

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Gabriella Pires da Silva Macedo

**REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO DESTINADO AO  
CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA  
DOENÇA DE CHAGAS.**

Rio de Janeiro

2019

Gabriella Pires da Silva Macedo

**REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO DESTINADO AO  
CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA  
DOENÇA DE CHAGAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

**Tutora:** Dra. Marisa Coelho Adati

**Preceptora:** Dra. Helena Guedes Borges

Rio de Janeiro

2019

## Catlogação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Macedo, Gabriella

REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO  
DESTINADO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS. /  
Gabriella Macedo. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.  
68 f. : fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde  
na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de  
Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em  
Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em  
Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Tutora: Marisa Adati.  
Preceptora: Helena Borges.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Painel  
sorológico. I. Título.

REVALIDATION OF THE POSITIVE SOROLOGICAL PANEL INTENDED  
FOR THE QUALITY CONTROL OF KITS FOR SOROLOGICAL  
DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE.

Gabriella Pires da Silva Macedo

**REVALIDAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO DESTINADO AO  
CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA  
DOENÇA DE CHAGAS.**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

---

Álvaro Da Silva Ribeiro (Mestre)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

---

Lúcia Maria Corrêa Werneck (Doutora)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

---

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges (Doutora - Suplente) - (Preceptora)

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Dedico esse trabalho à Deus por me ajudar nas dificuldades e me ensinar tolerância. À minha família pelo apoio, paciência e confiança. E especialmente ao meu amado avô Antônio Pires (*In memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo milagre da vida e pela oportunidade de chegar até aqui através da sua Misericórdia e Graça.

Ao meu esposo, Wendell Oliveira, por todo amor compartilhado durante esses dois anos de crescimento profissional, pelo apoio, pelo ombro amigo e pelos ouvidos emprestados com atenção em cada desabafo. Te agradeço por sempre acreditar em mim e me fazer ver o mundo pelo lado melhor. Amo você.

Aos meus pais, Simone e Jaime, por toda a minha estrutura e base desenvolvidas devido a criação cheia de amor, carinho, respeito e disciplina. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelo suporte, pelo apoio e principalmente pelos conselhos e ensinamentos. Amo vocês.

Ao meu irmão, Victor Hugo, que me estimula a ser cada vez melhor em todas as áreas da minha vida. Obrigada pela cumplicidade, pelo carisma, pela atenção e pelas risadas. Amo você.

Aos meus avós, Ignês e Antônio (*in memoriam*), que são os meus maiores tesouros. Vô lembro-me de quando eu era mais nova e passávamos na Av. Brasil, você apontava para o Castelo da Fiocruz e me dizia “você vai trabalhar lá dentro”, aqui estou vovô, obrigada por acreditar até quando eu não acreditava mais. Amo vocês.

Aos meus sogros, Fátima e Lúcio, por todo suporte ofertado nessa caminhada e pelo carinho. Amo vocês.

Às minhas amigas da residência, Jéssica, Raphaela, Thaís e Yasmin. Tenho certeza que não teria sido tão legal sem vocês. Obrigada por cada risada, por cada palavra de carinho, pelo apoio, pela cumplicidade e principalmente por serem minhas confidentes. Apesar de sermos muito diferentes entre nós, essa parceria deu super certo. Amo vocês.

Agradeço às minhas companhias diárias do trajeto de ida e volta do trabalho para casa, Santos e Jéssica. Obrigada pelos nossos momentos musicais, risadas, atalhos (alguns perigosos rs), pelas esperas e pela amizade que surgiu entre nossas famílias.

Um agradecimento especial à equipe da Secretaria de Vigilância Sanitária do Município do Rio de Janeiro. Obrigada pelas experiências adquiridas no período de

aprendizado que passamos com vocês, principalmente aos amigos da Saúde do Trabalhador, que ensinaram muito mais que conteúdo, ensinaram sobre humanidade, sobre SER mais humano.

Ao CEREST 2, Centro de Referência em Saúde do Trabalhador, vocês foram a equipe mais profissional que eu tive contato. Obrigada por todo ensinamento, pelo tratamento igual, pela valorização pessoal e profissional. Tenham certeza que trabalhar com vocês foi um diferencial em várias áreas da minha vida. Obrigada Isabel, André, Daphne, Márcia e Dry, vocês são incríveis.

Aos colegas do Laboratório de Sangue e Hemoderivados pelo acolhimento. Obrigada por me receber e permitir meu desenvolvimento profissional.

À Dra. Marisa Adati pela orientação, pelos conselhos em forma de broncas e pelos ensinamentos diante de sua vasta experiência na área.

À Dra. Helena Guedes, obrigada pela orientação, pelas correções, pelas dúvidas atendidas, pela atenção, pela paciência em ensinar e explicar de novo e mais uma vez. E obrigada pela inserção das músicas da atualidade.

Ao Me. Álvaro Ribeiro pela orientação, pelos ensinamentos, pelas aulas laboratoriais e pelas diversas caronas.

À Dra. Lúcia Werneck pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa e pelo anseio em contribuir de maneira positiva com o meu trabalho de conclusão.

À banca examinadora pela disponibilidade em estudar e analisar meu trabalho de conclusão de curso, obrigada pela contribuição de forma positiva.

Ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro.

Ao INCQS, instituição que permitiu meu aperfeiçoamento profissional.

À pós-graduação pelo apoio durante o curso.

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama



## RESUMO

A Doença de Chagas é de origem parasitária e foi descoberta no início do século XX, pelo cientista Carlos Chagas. Conhecida como tripanossomíase americana, a patologia é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que tem como hospedeiro invertebrado o barbeiro, *Triatoma infestans*. A transmissão ocorre na forma tripomastigota metacíclica do *T. cruzi* que é eliminada nas fezes e urina do triatomíneo infectado, que ao entrar em contato com a pele, através de lesões ou arranhaduras, invade as células mais próximas e toma a forma amastigota para multiplicar-se por divisão binária. A infecção apresenta-se na fase aguda, que é caracterizada por alta parasitemia e a fase crônica, com queda da parasitemia e aumento do nível de anticorpos IgG. O diagnóstico na fase aguda é realizado por métodos parasitológicos, enquanto que a fase crônica é feita a partir de testes sorológicos baseando-se na detecção de imunoglobulinas específicas contra o *T. cruzi*. Os testes empregados no diagnóstico sorológico da doença, de acordo com a Resolução RDC nº 36/2015, pertencentes à classe de risco IV, possuem a obrigatoriedade de registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e também está previsto a análise prévia de tais produtos. A qualidade e eficiência desses produtos são avaliadas frente a painéis sorológicos compostos por amostras verdadeiras positivas e negativas. Dessa forma, o objetivo desse estudo é revalidar o painel sorológico verdadeiro positivo para a Doença de Chagas do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, realizando um levantamento dos protocolos de análise de diferentes kits para diagnóstico da Doença Chagas aprovados entre janeiro de 2010 e dezembro 2015. Foram selecionados 45 kits para diagnóstico da doença nas metodologias ELISA, Teste Rápido e Imunofluorescência Indireta, Aglutinação e Quimiluminescência. Atualmente, o painel positivo para Chagas, utilizado na avaliação dos kits de diagnóstico para fins de registro é constituído por 76 amostras validadas. Diante do levantamento de dados foram estabelecidos critérios para a revalidação do painel caracterizado como verdadeiro positivo, são eles: Positividade em: dois Testes Rápidos; três Ensaio de Imunofluorescência Indireta; um Testes de Aglutinação; cinco Ensaio Imunoenzimáticos, dois Testes de Hemaglutinação, três Ensaio de Quimiluminescência para revalidar as amostras como verdadeiro positivas, além

disso, o volume das amostras será usado como critério, que deverá ser no mínimo 10 mL para continuar compondo o painel. A partir desses critérios o painel sorológico será revalidado e utilizado nas análises prévias, fiscais e controles dos kits destinados a detecção da Doença de Chagas.

Palavras-Chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Painel sorológico.

