	MISTURA DE PCR	2 FRASCOS COM 900 µL CADA
	ENZIMA RT	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 30µL CADA
	ÁGUA/DEPC ou RNase FREE	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 600 µL CADA
	SONDAS	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 180µL CADA
	INICIADORES	2 FRASCOS TRANSPARENTES COM 50µL CADA

Fonte: Bio-manguinhos, 2013.

A metodologia NAT nacional para HIV e HCV, tem como base a plataforma de PCR em tempo real. Os testes NAT foram desenvolvidos para detecção de ácido nucléico viral no período que precede a produção sistêmica de anticorpos: a fase inicial da infecção chamada de janela imunológica. Com este teste NAT, a janela imunológica será reduzida para 10 a 12 dias para HIV e HCV aumentando, assim, a segurança transfusional. A reação de amplificação é baseada em alvos RNA e, por isso mesmo, requer a etapa de transcrição reversa para a amplificação de vírus com genoma RNA (BIO-MANGUINHOS, 2013). O fluxo metodológico está representado na figura 11 abaixo:

Figura 11: Fluxo metodológico do KIT NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos (preparo das amostras em mini pool de seis ou individual; extração de ácido nucléico da amostra biológica -plasma; amplificação do ácido nudéico; detecção do mesmo por PCR em tempo real).



Fonte: Bio-Manguinhos, 2013.

4.1.3.A Projeto NAT HIV/HCV

O Projeto NAT é um projeto estratégico pioneiro de inovação tecnológica em saúde pública no Brasil, que se iniciou em 2004. Este projeto é desenvolvido por Bio-Manguinhos, em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), como uma demanda da Coordenação da Política de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (CPNSH/SAS/MS). Este desenvolvimento vem em resposta à portaria 112 de 29 de janeiro de 2004 do Ministério da Saúde que prevê a implantação no Brasil do teste NAT para a detecção de patógenos virais em unidades de doação de sangue e consequente aumento da segurança transfusional (PROJETO NAT MULTIPLEX HIV/HCV, 2010).

O desenvolvimento do NAT tem a participação ativa da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do MS, da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRAS), da ANVISA, e de serviços de hemoterapia como os hemocentros dos estados de Santa Catarina, Rio de Janeiro e Pernambuco, além dos parceiros de desenvolvimento já citados; através de um grupo técnico do NAT que se reúne periodicamente, para as tomadas de decisões de desenvolvimento do NAT, infra estrutura, viabilização técnica e financeira e implantação nas hemorrede (PROJETO NAT MULTIPLEX HIV/HCV, 2010).

Seguindo as normas internacionais de fabricação deste tipo de teste (NAT), estabelecidas por órgãos reguladores como o USFDA, o Paul Ehrlich Institute (Alemanha) e o NIBSC (Inglaterra), o NAT brasileiro foi desenvolvido com o intuito de maximizar a automação dos processos e atingir as metas estabelecidas de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e rastreabilidade. Aliou-se a isso a preocupação com a adaptabilidade à rotina dos laboratórios executores na hemorrede e o fácil manuseio e compreensão pelo usuário executor. Portanto, não se trata apenas de um kit, mas de uma plataforma de teste automatizada e capaz de oferecer confiabilidade de resultados e de rastreabilidade do sangue (PROJETO NAT MULTIPLEX HIV/HCV, 2010).

A validação do desenvolvimento do kit Nat HIV/HCV Brasileiro ocorreu inicialmente através da realização do Estudo Piloto, no qual foram processadas aproximadamente 5.000 reações no Hemocentro de Santa Catarina, entre amostras de doadores e também testes com painéis nacionais e internacionais de validação e proficiência. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a plataforma NAT se adequa a rotina de um serviço de hemoterapia, e foi capaz de detectar as amostras positivas evidenciadas pelos testes sorológicos, para qualquer dos vírus testados (PROJETO NAT MULTIPLEX HIV/HCV, 2010).

4.1.4 Imunocromatografia

Tradicionalmente, métodos cromatográficos e imunoensaios eram considerados métodos “concorrentes”. Os métodos cromatográficos são baseados no equilíbrio da concentração dos componentes de interesse, entre duas fases imiscíveis, onde uma é a fase estacionária enquanto a outra, a fase móvel, se move em uma direção definida. Dois dos métodos mais comuns de cromatografia são a

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High performance liquid chromatography*), e a cromatografia gasosa. Estes métodos cromatográficos permitem a separação dos componentes de uma mistura, detecção com alta sensibilidade e precisa reprodução. No entanto, tais métodos podem ser demorados, uma vez que são necessários procedimentos de purificação e pré tratamento antes das análises (PYO, YOO, 2013).

Ao contrário de métodos cromatográficos, os imunoenaios baseiam-se no reconhecimento específico entre anticorpos e antígenos para a detecção destes ou para medir baixa concentração de analitos. No entanto, os imunoenaios podem ser realizados apenas em laboratórios centralizados por intervenção de manual e treinamento técnico, e ambos os métodos necessitam de operação sofisticada para detecção das substâncias de interesse que não se adequam a pessoas comuns (PYO, YOO, 2013).

Nestas circunstâncias, alguns pesquisadores combinaram as vantagens dos métodos cromatográficos e imunoenaios e desenvolveram uma nova técnica como hífen entre os dois métodos, a imunocromatografia. O princípio é semelhante ao do ELISA, porém a reação imunológica é realizada no papel cromatográfico pela migração capilar. A nova técnica emerge como uma das mais convenientes e precisa técnica analítica (PYO, YOO, 2013).

4.1.4.A – Testes Rápidos DPP – Bio-Manguinhos

Os TR DPP Bio-Manguinhos são testes de triagem de uso único que se baseiam na tecnologia de imunocromatografia utilizando plataforma de duplo percurso (tira 1 e tira 2) (Figura 13). Seu uso é adequado em algoritmos de múltiplos testes para suporte ao diagnóstico clínico de AIDS, Sífilis, Leishmaniose Visceral Canina e Leptospirose, uma vez que os resultados reagentes evidenciam exposição aos agentes infecciosos. O TR DPP Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas (BIO-MANGUINHOS, 2011). Na figura 12 a apresentação do kit e seus componentes (Tampão de corrida, tampão de eluição, lanceta descartável, alça coletora, suporte imunocromatográfico e curativo).

Figura 12: TR DPP Bio-Manguinhos e seus componentes

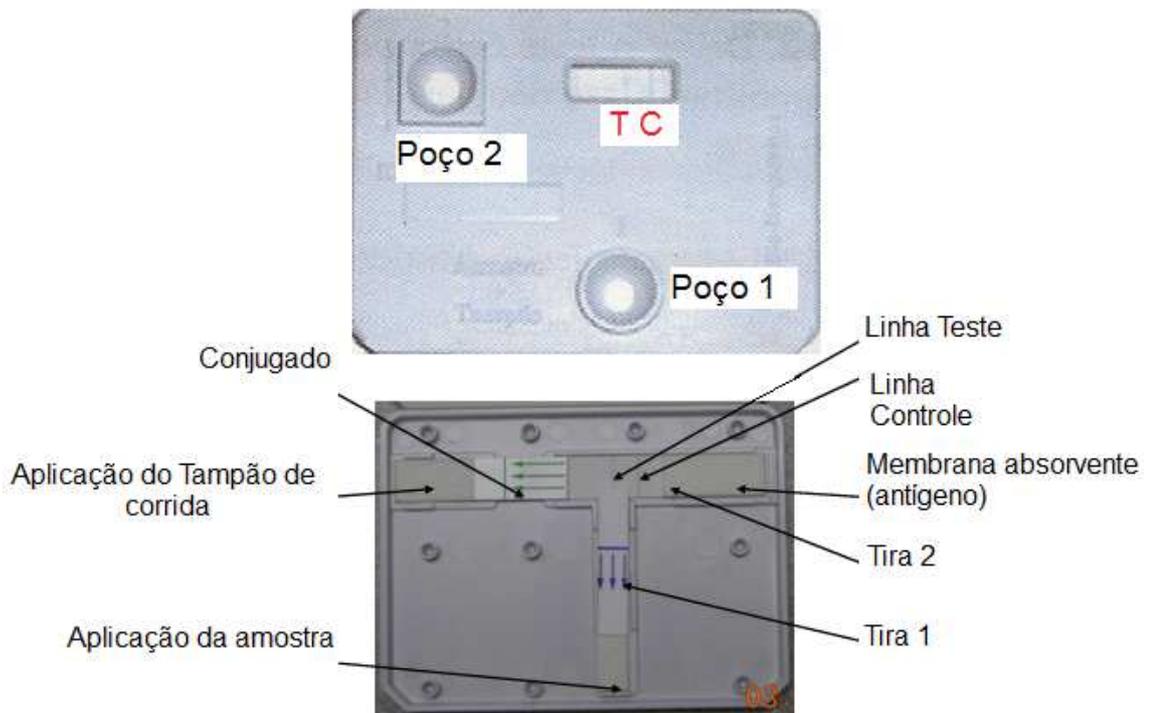


Fonte: Bio-Manguinhos, 2011.

O princípio do teste é a utilização de uma combinação de antígenos ligados a uma membrana (fase sólida), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal. A amostra (fluido oral, sangue venoso, plasma ou soro humano e plasma ou soro canino) é aplicada ao tampão de eluição seguida pela adição desta solução ao poço 1 do suporte do kit (BIO-MANGUINHOS, 2011). O suporte contendo a fita cromatográfica e o tampão estão representados na figura 13 e 14, respectivamente.

O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos presentes na amostra (caso positivo) aos antígenos. Após a migração da solução (tampão de eluição + amostra) ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar o tampão de corrida ao poço 2, que carreará o conjugado do suporte ao longo da membrana adsorvente. O conjugado se liga aos anticorpos específicos para antígeno de determinada doença produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE. Na ausência de anticorpos para o antígeno, a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE. Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE, o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Figura 13: Suporte imunocromatográfico do kit TR DPP Bio-Manguinhos, com representação das linhas Testes e Controle, poços 1 e 2 para a aplicação da amostra eluída e tampão de corrida, respectivamente; membrana absorvente e plataforma de duplo percurso (Tiras 1 e 2).



Fonte: Bio-Manguinhos, 2011.

Figura 14: Tampão de eluição do kit TR DPP Bio-Manguinhos



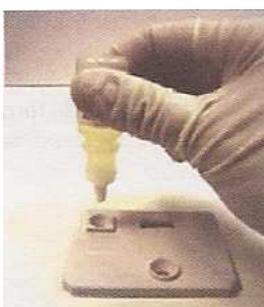
Fonte: Bio-Manguinhos, 2011.

4.1.4.B Imunoblot rápido DPP HIV ½

O teste Imunoblot rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos é um ensaio qualitativo para detecção de anticorpos específicos para a confirmação da infecção pelo HIV 1 e 2 em amostras de sangue total, soro ou plasma humano e se baseia na tecnologia de imunocromatografia, utilizando plataforma de duplo percurso de fluxo lateral. O kit utiliza uma combinação de antígenos de HIV-1 e HIV-2 ligados a uma membrana (fase sólida), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal (BIO-MANGUINHOS, 2010).

A amostra é aplicada ao poço 1 (Figura 15), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço 2. O conjugado se liga aos anticorpos específicos para HIV-1 ou HIV-2 produzindo uma ou mais linhas (roxa/rosa) na área do TESTE. Na ausência de anticorpos para HIV-1 ou HIV-2 as linhas (roxa/rosa) não aparecem na área do TESTE. Em todos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma tinha (roxa/rosa) na área de CONTROLE, o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Figura 15: Adição de Tampão de corrida após amostra no poço 1 do suporte do kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos.



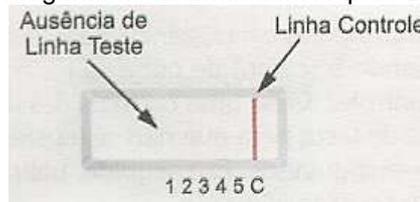
Fonte: Bio-Manguinhos, 2010.

Os resultados podem ser interpretados tanto visualmente ou com a ajuda de um leitor DPP. O kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos contém 5 linhas de teste assim identificadas no suporte de teste:

- Linha de Teste 1 = glicoproteína gp36 (HIV-2);
- Linha de Teste 2 = glicoproteína gp160 (HIV-1);
- Linha de Teste 3 = glicoproteína gp120 (HIV-1);
- Linha de Teste 4 = glicoproteína gp41 (HIV-1);
- Linha de Teste 5 = proteína p24 (HIV-1).

Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área CONTROLE e nenhuma linha nas áreas de Teste (Linhas Testes de 1 a 5), representado na figura 16. Este resultado sugere a ausência de anticorpos para HIV-1 e HIV-2 na amostra (BIO-MANGUINHOS, 2010).

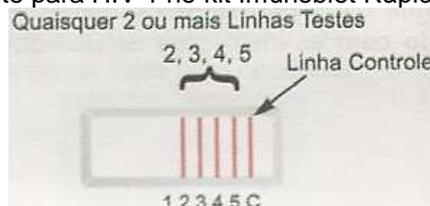
Figura 16: Resultado não reagente no kit Imunoblot Rápido DPP HIV1/2 Bio-Manguinhos



Fonte: Bio-Manguinhos, 2010.