## ABSTRACT

Chagas disease is of parasitic origin and was discovered at the beginning of the 20th century by the scientist Carlos Chagas. Known as American trypanosomiasis, the disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which has as its main host *Triatoma infestans*. Transmission occurs in the metacyclic trypomastigote form of *T. cruzi* which is eliminated in the feces and urine of the infected triatomine, which upon contacting the skin through lesions or scratches, invades the nearest cells and takes the amastigote form to multiply by binary division. The infection occurs in the acute phase, which is characterized by high parasitemia and chronic phase, with a decrease in parasitemia and an increase in the level of IgG antibodies. Diagnosis in the acute phase is performed by parasitological methods, while the chronic phase is based on serological tests based on the detection of specific immunoglobulins against *T. cruzi*. The tests used in the serological diagnosis of the disease, according to Resolution RDC No. 36/2015, belonging to risk class IV, are required to be registered with the National Sanitary Surveillance Agency and it is also foreseen the prior analysis of such products. The quality and efficiency of these products are evaluated against serological panels composed of true positive and negative samples. Thus, the objective of this study is to revalidate the true positive serological panel for Chagas disease from the Blood and Hemoderivative Laboratory (LSH) of the National Institute of Health Quality Control, conducting a survey of protocols for the analysis of approved Chagas' kits between January 2010 and December 2015. We selected 45 kits for diagnosis of the disease in the ELISA, Fast Test and Indirect Immunofluorescence, Agglutination and Chemiluminescence methodologies. Currently, the positive Panel for Chagas, used in the evaluation of diagnostic kits for registration purposes, consists of 76 validated samples. Before the data collection were established criteria for the revalidation of the panel characterized as true positive, they are: Positivity in: two Rapid Tests; three Indirect Immunofluorescence Assays; one Agglutination Tests; two Hemagglutination Tests, three Chemiluminescence Assays to revalidate the samples as true positive, in addition, we will also use as criterion the volume of the samples, which should be at least 10 mL to continue composing the panel. Based on these criteria, the serological panel

will be revalidated and used in the previous, fiscal and control analyzes of kits for the detection of Chagas Disease.

Key words: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Serological panel.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Trypanosoma cruzi</i> em sua forma tripomastigota no sangue.....                               | 18 |
| Figura 2 - Forma amastigota do <i>T. cruzi</i> . .....   | 19 |
| Figura 3 - Forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> (A) e Forma Tripomastigota do <i>T. cruzi</i> (B).<br>..... | 20 |
| Figura 4 - Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> no vetor e no hospedeiro vertebrado.....                       | 21 |
| Figura 5 - Triatomíneo transmissor da Doença de Chagas.....  | 22 |
| Figura 6 - Regiões endêmicas da Doença de Chagas. ....   | 25 |
| Figura 7 - Gota espessa com achado de parasita.....  | 27 |
| Figura 8 - Demonstração da metodologia de ELISA. ....  | 28 |
| Figura 9 - Microplaca de 96 poços utilizada para ELISA.....  | 28 |
| Figura 10 - Reação de Hemaglutinação. ....   | 29 |
| Figura 11 - Microplaca com ensaio de Hemaglutinação.....   | 29 |
| Figura 12 - Microplaca na análise do teste de Aglutinação. ....  | 30 |
| Figura 13 - Esquematização da metodologia de Quimiluminescência. ....  | 30 |
| Figura 14 - Esquematização da reação de IFI positiva. ....   | 31 |
| Figura 15 - Reação de Imunofluorescência Indireta positiva, com antígeno de <i>T. cruzi</i> .<br>.....       | 31 |
| Figura 16 - Interpretação de teste rápido. ....  | 32 |
| Figura 17 - Respostas reativas e não reativas utilizando a metodologia de teste rápido.<br>.....             | 32 |
| Figura 18 - Caderno de registro do LSH do ano de 2010.....   | 37 |
| Figura 19 - Página do caderno onde os produtos são registrados com as informações pertinentes a ele. ....    | 37 |
| Figura 20 - Tabela usada como ferramenta para esse estudo.....   | 40 |
| Figura 21 - Distribuição dos resultados analíticos. ....   | 43 |
| Figura 22 - Distribuição das metodologias utilizadas no estudo.....  | 44 |
| Figura 23 - Quantitativo dos protocolos analisados por metodologia. ....                                     | 45 |
| Figura 24 - Resultados para o critério para revalidação referente aos Testes Rápidos. ....                   | 50 |
| Figura 25 - Critério de revalidação referente a metodologia de Quimiluminescência.<br>.....                  | 51 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 26 - Critério de revalidação referente a metodologia de Aglutinação.....    | 52 |
| Figura 27 - Critério de revalidação referente a metodologia de Hemaglutinação..... | 53 |
| Figura 28 - Porcentagem de amostras discordantes em cada metodologia.....          | 55 |
| Figura 29 - Revalidação das amostras.....  | 55 |
| Figura 30 - Critério de revalidação referente ao critério de volume.....           | 57 |
| Figura 31 - Resultado final do estudo de revalidação. ....                         | 58 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Levantamento dos dados dos cadernos de kits de diagnóstico no período de 2010 a 2015. .... | 42 |
| Tabela 2 - Formatação da planilha criada para gerar os primeiros resultados desse estudo. ....        | 43 |
| Tabela 3 - Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de ELISA....                       | 46 |
| Tabela 4 - Exemplo da tabulação dos dados referentes a metodologia de Quimiluminescência. ....        | 46 |
| Tabela 5 - Exemplo da tabulação dos dados referentes as metodologias qualitativas. ....               | 47 |
| Tabela 6 - Exemplo da tabulação dos dados referentes a metodologia de Teste Rápido.....               | 48 |
| Tabela 7 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para o Teste Rápido.....             | 49 |
| Tabela 8 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para Quimiluminescência. ....        | 50 |
| Tabela 9 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para Aglutinação. ....               | 52 |
| Tabela 10 - Amostras que não atenderam ao critério de Revalidação para o Hemaglutinação. ....         | 53 |
| Tabela 11 Amostras que não atenderam aos critérios de revalidação estabelecidos. ....                 | 54 |
| Tabela 12 - Amostra que não atendeu ao critério de revalidação para o teste rápido. ....              | 56 |

## LISTA DE SIGLAS

|         |  |
|---------|--|
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária             |
| CO      | <i>Cut-Off</i>                                       |
| DI      | Departamento de Imunologia                           |
| DO      | Densidade Óptica                                     |
| ELISA   | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>             |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz                                |
| HIV     | Vírus da Imunodeficiência Humana                     |
| IFI     | Imunofluorescência Indireta                          |
| INCQS   | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| LA      | Laudo de Análise                                     |
| LSH     | Laboratório de Sangue e Hemoderivados                |
| OMS     | Organização Mundial da Saúde                         |
| RDC     | Resolução da Diretoria Colegiada                     |
| USP     | Universidade de São Paulo                            |
| VISA    | Vigilância Sanitária                                 |
| WHO     | World Health Organization                            |