Resultado reagente para HIV-1 (Figura 17) ocorre quando há detecção de quaisquer duas ou mais linhas na área de Teste dentre as linhas 2,3,4 ou 5, além de uma linha roxa/rosa na área C. A intensidade das linhas na área de Teste varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, as linhas na área de Teste podem ter aparência diferente da linha na área CONTROLE. Um teste reagente significa que anticorpos para HIV-1 foram detectados (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Figura 17: Resultado reagente para HIV-1 no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos

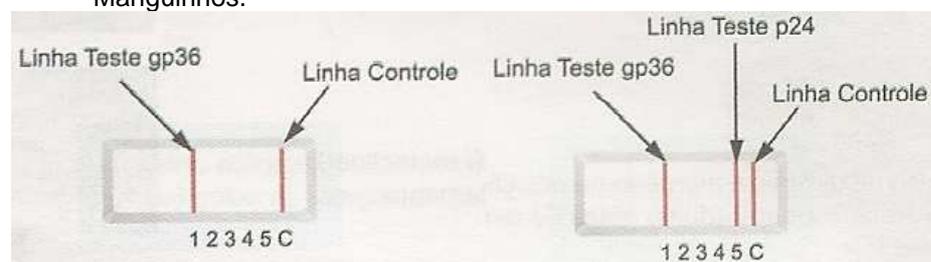


Fonte: Bio-Manguinhos, 2010.

Resultado reagente para HIV-2 ocorre quando há detecção de uma linha roxa/rosa correspondente a gp36 na área de Teste e outra linha na área de

CONTROLE. Eventualmente, em alguns casos de resultados reagentes para HIV-2, pode ser observada adicionalmente a presença da linha 1. A intensidade das linhas na área de Teste varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, as linhas na área de Teste podem ter aparência diferente da linha na área CONTROLE (BIO-MANGUINHOS, 2010). A figura 18 representa os testes reagentes para HIV-2, indicando que anticorpos foram detectados.

Figura 18: Resultados reagentes para HIV-2 no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio Manguinhos.



Fonte: Bio-Manguinhos, 2010.

Qualquer outro resultado com a observação de uma linha na área de CONTROLE e não obedecendo nenhum dos critérios mencionados anteriormente com relação à área de Teste caracterizada uma amostra indeterminada (Figura 19). Neste caso, recomenda-se a repetição do teste e, persistindo o resultado indeterminado, deve-se coletar uma nova amostra após quatro semanas para repetir o procedimento do teste (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Figura 19: Resultado indeterminado no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-Manguinhos

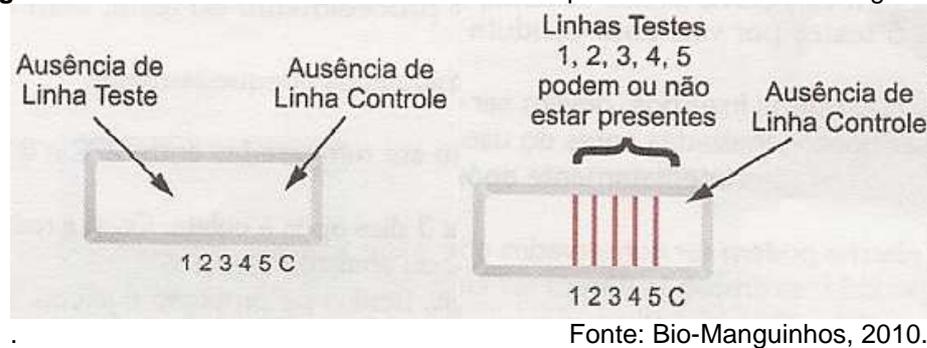


Fonte: Bio-Manguinhos, 2010.

Uma linha roxa-rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE, independente ou não de linhas na área de Teste. Caso a linha não seja visível na área CONTROLE, o teste deve ser considerado inválido (Figura 20), não podendo ser interpretado. Neste caso deve se repetir o procedimento de teste com um novo

suporte de teste e o Serviço de Atendimento ao Cidadão (SAC) de Bio-Manguinhos deve ser informado (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Figura 20: Resultado inválido no kit Imunoblot Rápido DPP HIV ½ Bio-manguinhos



4.1.5 Helm Test

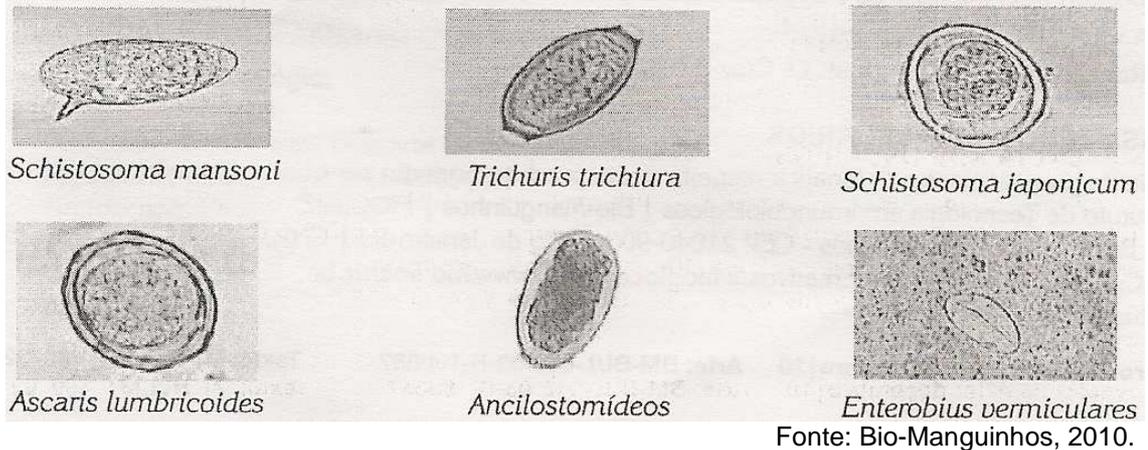
O HELM TESTE - Bio-Manguinhos é um teste qualitativo-quantitativo para detecção parasitológica em fezes. O teste se baseia na tecnologia do método de *Kato(I)*, modificado por *Katz* e colaboradores. O HELM TESTE é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas, permitindo revelar todos os ovos de helmintos que são encontrados nas fezes: os de *Ascaris*, *Schistosoma*, *Ancilostomideos*, *liichuris*, *Taenia* e mais raramente os de *Enterobius* e *Strongyloides* (BIO-MANGUINHOS, 2010).