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>1.1 Histórico de Chagas</b> .....                                  | <b>17</b> |
| <b>1.2 Agente etiológico</b> .....                                    | <b>18</b> |
| 1.2.1 Morfologia.....   | 18        |
| 1.2.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no vetor .....                 | 20        |
| 1.2.3 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado ..... | 21        |
| <b>1.3 Transmissão</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>1.4 Sintomatologia</b> .....                                       | <b>23</b> |
| <b>1.5 Epidemiologia</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>1.6 Diagnóstico laboratorial</b> .....                             | <b>26</b> |
| 1.6.1 Diagnóstico na fase aguda da Doença de Chagas .....             | 26        |
| 1.6.2 Diagnóstico na fase crônica da Doença de Chagas .....           | 27        |
| <b>1.7 Regulamentação</b> .....                                       | <b>33</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3 OBJETIVO</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>3.1 Objetivos específicos</b> .....                                | <b>35</b> |
| <b>4 METODOLOGIA</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4.1 Local dos procedimentos e análises</b> .....                   | <b>36</b> |
| 4.1.1 Painel positivo verdadeiro para Doença de Chagas .....          | 36        |
| <b>4.2 Identificação dos cadernos usados na coleta de dados</b> ..... | <b>36</b> |
| <b>4.3 Seleção dos kits para análise</b> .....                        | <b>38</b> |
| 4.3.1 Identificação das metodologias .....                            | 38        |
| <b>4.4 Seleção e análise dos protocolos</b> .....                     | <b>38</b> |
| <b>4.5 Tabulação e avaliação dos dados</b> .....                      | <b>39</b> |
| <b>4.6 Critérios adotados para revalidação</b> .....                  | <b>40</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                 | <b>42</b> |
| <b>5.1 Seleção da amostragem</b> .....                                | <b>42</b> |
| <b>5.2 Identificação das metodologias sorológicas</b> .....           | <b>43</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>5.3 Identificação dos protocolos analíticos</b> .....  | 45 |
| <b>5.4 Análise dos protocolos e tabulação dos resultados das amostras</b> .....                     | 45 |
| <b>5.5 Critérios de revalidação</b> .....   | 48 |
| 5.5.1 ELISA .....   | 49 |
| 5.5.2 Teste Rápido .....  | 49 |
| 5.5.3 Testes de Quimiluminescência.....   | 50 |
| 5.5.4 Imunofluorescência .....  | 51 |
| 5.5.5 Aglutinação.....  | 51 |
| 5.5.6 Hemaglutinação.....   | 52 |
| <b>5.6 Revalidação das amostras verdadeiro positivas</b> .....                                      | 53 |
| 5.6.1 Amostras com resultados discordantes .....  | 53 |
| <b>5.7 Fatores que influenciam nos resultados analíticos</b> .....                                  | 55 |
| <b>5.8 Volume das amostras</b> .....  | 56 |
| <b>5.9 Resultado final</b> .....  | 57 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....  | 59 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 60 |
| <b>APÊNDICE A – PLANILHA FINAL UTILIZADA COMO FERRAMENTA PARA A REVALIDAÇÃO (continuação)</b> ..... | 64 |
| <b>APÊNDICE B – PLANILHA FINAL DAS AMOSTRAS NÃO REVALIDADAS</b> .....                               | 68 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta no início do século XX pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em Lassance, norte do estado de Minas Gerais, onde se observou a presença do hematófago *Triatoma infestans*, vulgarmente conhecido como “barbeiro”. Através de estudos realizados por Carlos Chagas a partir de 1909 foi possível identificar que alguns desses insetos hospedavam um protozoário flagelado no intestino posterior. Esses triatomíneos infectados foram enviados para o Rio de Janeiro para fins de estudo e colocados em contato com uma espécie de primata, o sagui (*Callithrix penicilata*), que foi submetido a diversas picadas dos insetos. Após o período de aproximadamente 30 dias pode-se identificar no sangue periférico do animal uma nova espécie de tripanosomas, que na época foi chamada *Schizotrypanum cruzi* e hoje é denominada *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; LEWINSOHN, 1979).

Outro fato importante destacado nessa pesquisa realizada com utilização dos barbeiros infectados por *T. cruzi*, foi a infecção de outras espécies como cobaias, coelhos, cães e outros macacos onde o parasita flagelado mostrou-se patogênico e circulante no sangue periférico dos animais (CHAGAS, 1909).

A partir de sua descoberta, Carlos Chagas pode descrever sobre os aspectos da doença, comportamento, característica do agente etiológico, transmissores, sintomatologia e patogenia do novo protozoário baseada na observação da população da região endêmica, principalmente em crianças, como relatado em seu trabalho publicado no início do século XX (CHAGAS, 1911).

Atualmente, a tripanossomíase americana é classificada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como uma doença negligenciada, sendo endêmica em populações pobres da África, Ásia e América Latina (WHO, 2012). Esse quadro é resultado, principalmente, da falta de saneamento básico que contribui para a disseminação de diversas doenças negligenciadas, entre elas, a Doença de Chagas.

Segundo relatos de Carlos Chagas, os insetos habitavam durante o dia nas paredes das moradias precárias feitas de materiais como palha, barro, criando um ambiente propício para a proliferação do barbeiro, principalmente em áreas rurais.

Ou seja, este quadro apresenta-se intimamente relacionado às condições sociais e econômicas da região endêmica, por esse motivo, a Doença de Chagas tem grande impacto na Saúde Pública (CHAGAS, 1913).

## 1.2 Agente etiológico

Em 1939, o agente etiológico da Doença de Chagas teve sua primeira revisão taxonômica realizada por Carlos Chagas, mudando de *Schizotrypanum cruzi* para *Trypanosoma cruzi* (MELLO, 2009). O protozoário *Trypanosoma cruzi* caracteriza-se principalmente pela presença de flagelo, conforme ilustrado na Figura 1, pertence à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida e apresenta uma organela chamada cinetoplasto, que fica localizada próxima ao ponto de origem do flagelo e está relacionado com o fornecimento de energia para a movimentação do protozoário, devido a essa função o cinetoplasto é considerado como mitocôndria especializada (BRENER, 1963).

Figura 1 - *Trypanosoma cruzi* em sua forma tripomastigota no sangue



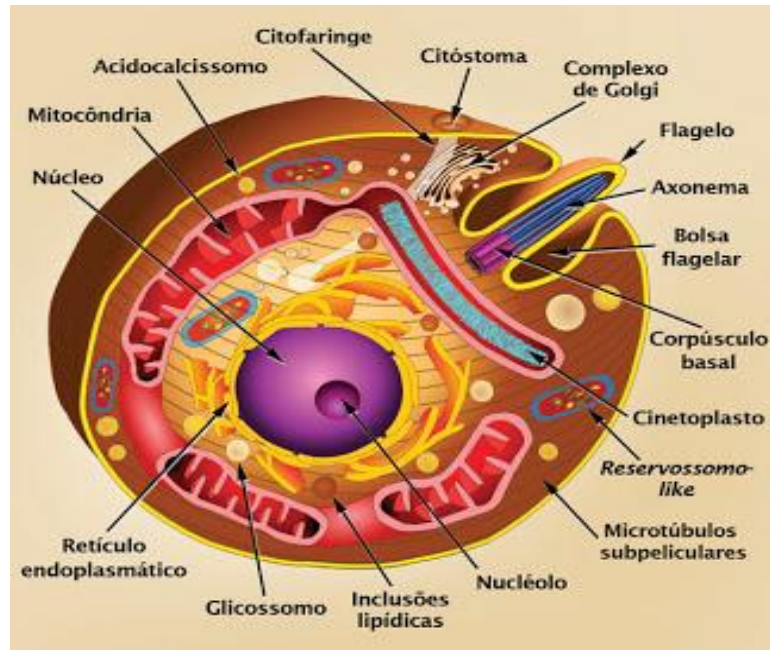
Fonte: <https://www.todamateria.com.br/trypanosoma-cruzi>

### 1.2.1 Morfologia

O ciclo de vida do *T. cruzi* acontece em três formas evolutivas que são diferenciadas pelo posicionamento do cinetoplasto levando em consideração o núcleo da célula e a origem do flagelo. A forma amastigota, ilustrada na Figura 2, é representada por organismos arredondados, se multiplica por divisão binária dentro

das células hospedeiras. Esse estágio evolutivo é característico da fase crônica da doença (BRENER, 1963).

Figura 2 - Forma amastigota do *T. cruzi*.



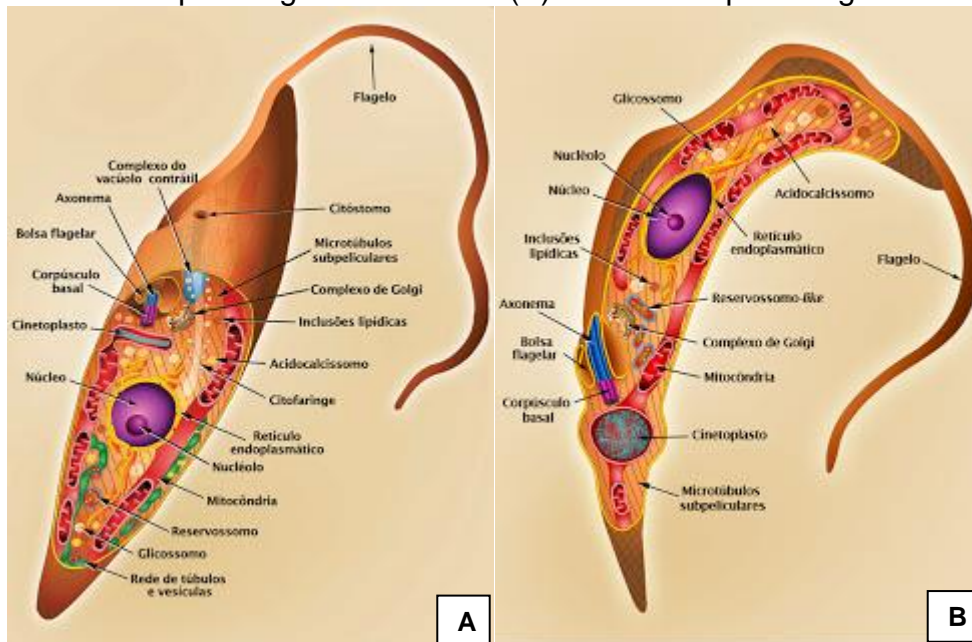
Fonte: [chaguismo.blogspot.com/2013/08/formas-de-desenvolvimento.html](http://chaguismo.blogspot.com/2013/08/formas-de-desenvolvimento.html)

Nesta fase evolutiva o cinetoplasto está localizado entre o núcleo, que apresenta o tamanho relativamente grande, e o flagelo encontra-se reduzido.