O método de *Kato-Katz* utiliza microscopia ótica para exames parasitológicos de fezes na determinação qualitativa e quantitativa de ovos de helmintos. A metodologia consiste em uma tela que concentra o material a ser examinado, além de reter os detritos que dificultariam ou impediriam a visualização dos ovos de helmintos; uma lamínula a ser pré-colorida em solução diafanizadora e fixadora para permitir a conservação dos ovos e tornar o esfregaço transparente; uma placa perfurada especialmente desenhada, que faz com que sempre a mesma quantidade de fezes seja examinada, permitindo excelente padronização e observação de amostra suficiente de material. Preparado facilmente, o esfregaço de fezes pode ser examinado após curto espaço de tempo (aproximadamente 1 hora), ou guardado durante vários dias ou mesmo meses à temperatura ambiente, em condições de laboratório (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Para a leitura e interpretação dos resultados, utiliza-se microscópio ótico. Para a obtenção de resultados qualitativos, compara-se os ovos encontrados às figuras

na bula do kit. Para obtenção de resultados quantitativos, conta-se todos os ovos encontrados na preparação de cada uma das espécies de helmintos e determina-se o número total de ovos por grama de fezes (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Figura 21: Ovos de helmintos detectáveis no kit HELM TEST Bio-Manguinhos



4.1.6 Transferência de tecnologia

A transferência de tecnologia é o processo de transferência de descobertas científicas de uma organização para outra com a finalidade de um maior desenvolvimento e comercialização. O processo geralmente inclui identificação de novas tecnologias, proteção de tecnologias através de patentes e direitos autorais, formação de estratégias de desenvolvimento e comercialização, tais como marketing e licenciamento de empresas do setor privado existente ou a criação de novas empresas baseada em determinada tecnologia (POVOA, 2008).

Os reativos para diagnósticos TR DPP Bio-Manguinhos são transferências tecnológicas da empresa americana CHEMBIO assim como o kit NAT HIV/HCV, que apesar de possuir desenvolvimento interno em parceria com UFRJ e IBMP, possui uma transferência de tecnologia com a empresa alemã QIAGEN nos módulos de extração dos kits.

4.2 DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS – DEQUA

O DEQUA está localizado nas dependências do CTV de Bio-Manguinhos, no Centro Integrado Konosuke Fukai, que é composto pelos Departamentos de Controle e Garantia da Qualidade, Laboratório de Experimentação Animal e Departamento de Vacinas Virais.

O DEQUA analisa todos os produtos do Portifólio de Bio-Manguinhos: vacinas, diluentes, biofármacos e kits para reativos para diagnóstico. Adicionalmente, atua na análise de matérias primas, produtos intermediários, embalagens, qualificação de fornecedores, estudos de estabilidade, certificados de análise e liberação, avaliação de relatórios e documentos técnicos, controle de processo, desenvolvimento de novas metodologias, validação de métodos analíticos, entre outras atividades.

É composto pelos seguintes Laboratórios e Setores: Laboratório de Controle Microbiológico, Laboratório de Controle Físico-Químico, Setor de Controle Biológico, Setor de Controle de Reativos para diagnósticos, Setor de Meios de Cultura, Setor de Lavagem, Preparo e Esterilização de Materiais.

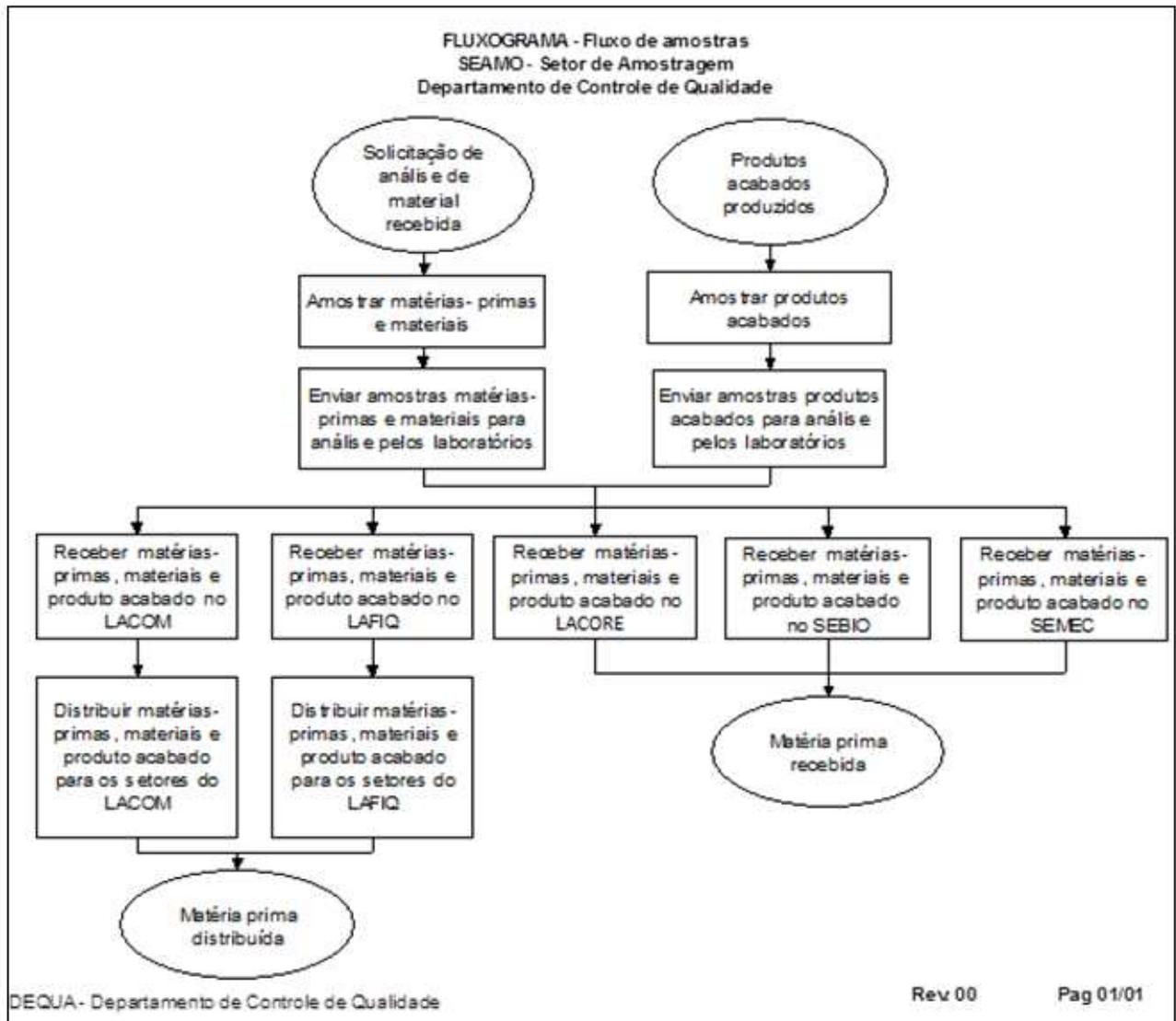
A entrada de pessoal no DEQUA é realizada pela área de acesso do Centro Integrado Konosuke Fukai, onde o visitante ou técnico do laboratório é recepcionado pelo porteiro. Somente funcionários lotados no DEQUA têm permissão automática de acesso às áreas internas do Departamento, outros profissionais, como técnicos de outras áreas da unidade ou membros das equipes de Auditorias Externas, como VISA, ANVISA ou OMS são considerados visitantes, sendo condicionada a sua entrada à autorização do gerente da unidade.