A forma epimastigota é caracterizada por ser extracelular, de morfologia alongada e com potencial de replicação através de divisão binária no vetor, especificamente no intestino médio dos triatomíneos.

Nesse estágio evolutivo pode-se observar que o cinetoplasto e a bolsa flagelar encontram-se em posição anterior ou próxima ao núcleo e o posicionamento de origem do flagelo acontece de forma lateral, como demonstrado na Figura 3A (BRENER, 1963).

Figura 3 - Forma epimastigota do *T. cruzi* (A) e Forma Tripomastigota do *T. cruzi* (B).



Fonte: [chaguismo.blogspot.com/2013/08/formas-de-desenvolvimento.html](http://chaguismo.blogspot.com/2013/08/formas-de-desenvolvimento.html)

A forma tripomastigota, demonstrada na Figura 3B, caracteriza-se por ser a fase extracelular circulante no sangue, presente na fase aguda da doença e potencialmente infectante aos vertebrados (BRENER, 1963).

O estágio evolutivo tripomastigota apresenta característica alongada e levemente achatada. O cinetoplasto assume uma forma arredondada e localiza-se na extremidade posterior do corpo do parasito. O flagelo emerge de uma bolsa flagelar e se adere ao longo da extensão do corpo celular do parasita. As formas tripomastigotas são altamente infectantes, podendo ser encontradas no sangue e espaço intercelular do mamífero e na região posterior do tubo digestivo do inseto (BRENER, 1963).

### 1.2.2 Ciclo de vida do *T. cruzi* no vetor

Os insetos responsáveis pela transmissão do agente etiológico possuem característica hematófaga. Dessa forma, os triatomíneos se alimentam do sangue de mamíferos infectados com a forma tripomastigota presente na circulação, essa por sua vez, passa por uma sequência de transformações ao longo do tubo digestivo do inseto. Quando o protozoário *T. cruzi* é ingerido e direcionado para o estômago do inseto ocorre uma diferenciação na forma epimastigota, que sofre digestão. O protozoário flagelado diferenciado em epimastigota ao chegar no intestino do inseto

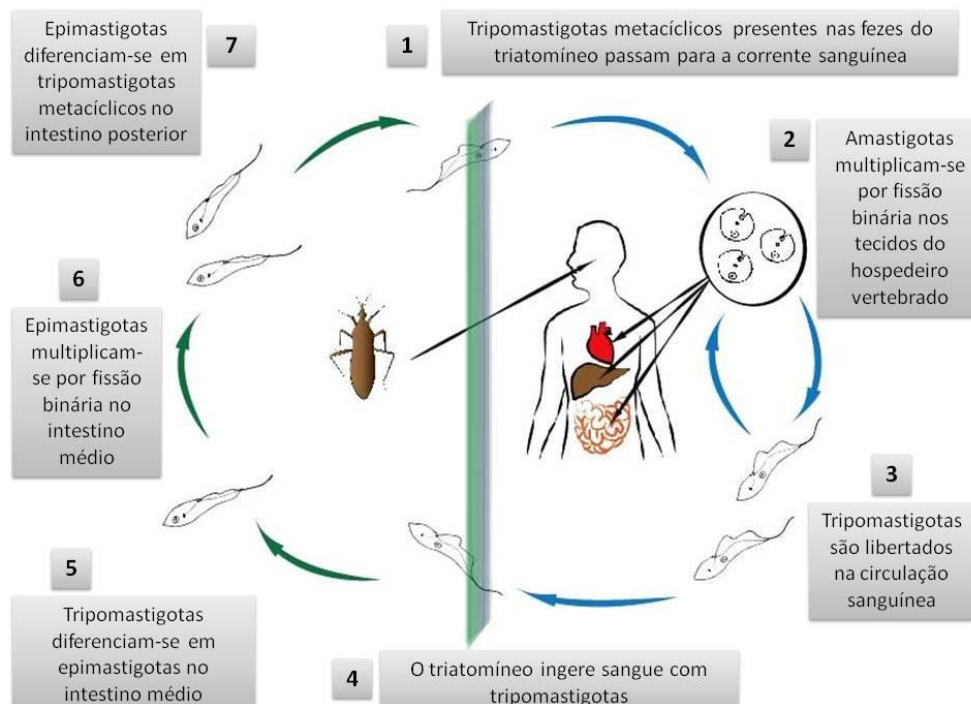
multiplica-se sucessivamente por divisão binária. Em seguida, o *T. cruzi* move-se para o intestino posterior do triatomíneo e sofre um novo processo de diferenciação para a forma tripomastigota metacíclico que é eliminada na urina e fezes do inseto (BRENER, 1963).

### 1.2.3 Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado

A propagação do agente etiológico para o hospedeiro vertebrado só acontece através do vetor infectado pelo *T. cruzi*. A forma tripomastigota metacíclico, que apresenta um potencial infectante, penetra a célula hospedeira e diferencia-se em amastigota, iniciando seu processo de divisão binária intracelular. Ao transformar-se novamente em tripomastigota, rompe a célula hospedeira, migra e invade novas células através do sistema circulatório. Por fim, diferencia-se em amastigota, forma intracelular.

A Figura 4 ilustra os ciclos evolutivos do *T. cruzi* no vetor e no hospedeiro vertebrado. Das fases evolutivas do protozoário é importante destacar que a epimastigota é característica no ciclo do vetor (BRENER, 1963).

Figura 4 - Ciclo evolutivo do *T. cruzi* no vetor e no hospedeiro vertebrado.



Fonte: (FERNANDES, 2016).

### 1.3 Transmissão

A transmissão vetorial tem grande importância epidemiológica, sendo transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae, os triatomíneos. Das principais espécies transmissoras pode-se destacar o *Triatoma infestans*, ilustrado na Figura 5, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma braziliensis*, e *Triatoma dimidiata* (STOTHARD, FRAME, MILES, 1999).

Figura 5 - Triatomíneo transmissor da Doença de Chagas



Fonte: <https://www.gpabrazil.com.br/insetos/barbeiros>

Após a picada do inseto ocorre coceira através de reação inflamatória aguda devido às substâncias presentes na saliva do vetor, ao coçar o hospedeiro facilita a entrada do tripanosoma no organismo (PEREIRA, 1959).

Outra forma de transmissão do protozoário é a via por transfusão, que segundo Silvano Wendell foi descrita pela primeira vez em 1936 por Salvador Mazza, na Argentina (WENDELL, 1997). Os primeiros casos de doadores infectados no Brasil foram descritos na década de 40 em Belo Horizonte, devido à migração das áreas endêmicas para os grandes centros principalmente por busca de trabalho (BONAMETTI, 1998).

A terceira forma de transmissão é a vertical, ou seja, transmissão congênita, visto que o *T. cruzi* pode atravessar a barreira placentária. Quando as mães estão na fase aguda da doença há 71% de possibilidade de ocorrer infecção congênita nos recém-nascidos e 1,6% na gravidez durante a fase crônica (DIAS, 1997; BITTENCOURT, 1992).

Outra via de transmissão que vem causando alarde nos últimos anos é através da via oral devido à alimentos contaminados. O Ministério da Saúde



contabilizou 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo em sua totalidade 35 municípios da Região Amazônica. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles: açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu. A maioria dos surtos ocorreu nos estados do Pará, 85 surtos (75,9%) e Amapá, 14 surtos (12,5%) e, em menor proporção, nos estados do Amazonas com cinco surtos (4,5%), Tocantins, dois surtos (1,8%) e Bahia, dois surtos (1,8%) (BRASIL, 2015).

Em dezembro de 2018 o jornal G1-globo publicou uma reportagem sobre um surto da Doença de Chagas provocado pela contaminação do suco de bacaba, espécie de palmeira da Amazônia, possível habitat do vetor transmissor do *T. cruzi*. Nove pessoas na mesma família foram contaminadas e quatro casos ainda estavam sendo avaliados pela Secretaria de Saúde. Os pacientes foram atendidos no Hospital Geral de Palmas e no Hospital de Doenças Tropicais de Araguaína. O quadro descrito é conhecido como microepidemia.

O boletim epidemiológico de 2015 destacou, em relação às principais formas prováveis de transmissão ocorridas no país, que 72% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e em 18% não foi identificada a forma de transmissão. Entre os casos de Doença de Chagas aguda confirmados no Brasil no período de 2000 a 2013, observou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos (RAMOS, 2015).

#### 1.4 Sintomatologia

O primeiro caso clínico da doença foi descrito por Carlos Chagas em uma criança de dois anos de idade, moradora de uma área endêmica que residia em uma cabana infestada de barbeiros. Neste caso a criança apresentava febre, linfadenopatia, baço e fígado aumentados. Foi feita uma microscopia direta do sangue onde se observou um grande número do parasita flagelado, o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1910).

Associando os sintomas com os quadros clínicos da doença, é possível classificá-la através da sintomatologia das duas diferentes fases da patologia. A fase aguda foi caracterizada pela primeira vez em crianças na primeira década de vida por Carlos Chagas. O cientista brasileiro descreveu de forma detalhada 29 casos da doença na fase aguda (CHAGAS, 1916). A fase aguda ocorre imediatamente após a

infecção, na maioria das vezes esse quadro clínico é assintomático ou imperceptível com febre baixa, mal-estar, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Além disso, é nessa fase que se manifesta a alta parasitemia, período correspondente à multiplicação parasitária e por esse motivo o diagnóstico é feito principalmente por métodos parasitológicos direto para identificar o parasita no exame de sangue do paciente (MARKELL et al., 2003).

Quanto à fase crônica, esse período é caracterizado pela baixa de parasita circulante e presença de anticorpos específicos contra o antígeno *T. cruzi* (ALMEIDA, 2012). A fase crônica pode aparecer após anos com efeitos significantes em órgãos como o coração, esôfago e sistema nervoso periférico (MARKELL et al., 2003).

A forma mais grave da doença é observada em crianças com menos de cinco anos de idade, podendo comprometer o sistema nervoso central. Já em adultos e crianças maiores de cinco anos a doença mostra-se na forma mais branda (MARKELL et al., 2003).

## 1.5 Epidemiologia

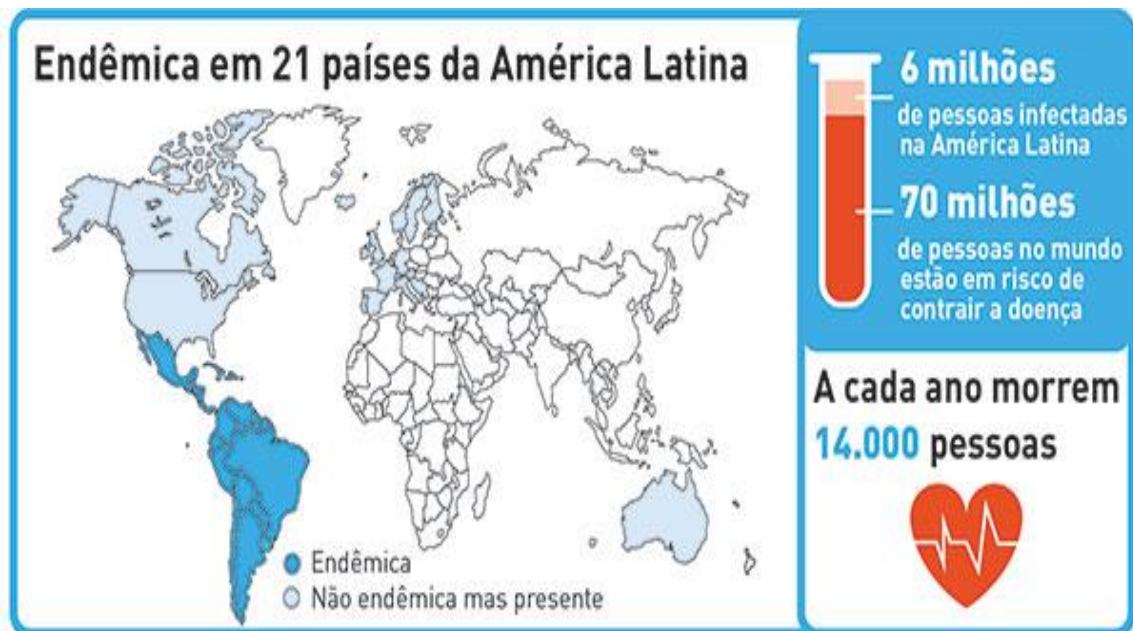
A tripanossomíase americana é passada de forma endêmica do homem para os animais por meio de vetores, e no ciclo doméstico o homem é o principal reservatório da infecção, dessa forma, o parasita é levado para regiões urbanas não endêmicas. Vale ressaltar que a doença é prevalente em populações rurais, onde se encontram milhares de insetos vetores nas moradias de estrutura precária. (DIAS, 2007). A Doença de Chagas apresenta um ciclo doméstico e seu processo de manutenção é principalmente determinado pela enzootia, pois mais de uma centena de espécies foram identificadas portando a infecção pelo *T. cruzi* (MELLO et al., 2009).

De acordo com dados de 2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS) 21 países da América Latina apresentam 5.742.167 pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Na Figura 6 é possível observar o mapa geográfico de regiões endêmicas, com destaques na Argentina com 1.505.235 casos, no Brasil indicando 1.156.821 casos, 876.458 casos de infecção no México e 607.186 na Bolívia, essas regiões estão destacadas na cor azul como endêmica (WHO, 2015).

Em fevereiro de 2018 a Organização Mundial de Saúde divulgou dados sobre a Doença de Chagas, onde estima-se que há entre seis e sete milhões de pessoas no mundo, a maioria na América Latina, infectadas pelo protozoário causador da tripanossomíase americana (WHO, 2018).

O Ministério da Saúde notificou 1.570 casos da Doença de Chagas aguda no período de 2000 a 2013 nos estados brasileiros, principalmente na região norte com 91,1% dos casos (1.430), seguida da região nordeste com 4,7% totalizando 73 casos. Desses casos, é importante destacar que o estado do Pará foi responsável por 75% de todos os casos do país (BRASIL, 2015).

Figura 6 - Regiões endêmicas da Doença de Chagas.



Fonte: [www.dndial.org/doencas/doenca-chagas](http://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas)

A Doença de Chagas foi mencionada como uma das causas de morte em 53.930 óbitos registrados entre 1999 e 2007 no Brasil. Quando analisada como causa básica, esta doença foi a quarta principal causa de morte (10,8%) entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (MARTINS-MELO, 2012).

Sendo assim, fica claro que ainda é inequívoca a relevância da Doença de Chagas como problema de saúde pública na América Latina, sob diferentes padrões regionais de expressão epidemiológica (DIAS, et al., 2015).