O fluxo de pessoal está descrito baseando-se no acesso a todas as áreas do DEQUA, incluindo todas as salas em um fluxo contínuo, à medida que as Salas aparecem ao longo dos corredores. Para o fluxo de saída do pessoal deve-se considerar o fluxo contrário ao descrito.

Passando pela Recepção e pelos vestiários feminino ou masculino, os funcionários do DEQUA vestem a paramentação estabelecida em Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) e seguindo pela Circulação C05 tem acesso aos Laboratórios e Setores do Departamento.

A Figura 22 representa os caminhos das amostras para análise no DEQUA pelo Setor de Amostragem (SEAMO).

Figura 22- Fluxograma de amostras responsável pela amostragem para todos os laboratórios do DEQUA.



Fonte: Documentos internos DEQUA.

4.2.1 Laboratório de Controle de Reativos – LACORE

O LACORE é responsável pela realização dos testes de CQ em todas as etapas do processo de produção dos kits de reativos para diagnósticos, conforme as BPL e BPF. Os kits são EIE LVC, IFI LH, IFI Chagas; TR DPP HIV-1/2, Imunoblot Rápido DPP, TR DPP Sífilis, TR DPP LVC, TR DPP Leptospirose; Kit NAT HIV / HCV; Helm Teste e insumos (conjugados Anti-Humano e Anti-Cão). As etapas do CQ

são: Controle de Processo de pré-kits, Controle do Produto Acabado e Análise de Matéria Prima (lâminas para IFI e placas para EIE).

Os kits podem ser analisados nos métodos IFI, ELISA , Imunocromatografia de Fluxo (Teste Rápido), método parasitológico Kato-katz para detecção de helmintos (Helm Teste) e Amplificação dos Ácidos Nucléicos (NAT) conforme cada especificação. Este último é realizado em um container que é o laboratório para a realização do seu CQ. O método Kato-Katz também tem o CQ realizado na área do DERED localizado no Pavilhão Rocha Lima. As exigências para a prática deste teste são facilmente atendidas, pois a sua análise consiste apenas em inspeção visual do produto (a embalagem e os seus componentes). As análises das demais técnicas são realizadas na sala C18 no DEQUA.

Após passar pelo SEAMO, onde o plano de amostragem para o controle de qualidade dos kits está representado na figura 23, e ser entregue ao LACORE, cada kit/matéria-prima/insumo é analisado com sorologias positivas e negativas padrões, específicas para cada doença, conhecidas como painéis. As amostragens recebidas são separadas e armazenadas, conforme o acondicionamento especificado no rótulo (2° a 8°C ou -20°C), nos *freezers* de suas respectivas salas. (Os testes relacionados com LVC são analisados e armazenados em equipamentos exclusivos para as doenças caninas).

Figura 23: Plano de amostragem para controle de qualidade de reativos

PLANO DE AMOSTRAGEM PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE REATIVOS						
➤ ELISA - 96 reações						
Quantidade Produzida	Pré-kit	Re-teste	Pd. Terminado	Re-teste	Arq. Memória	
até 50 kits	06 placas	06 placas	04 kits	04 kits	05 kits	
51 a 100 kits	08 placas	08 placas	06 kits	06 kits	07 kits	
101 a 200 kits	10 placas	10 placas	08 kits	08 kits	09 kits	
201 a 500 kits	12 placas	12 placas	10 kits	10 kits	11 kits	
➤ IFI Leishmaniose Humana e IFI Chagas						
Quant. Produzida	Pré-kit	Re-teste	Pd. Terminado	Re-teste	Arq. Memória	
até 100 kits	50 lâminas	50 lâminas	02 kits	02 kits	03 kits	
101 a 200 kits	50 lâminas	50 lâminas	04 kits	04 kits	05 kits	
201 a 500 kits	50 lâminas	50 lâminas	05 kits	05 kits	06 kits	
➤ KIT NAT HIV/HCV						
Análise Matéria Prima Módulo de Amplificação	Reteste	Amostra de Retenção Módulo de Amplificação	Controle de Processo - KIT	Produto Terminado	Reteste	Arquivo Memória
01 módulo	01 módulo	06 kits	01 kit	01 kit	01 kit	4 kits
➤ TR DPP IMUNOBLOT (20 REAÇÕES)						
Produto Terminado	Reteste	Arquivo Memória				
08 kits	08 kits	5 kits				
➤ TR DPP Leishmaniose Visceral Canina (20 REAÇÕES)						
Produto Terminado	Reteste	Arquivo Memória				
08 kits	08 kits	5 kits				
➤ TR DPP HIV1/2 SSP e FO (20 REAÇÕES)						
Produto Terminado	Reteste	Arquivo Memória				
08 kits	08 kits	05 kits				
➤ TR DPP SÍFILIS (20 REAÇÕES)						
Produto Terminado	Reteste	Arquivo Memória				
08 kits	08 kits	05 kits				

Fonte: Documentos internos DEQUA

Os painéis AEQ são amostras de soros produzidas a partir de plasma processado e se destinam a programas de controle de qualidade de produtos, de sorologia de laboratórios e hemocentros e são utilizados para controle interno.

As amostras de soro recebidas para a montagem dos painéis sorológicos são provenientes de Instituições Nacionais e da Seção de Processamento de Plasma (SEPLA), pertencente ao DEREED. Estas amostras são processadas, caracterizadas sorologicamente e envasadas, sendo, em seguida, enviadas ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) onde serão submetidas ao processo de validação e utilizadas no controle interno para as suas respectivas doenças.