## 1.6 Diagnóstico laboratorial

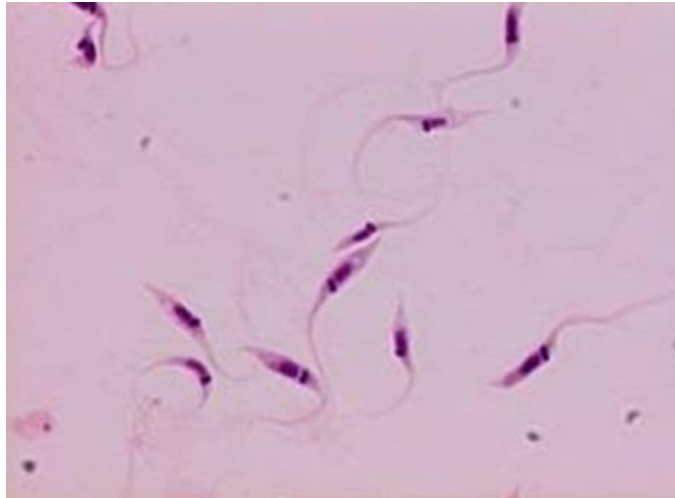
Os exames laboratoriais para diagnóstico da Doença de Chagas devem levar em consideração a fase da infecção, uma vez que a fase aguda é caracterizada por alta parasitemia recomenda-se que sejam feitos exames que busquem a presença do parasita no sangue. Enquanto na fase crônica, há baixa parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG), neste quadro clínico recomenda-se ensaios sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos para o antígeno do parasita *T. cruzi*, causador da Doença de Chagas (MELLO et al., 2009).

### 1.6.1 Diagnóstico na fase aguda da Doença de Chagas

Nessa fase realizam-se preferencialmente exames parasitológicos direto, considerado padrão ouro. O sangue é colhido para realização dos testes abaixo:

- a. **Pesquisa a fresco de tripanossomatídeos:** é a primeira alternativa na fase aguda devido a sua rapidez, simplicidade e baixo custo. É desejável que o paciente apresente febre no momento da coleta e dentro de 30 dias do início dos sintomas (BRASIL, 2013). O sangue coletado é examinado em microscópio óptico no aumento de 400 X e os campos são analisados em busca da presença de parasitas (GOMES, 2009).
- b. **Método de concentração (Strout):** Possui maior sensibilidade e é indicada quando a pesquisa a fresco apresentar resultado negativo e indicado quando o paciente apresentar os sintomas por mais de 30 dias (BRASIL, 2013).
- c. **Gota espessa:** Possui menor sensibilidade, a lâmina é corada pelo método de Giemsa e observada no microscópio na busca por parasitas, como exemplificado na Figura 7 (BRASIL, 2013).

Figura 7 - Gota espessa com achado de parasita.



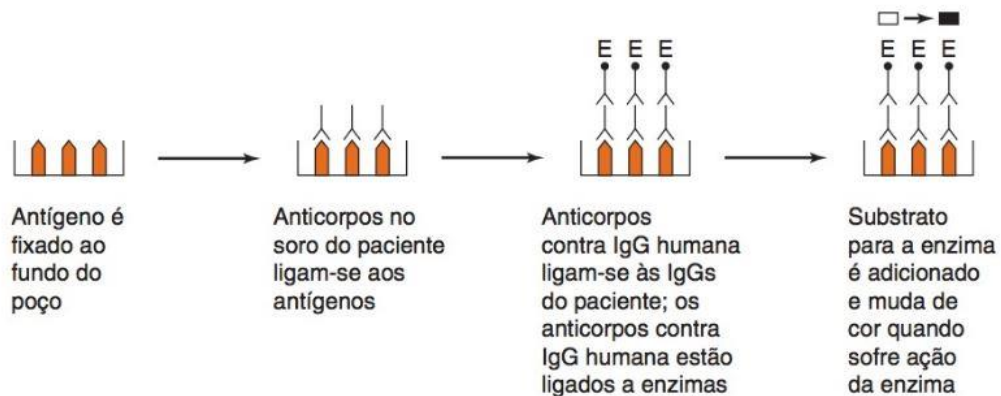
Fonte: [www.chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural](http://www.chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural).

#### 1.6.2 Diagnóstico na fase crônica da Doença de Chagas

O diagnóstico na fase crônica é realizado preferencialmente através da sorologia, utilizando kits para diagnóstico *in vitro*. Dentro dos Kits determinados para esse estudo é importante conhecer as diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico sorológico para a Doença de Chagas, são eles:

a. **ELISA:** O teste de ELISA consiste na detecção de antígenos ou anticorpos específicos através da interação antígeno-anticorpo por meio de reações enzimáticas. Uma placa de ELISA é sensibilizada com o antígeno específico, onde o soro/plasma em teste é adicionado para a busca de anticorpos que quando presentes formam uma ligação antígeno-anticorpo. Em seguida, adiciona-se o anti-anticorpo conjugado com uma enzima que se liga ao complexo antígeno-anticorpo para detectar se houve a ligação. Logo após adiciona-se o substrato que reage com a enzima e emite um sinal ou uma coloração específica que é detectada de forma qualitativa ou quantitativa através de espectrofotometria, como mostra a Figura 8 que ilustra o passo a passo da metodologia (MATOS et al., 2014).

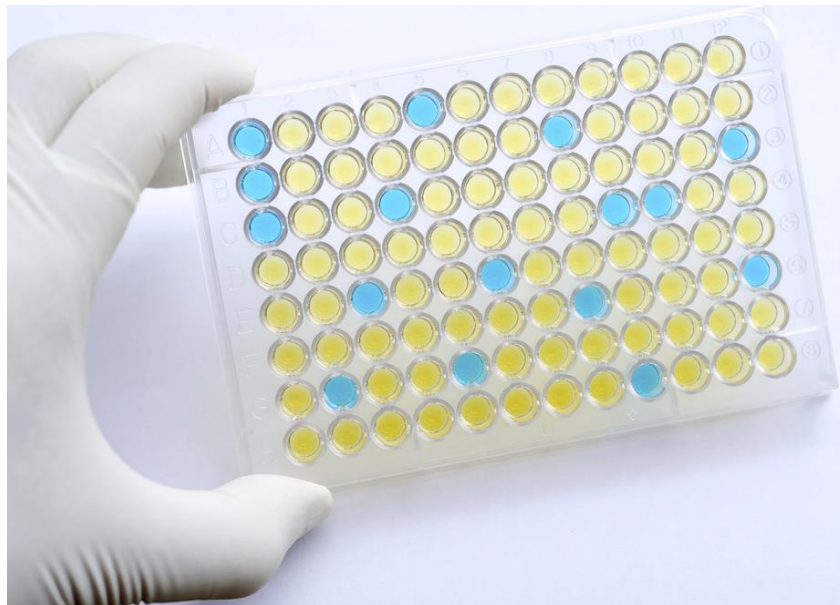
Figura 8 - Demonstração da metodologia de ELISA.



Fonte: [www.kasvi.com.br/aplicacoes-microplaca-microtitulacao/](http://www.kasvi.com.br/aplicacoes-microplaca-microtitulacao/)

O ensaio de ELISA está relacionado com o uso de microplacas, utilizada principalmente em imunologia para detectar a presença de um anticorpo ou um antígeno. a microplaca está ilustrada na Figura 9.

Figura 9 - Microplaca de 96 poços utilizada para ELISA.

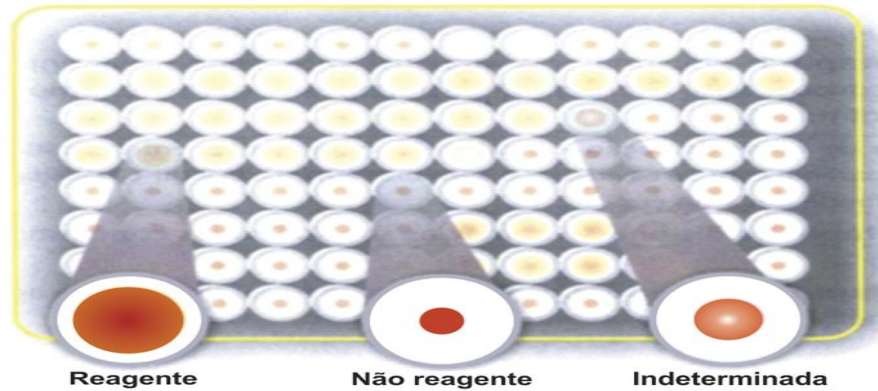


Fonte: [www.hemovision.pt/site/produtos/233](http://www.hemovision.pt/site/produtos/233).

**b. Hemaglutinação:** Trata-se de um teste para a pesquisa de anticorpos que utiliza a reação entre o antígeno específico presente na superfície da hemácia e o anticorpo no soro ou plasma do paciente, quando ocorre essa ligação observa-se a hemaglutinação, formando-se um “tapete” de hemácias unidas aos anticorpos indicando reação, como mostra a Figura 10. Quando não há reação as hemácias se

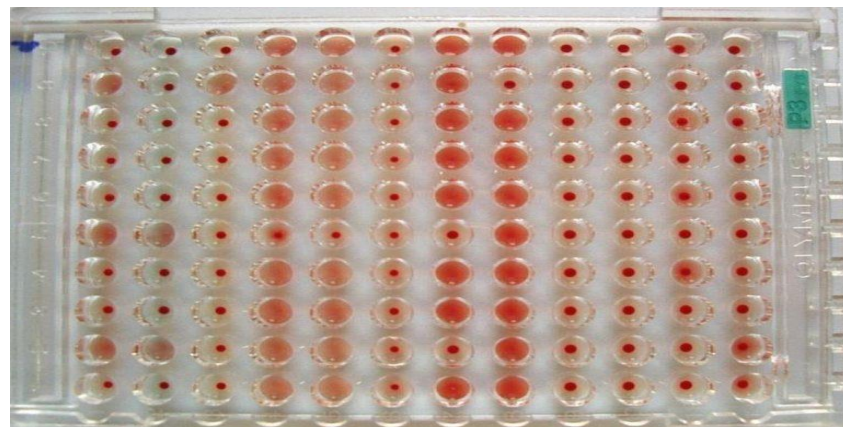
depositam no fundo da placa formando um botão compacto como mostra a Figura 11 (MATOS et al., 2014).

Figura 10 - Reação de Hemaglutinação.



Fonte: <http://www.goldanalisa.com.br>

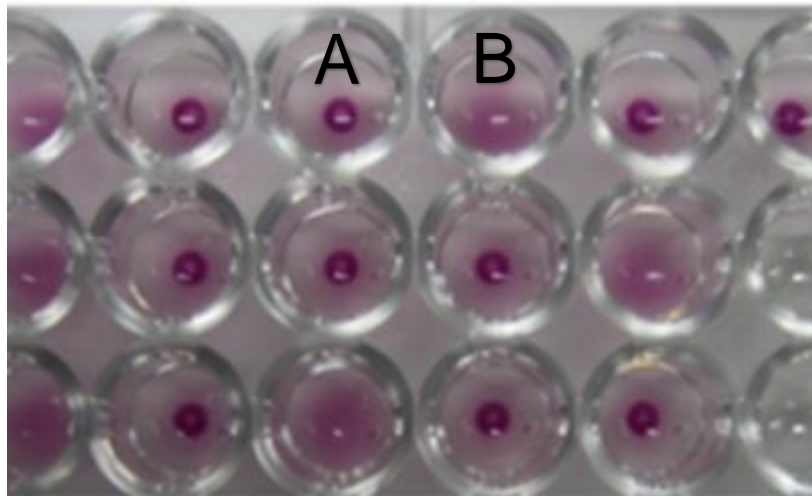
Figura 11 - Microplaca com ensaio de Hemaglutinação



Fonte: [www.kasvi.com.br/aplicacoes-microplaca-microtitulacao](http://www.kasvi.com.br/aplicacoes-microplaca-microtitulacao)

c. **Aglutinação:** Trata-se de um teste sorológico que utiliza o princípio de reação entre antígeno-anticorpo, assemelha-se ao teste de hemaglutinação. A diferença ocorre devido a substituição das hemácias por partículas insolúveis que contêm o antígeno determinado para capturar o anticorpo específico, como demonstrado na Figura 12, onde o poço **A** refere-se a uma amostra não reativa, com formação de botões e o poço **B** uma amostra reativa (MATOS et al., 2014).

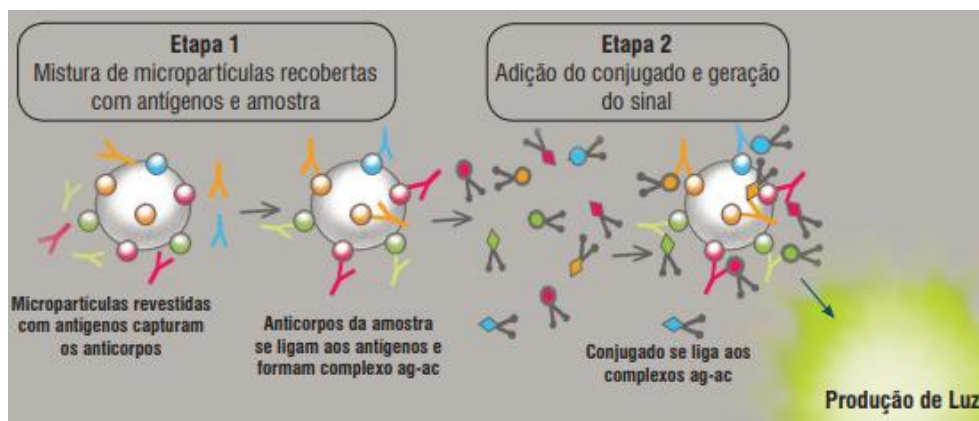
Figura 12 - Microplaca na análise do teste de Aglutinação.



Fonte: [www.foxlab.com.ar/s33/laboratorios/clinica/inmunologia](http://www.foxlab.com.ar/s33/laboratorios/clinica/inmunologia)

d. **Quimiluminescência:** Usa como base uma substância luminescente que detecta a reação antígeno-anticorpo de maneira automatizada. Através da emissão da luz ocorre a captação no próprio equipamento que quantifica o resultado das amostras e classifica como reagente ou não reagente. Alguns ensaios fazem uso de micropartículas magnéticas recobertas por antígenos. Os anticorpos da amostra ligam-se aos antígenos e em uma segunda etapa a reação produz luz, que é medida pelo uso de equipamento. A presença ou ausência de anticorpos ou de antígenos é determinada pela intensidade de luz obtida numa amostra, comparada com o ponto de corte (*cut off*), a partir do qual as reações são interpretadas como reagentes, não reagentes ou indeterminadas (CIARLINI, CIARLINI, FEITOSA 2002), esse esquema pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Esquemática da metodologia de Quimiluminescência.

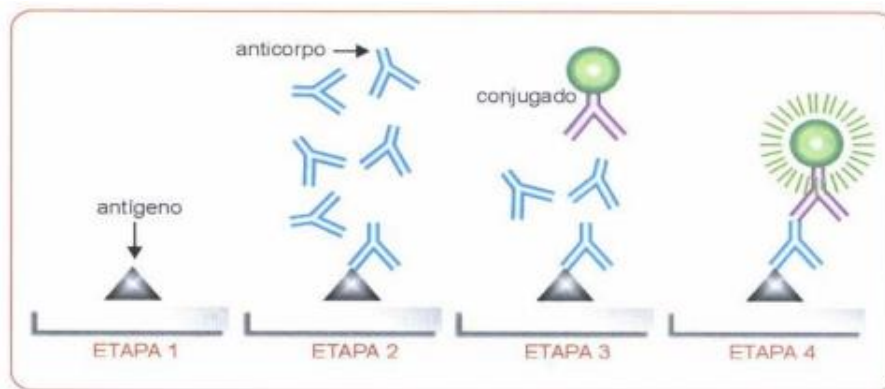


Fonte: [www.telelab.aids.gov.br/ManualAula5.pdf](http://www.telelab.aids.gov.br/ManualAula5.pdf)