Para o controle de qualidade dos kits de diagnósticos são empregados os painéis sorológicos em todas as metodologias em etapas do controle de processo e produto final dos TR, ELISA e IFI, controle de produto final dos demais kits, além da utilização nos estudos de estabilidade, validação dos métodos e atendimento ao SAC. Durante os testes de controle de qualidade, seja pelo controle interno ou externo, deve-se realizar uma etapa onde o kit é exposto a amostras caracterizadas para a doença a qual se deseja diagnosticar, tendo como objetivo avaliar os índices de sensibilidade e especificidade do produto em detectar a doença. Estes índices são calculados e precisam estar de acordo com os valores de referência definidos em conjunto entre desenvolvimento, produção e qualidade do kit.

Confirma-se, dessa forma, a sensibilidade do teste a fim de demonstrar o quanto o teste é sensível para encontrar a porcentagem de pacientes doentes com teste positivo em uma população sabidamente infectada. Para determinar a especificidade do teste é definida a porcentagem de indivíduos “normais” com teste negativo em população sabidamente identificada. Entende-se por indivíduo normal aquele que não é portador da doença para a qual o diagnóstico do teste é destinado. A especificidade pode ser influenciada por inúmeros fatores que levam a falsos resultados positivos, como por exemplo, indivíduos polinfetados por parasitas intestinais apresentam um somatório de componentes antigênicos que reagem cruzadamente com inúmeros antígenos - alvo dos testes sorológicos.

No entanto, a aquisição e o processamento de amostras para composição dos painéis sorológicos vêm sendo um grande percalço, estas amostras são imprescindíveis para a liberação de todos os kits, porém algumas não são encontradas para comercialização e outras são recebidas através de doações. Além disso, as amostras de soro precisam ser caracterizadas e de origem confiável, tendo

o LACORE à responsabilidade de captação e processamento destas amostras.

Além dos painéis AEQ, o LACORE também utiliza em suas análises os painéis Acrometrix, Zeptomatrix e Seracare, provenientes de transferência de tecnologia e adquiridos por importação. Em análises de controle do kit TR DPP, é necessário, em consonância aos painéis, a análise de sangues negativos específicos, previamente testados e aprovados como tal. As amostras de sangue são doadas pelo Hemocentro do Hospital Federal de Bonsucesso e retiradas semanalmente. Todas as análises são realizadas seguindo um protocolo de trabalho específico, assim como POP de limpeza de bancada e utilização de equipamentos, para a posterior liberação dos laudos.

4.2.1.A *Seção de Controle de Produtos Intermediários (SECPI)*

A SECPI é responsável por atender às demandas do controle de processo de todos os kits produzidos por Bio-Manguinhos nas cinco metodologias empregadas, além das análises de matéria prima, insumos e Pré-kits, validação concorrente, captação, análise e processamento de painel interno e orientação em treinamentos nas novas plataformas de TR DPP nos laboratórios pertencentes ao PNDST / AIDS do Ministério da Saúde.

4.2.1.A.1 *Análise de Matéria Prima:*

Microplacas Sensibilizadas para ELISA (uso nos kits de LVC e Doença de Chagas): após a análise, caso o resultado seja conforme, as amostras são liberadas para o uso na produção. Se não conforme, o DERED fará os ajustes necessários e novas amostras serão enviadas para o LACORE para reprocesso. Após as amostras serem reprocessadas (máximo 03 vezes), se conformes, a mesma será liberada para o uso no DERED. Se não conforme, deverá ser descartada. O laudo deve ser entregue ao SEAMO em ambos os casos.

Lâminas para IFI não sensibilizadas (para uso dos kits de LVC, LH e Chagas): após a análise, o resultado sendo conforme, a amostra é liberada para o uso na produção, sendo não conforme, a amostra será descartada. O laudo deve ser entregue para o SEAMO em ambos os casos.

4.2.1.A.2 Análise de Insumos:

Controle de Processo de Conjugado Anti-Humano e Anti-Cão para IFI e Tampões de corrida e eluição para TR DPP HIV ½, Sífilis, LVC e Leptospirose: após a análise, caso o resultado seja conforme, a amostra é liberada para o uso na produção dos Pré-kits. Se não conforme, o DERED fará os ajustes necessários e a amostra será reenviada para o LACORE para reprocesso. Após a amostra ser reprocessada (máximo 03 vezes), se conforme, a mesma será liberada para o uso no DERED para a produção dos kits. Caso o resultado seja não conforme, deverá ser descartada. O laudo deve ser entregue para o DERED em ambos os casos.

4.2.1.B Seção de Controle de Produto Final (SECPF)

A SECPF atende às demandas procedendo às análises dos controles de processo dos kits nas diversas metodologias empregadas no processo de produção. Além disso, dá sentido as atribuições do SECPF: a verificação e a informação às outras unidades envolvidas em todo o processo produtivo dos kits quanto às condições físicas e biológicas observadas no processo de controle, a emissão de laudos e protocolos das análises processadas, a condução e a execução de ensaios de estabilidade do produto e validação da metodologia empregada, o oferecimento suporte ao Serviço de Atendimento ao Consumidor, o cuidado com o descarte dos lixos (resíduos químico, biológico e perfurocortante), o planejamento e monitoramento dos materiais, a padronização e/ ou otimização das metodologias, elaboração das instruções de trabalho, o treinamento de capacitação de profissionais do MS nas metodologias utilizadas no controle da qualidade dos kits de diagnósticos (Coordenação Geral de Laboratórios do Programa DST/ AIDS) e outras competências que lhe forem depositadas em colaboração a outra Unidade Organizacional.

4.2.1.B.1 Análise do Produto Terminado:

Após a análise, caso o resultado seja conforme, o produto será liberado e serão retiradas as amostras de retenção que são armazenadas nas câmaras frias sob a responsabilidade do SEAMO, na finalidade de atender as análises periódicas como testes de estabilidade e de validação e reanálises para o SAC. Caso o produto esteja não conforme, deverá ser descartado. Em ambos os casos, o laudo deve ser

entregue ao DEQUA na sala C06.

4.2.1.B.2 Testes de Estabilidade:

Os testes de estabilidade são realizados em kits aprovados de Produto Terminado. Os produtos são TR DPP LVC, DPP Leptospirose, DPP Sífilis, DPP HIV, IFI Chagas e IFI LH. Estes kits são armazenados na Câmara Fria do DEQUA e/ ou nos equipamentos refrigerados (freezer -20°C e geladeira 2 a 8°C) do LACORE. Para os testes de estabilidade em tempo acelerado, uma parte é acondicionada em estufas do próprio laboratório em temperaturas de 30°C e 37°C. Inicialmente, estas análises são realizadas mensalmente, seguindo um cronograma onde a periodicidade das análises decai para trimestral, semestral e anual.

As análises devem ser feitas dentro do período de validade e após validade. O procedimento das análises segue conforme a metodologia descrita para IFI, ELISA, Ensaio Parasitológico, Imunocromatografia de Fluxo e Amplificação dos Ácidos Nucléicos.

4.2.1.B.3 Reanálises para SAC:

O Serviço de SAC do Departamento de Relações com o Mercado (DEREM) envia a ficha de reclamação ao LACORE. A análise é realizada exatamente de acordo com a necessidade do cliente. As possibilidades de atendimento partem de orientações e chegando a reanálises do lote em questão. Para a realização da reanálise deve-se avaliar um kit de retenção correspondente ao lote da reclamação (retido em Câmara Fria). Após a análise a ficha é reenviada ao DEREM com os devidos resultados das análises e os resultados são PROCEDENTES OU IMPROCEDENTES.

4.2.1.C Fluxo de descarte

4.2.1.C.1 Descarte de resíduos (lixo comum):

Os resíduos comuns gerados na sala de Reativos são acondicionados em sacos plásticos na cor preta, recolhidos no final do expediente e encaminhados pela Circulação até a Sala de Descarte pelos funcionários de limpeza do DEQUA.

Posteriormente esses resíduos são removidos para a Central de Descarte de

Bio-Manguinhos, conforme descrito em Procedimento Operacional Padronizado.

4.2.1.C.2 Descarte de resíduos biológicos

Os resíduos biológicos gerados são coletados em sacos plásticos de cor vermelha, lacrados e identificados com simbologia de risco biológico, em seguida encaminhados para autoclavação no Setor de Lavagem, Preparo e Esterilização.

Após descontaminação, o material devidamente identificado, é enviado através da Circulação para a Sala de Descarte, de onde seguem para a Central de Descarte de Bio-Manguinhos conforme descrito em Procedimento Operacional Padronizado.

4.2.1.C.3 Descarte de resíduos perfurocortantes

Os resíduos desse grupo são acondicionados em coletores específicos para materiais perfurocortantes, devidamente identificados. Os coletores são encaminhados para autoclavação no setor de Lavagem, Preparo e Esterilização.

Após a descontaminação, o resíduo perfurocortante devidamente identificado, é enviado através da Circulação para a Sala de Descarte, de onde seguem para a Central de Descarte de Bio-Manguinhos conforme descrito em POP.

4.2.1.C.4 Descarte de resíduos químicos

Os reagentes químicos gerados são coletados e segregados em bombonas devidamente identificadas de acordo com a natureza do produto. Os materiais são enviados nas bombonas fechadas da Sala de Reativos à Sala de Descarte, onde ficam segregados. À medida que cada bombona alcança 2/3 de sua capacidade de armazenamento, esses recipientes são transferidos sob a coordenação da Assessoria de Segurança do Trabalho e Meio Ambiente (AESTM) em viatura exclusiva para a Central de Descarte de Bio-Manguinhos, permanecendo segregados na Sala de Resíduos Químicos até remoção para destinação final, conforme descrito em POP.

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados de controle de qualidade levantados nesse trabalho e após observação dos documentos internos do Laboratório de Controle de Reativos / LACORE, foi denotado que Bio-Manguinhos cumpre rigorosamente com as diretrizes estabelecidas pela portaria 686, de 27/8/1998, que determina a necessidade de instituir e implementar as Boas Práticas de Fabricação para os estabelecimentos que fabriquem ou comercializem produtos para diagnóstico de uso "in vitro" e com a RDC 16/2013, da ANVISA, de modo a garantir a qualidade do processo de produção e o controle dos fatores de risco a saúde do consumidor.

A submissão dos kits a um rigoroso controle de qualidade, desde a matéria-prima ao produto acabado, confere confiabilidade e segurança nos resultados dos testes, sendo esta atividade realizada por uma equipe qualificada e compromissada, trabalhando de acordo com as normas vigentes de Qualidade, Biossegurança e Boas Práticas de Fabricação. A Unidade possui áreas exclusivas para controle de matérias primas e de produto acabado. Todo o descarte de resíduos é feito de acordo com as normativas de biossegurança adotadas pela Unidade.

Quanto aos testes de desempenho, os kits são submetidos a diversos níveis de monitoramento que incluem: análise de produto intermediário, pré-kit e produto acabado, além de avaliação adicional – em determinados casos - por uma Instituição externa à Fiocruz. Dessa forma, os kits reativos de diagnóstico produzidos nessa Unidade, possuem um alto padrão de qualidade, garantindo o acesso a métodos laboratoriais cada vez mais sensíveis, reforçando dessa forma a rede diagnóstica dos laboratórios centrais que compõem o SUS e contribuindo para enriquecer os boletins epidemiológicos anuais gerados pelo Programa Nacional de DST/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

6 REFERÊNCIAS

- ADRIANO, J.G.L. **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/ Síndrome da imunodeficiência adquirida**. Disponível em < www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/515.pdf > Acesso em 15 de julho de 2013.
- ALMEIDA, P.S.R., SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.29, n.4, p. 382-386, 2007.
- ALQUÉZAR et al, 2007. Desempenho de testes sorológicos para sífilis, treponêmicos (ELISA) e não treponêmicos (VDRL e RPR), na triagem sorológica para doadores de sangue – confirmação dos resultados por meio de três testes treponêmicos (FTA ABS, WB e TPHA). **Revista de Patologia Tropical**, v.32, n.3, p. 215-228, set./dez., 2007.
- ASKEW, I., BERER, M. A contribuição dos serviços de saúde reprodutiva e sexual à luta contra o HIV/AIDS: uma revisão. **Questões de saúde reprodutiva**, v.1, n.1. p. 11-38, 2006.
- AVELLEIRA, J.C.R., BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.2, p. 111-126, 2006.
- AZEVEDO, E.M.R. **Contribuição ao estudo epidemiológico da leishmaniose visceral canina por técnicas diretas e indiretas no município de Goiânia**. Trabalho de conclusão de Curso (Curso Superior em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. Goiânia, 2009.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológicos**, São Paulo, v.64, n.2, p. 175-177, jul./dez., 2002.
- BASTOS, F.I., CUNHA, C.B., HACKER, M.A. Sinais e sintomas associados às doenças sexualmente transmissíveis no Brasil, 2005. **Revista de Saúde Pública**, v.42, n. 1. P. 98-108, 2008.
- BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do kit EIE Leishmaniose visceral canina, 2014.
- BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do kit IFI Chagas, 2012.
- BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do kit HELM –TEST, 2010.
- BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do kit NAT HIV/HCV, 2013.
- BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do kit TR DPP HIV ½ SSP, 2011.

BIO-MANGUINHOS, Manual de Instrução de uso do TR DPP IMUNOBLOT RÁPIDO, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA –. RDC 16, DE 28 DE MARÇO DE 2013. **Regulamento técnico de boas práticas de fabricação de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso *in vitro***. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA –. RDC 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010. **Capítulo XVII – Boas práticas de controle de qualidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA –. PORTARIA N °686, DE 27 DE AGOSTO DE 1998, **Boas Práticas de Fabricação para os estabelecimentos que fabriquem ou comercializem produtos para diagnóstico de uso "in vitro"**, Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Estadual de Saúde. PORTARIA 1271 DE 06 DE JUNHO DE 2014. **Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis DST**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 142 p. Série manuals nº 68, 4ª edição.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008, 224 p. Série G. Estatística e Informação em Saúde.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 4. ed. ampl.–** Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 332 p. Série B Textos Básicos de Saúde

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Política nacional de promoção da saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. –** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. Série B. Textos Básicos de Saúde.

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-146, jan./dez., 2003.

BROD, C.S. et al. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito

sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.4, p. 294-300, jul./ago., 2005.

BROWN, K., PRESCOTT, J. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. **Canadian Medical Association or its licensors**, v.178, n.4, p.399-401, fev., 2008.

CAMARGO, L.A., CAPITÃO, C.G. **Uma abordagem histórica e conceitual da AIDS: Novas perspectivas, velhos desafios**, mar. 2009. Disponível em <<http://www.psicopedagogia.com.br/artigos/artigo.asp?entrID=1122>> acesso em 20 de agosto de 2013.

CARVALHEIRO, J.R. Epidemias em escala mundial e no Brasil. **Estudos Avançados**, v.22, n.64, p.7-17, 2008.

CAVALCANTI, M.P., LORENA, V.M.B., GOMES, Y.M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia tropical**, v.37, n.1, p. 1-14, jan./abr., 2008.

CÉSAR, I.C., PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2, abr./jun., 2009.

DIAS, J.C.P. Doença de chagas, ambiente, participação e Estado. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, p.165-169, 2001.

DIAS, J.P.D et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.3, p.296-300, mai./jun., 2008.

DOURADO, Z.F.D. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.3, p.205-214, set./dez., 2007.

EL-MOAMLY, A., EL-SWEIFY, M., HAFEEZ, M. Performance of rK39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.110, p. 349-354, 2012.

FERREIRA, D.S. **PROPOSTA DE IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE CAPTAÇÃO E PROCESSAMENTO DE PAINÉIS SOROLÓGICOS PARA UTILIZAÇÃO NA ROTINA DO LABORATÓRIO DE CONTROLE DE REATIVOS**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior em Gestão Industrial de imunobiológicos) – Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

FLORES, R.E. A Medicina Baseada em Evidências e o Diagnóstico Laboratorial. **NewsLab**, v.73, p.92-103, 2005.

FREIRE, C.C.M., LOBO, L.T.C., XIMENES, M.F.F.M. Uma abordagem bioinformática na avaliação da especificidade de antígenos utilizados em ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico da leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de**

Análises Clínicas, v.41, n.2, p.139-142, 2009.

FREITAS, J.C.C. et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p. 24-29, jan./fev., 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em <http://portal.fiocruz.br/> Acesso em 05 de março de 2013.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em <http://www.cdts.fiocruz.br/inctidn/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=112&Itemid=61> Acesso em 15 de março de 2013.

HOMMA, A., MOREIRA, M. Novos desafios para capacitação tecnológica nacional de vacinas: inovação tecnológica autóctone e transferência de tecnologia. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.238-239, fev., 2008.

KOMKA, M.R., LAGO, E.G. Sífilis congênita: notificação e realidade. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v.17, n.4, p. 205-211, out./dez., 2007.

LEITE, R.S. et al. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.20, n.1, p. 36-41, jan./mar., 2011.

LE MOS, E.M. et al. Avaliação do Teste Rápido Utilizando o Antígeno Recombinante k39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p. 36-38, 2003.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

LUNARDELLI, A. et al. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.2, p.139-141, 2007.

MEIRELLES, A. et al. **Aplicação de uma metodologia de modelagem de processos de controle de qualidade: um estudo em uma empresa do setor farmacêutico**. XXVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, Rio de Janeiro, 13 a 16 de outubro de 2008.

MILANEZ, H., AMARAL, E. Por que ainda não conseguimos controlar o problema da sífilis em gestantes e recém-nascidos? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v.30, n.7, p. 325-327, 2008.

MOREL, C.M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Caderno de Saúde**

Pública, Rio de Janeiro, v.22, n.8, p.1522-1523, ago., 2006.

OLIVEIRA, F.C.S. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.539-546, out./dez., 2009.

OLIVEIRA, D.S.C., GUIMARÃES, M.J.B., MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para a leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, v.38, n.1, p.17-26, jan./mar., 2009.

PALMIGIANI, A.L.M.L. **A Vice Diretoria de Qualidade de Bio-Manguinhos**. Dissertação (Mestrado em Gestão de Imunobiológicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

PARKER, R., JUNIOR, K.R.C. Pobreza e HIV/AIDS: aspectos antropológicos e sociológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p. 89-102, 2000.

PINTO, A.Y.N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudos de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.6, p.602-6014, nov./dez., 2008.

PÓVOA, L.M.C. **Patentes de universidades e institutos públicos de pesquisa e a transferência de tecnologia para empresas no Brasil**. Tese (Doutorado em Economia do Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional) – Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

PROJETO NAT MULTIPLEX HIV/HCV. **Relatório Técnico do Projeto**. Bio-Manguinhos, 21 p. julho 2009 – julho 2010.

PYO, D., YOO, J. New trends in fluorescence immunochromatography. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.33, n.2, p. 203-222, abr., 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A.S. **Confecção de painel sorológico para controle da qualidade de conjuntos de diagnósticos para detecção do anti-HIV**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

RIBEIRO, F.C. et al. Use os ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 5, p. 283-289, set./out., 2011.

RIBEIRO, F.A.L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SANTOS, J.M.L. et al. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p.41-45, jan./fev., 2010.

SOUZA, R.F., AMOR, A.L.M. Controle de Qualidade de técnicas realizadas nos laboratórios de parasitologia da Secretaria Municipal de Saúde do Município de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.2, p. 101-106, 2010.

TASSINARI, W.S. et al. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.6, p. 1721-1729, nov./dez., 2004.

VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações**. Disponível em < www.etallcorp.xpg.com.br/aula1b.pdf > Acesso em 25 de setembro de 2013.

WALDVOGEL, F.A. Infectious diseases in the 21 st century: old challenges and new opportunities. **International Journal of Infectious Diseases**, v.8, p.5-12, 2004.

WERNECK, G.L., HASSELMANN, M.H., GOUVÊA, T.G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciências e Saúde Coletiva**, v.16, n.1, p.39-62, 2011.