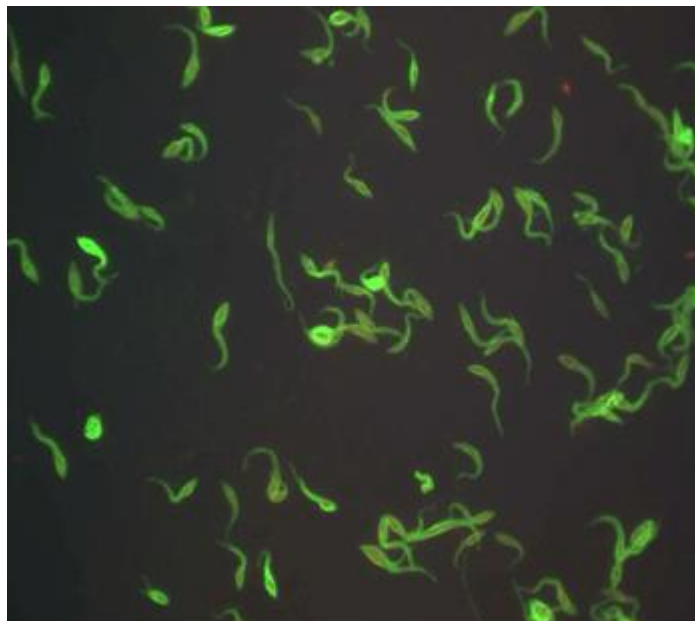
e. **Imunofluorescência:** O ensaio caracteriza-se pela reação antígeno-anticorpo, onde uma lâmina é sensibilizada com antígenos do *T. cruzi* que reagem com os anticorpos específicos presentes nas amostras de soro/plasma do paciente. Em seguida adiciona-se um conjugado composto de anti-anticorpo ligado à uma substância fluorescente que pode ser vista através microscópio de fluorescência (MATOS et al, 2014). A Figura 14 esquematiza o passo a passo da metodologia e a Figura 15 demonstra o resultado positivo com fluorescência no achado parasitário.

Figura 14 - Esquematização da reação de IFI positiva.



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

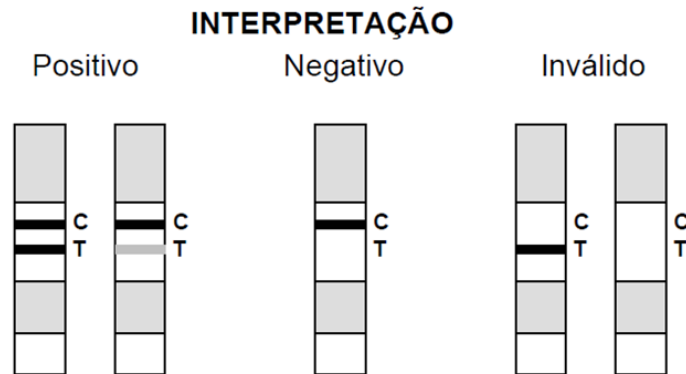
Figura 15 - Reação de Imunofluorescência Indireta positiva, com antígeno de *T. cruzi*.



Fonte: [www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias](http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias)

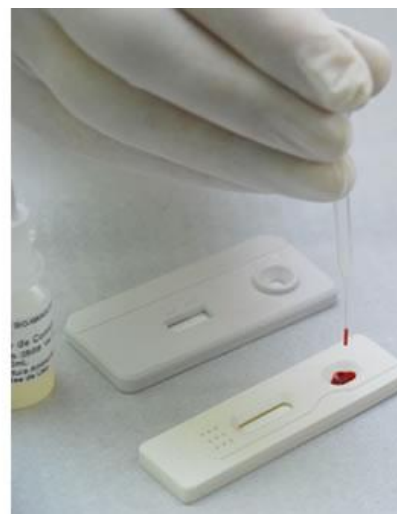
f. **Teste Rápido:** é um ensaio Imunocromatográfico sorológico com leitura de no máximo 30 (trinta) minutos, de fácil execução e baixo custo. O sistema é composto uma tira ou cassete com uma matriz constituída de membrana de nitrocelulose onde o antígeno ou anticorpo é fixado. A amostra sorológica do paciente é aplicada no dispositivo de teste rápido e se houver uma reação antígeno-anticorpo aparecerá uma resposta positiva. A linha C é o controle do teste que serve para garantir que a amostra depositada correu pela membrana e o resultado é válido, como mostra a Figura 16 e 17(LONGO, 2011).

Figura 16 - Interpretação de teste rápido.



Fonte: [www.biomedicinapadrao.com.br](http://www.biomedicinapadrao.com.br)

Figura 17 - Respostas reativas e não reativas utilizando a metodologia de teste rápido.



Fonte: [www.pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/saude](http://www.pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/saude)

## 1.7 Regulamentação

De acordo com a legislação baseada na Lei Federal nº 6360/76 de 23 de setembro de 1976, os kits para diagnóstico destinados à detecção da Doença de Chagas devem ser registrados junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com o artigo 12 dessa Lei: “Nenhum dos produtos de que trata esta Lei, inclusive os importados, poderá ser industrializado, exposto à venda ou entregue ao consumo antes de registrado no Ministério da Saúde” (BRASIL, 1976).

Além disso, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 36 de 26 de agosto de 2015 é usada como referência na avaliação desses produtos, pois dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*. De acordo com essa legislação os produtos usados para diagnóstico de uso *in vitro* classificados como alto risco são passíveis de análise prévia como parte do processo de registro na ANVISA. A RDC define análise prévia como “análise para verificar características do produto com finalidade de registro, alteração (quando couber) ou revalidação” (BRASIL, 2015). Ou seja, produtos pertencentes às classes III e IV são avaliados rotineiramente pelo Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e neste contexto enquadram-se os kits para diagnóstico de uso *in vitro* para Doença de Chagas, que está presente na classe de risco IV (BRASIL, 2015).

Ainda em relação aos kits classificados como alto risco, a legislação prevê que esses produtos são passíveis de **análise fiscal**, que é a efetuada sobre os produtos, em caráter de rotina, para apuração de infração ou verificação de ocorrência de desvio quanto à qualidade, segurança e eficácia dos produtos; ou **análise controle**, que é efetuada em produtos sob o regime de Vigilância Sanitária, após sua entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro (BRASIL, 1976).

## 2 JUSTIFICATIVA

O painel sorológico positivo para Doença de Chagas, objeto de estudo desse trabalho, é uma ferramenta muito importante utilizada na análise prévia, controle e fiscal de kits para diagnóstico de uso *in vitro* da Doença de Chagas. Através da utilização desse painel, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados realiza a avaliação da sensibilidade dos produtos objetos de registro junto a ANVISA e consequente comercialização no país.

A revalidação tornou-se necessária uma vez que a validação do painel ocorreu em 2008, sendo importante avaliar as características das amostras após dez anos, tais como a titulação de anticorpos e a positividade principalmente das amostras mais antigas, devido ao seu tempo de uso. Além disso, o surgimento de novas metodologias implica em amostras bem caracterizadas para atender ao fim que se pretende.

Diante disso, a revalidação do painel composto de amostras verdadeiro positivas para os diferentes marcadores sorológicos da Doença de Chagas, através de critérios pré-estabelecidos nesse estudo, garante maior confiabilidade nos resultados emitidos pelo LSH e permite que esses produtos tenham a segurança e eficácia necessária para atender o mercado de diagnósticos.

### 3 OBJETIVO

Revalidar o painel sorológico composto de amostras verdadeiro positivas para Doença de Chagas utilizado para avaliar kits de diagnóstico in vitro, destinados à detecção de anticorpos específicos contra *T. cruzi*, atualmente utilizados em laboratórios de Análises Clínicas e Serviços de Hemoterapia.

#### 3.1 Objetivos específicos

- a. Identificar os cadernos de registro referente ao período determinado para o estudo (2010-2015);
- b. Identificar os kits de diagnóstico in vitro para detecção da Doença de Chagas registrados nos cadernos no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015 e selecionar somente os que receberam laudo de análise satisfatório pelo LSH;
- c. Identificar as metodologias dos kits selecionados e os protocolos gerados na análise de cada um dos produtos aprovados;
- d. Analisar exaustivamente os resultados das amostras para Chagas nos kits aprovados utilizando as seguintes metodologias: ELISA, Teste Rápido, Quimiluminescência, Aglutinação, Hemaglutinação e Imunofluorescência Indireta;
- e. Avaliar os resultados das amostras que compõe o painel sorológico positivo para Chagas e tabular os resultados referentes a cada protocolo de acordo com a metodologia usada pelo kit;
- f. Estabelecer critérios para revalidar o painel positivo e aplicá-los em cada amostra;
- g. Definir as amostras, com base nos critérios atendidos, para compor o painel revalidado.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Local dos procedimentos e análises**

O painel sorológico para diagnóstico da Doença de Chagas avaliado no presente trabalho pertence ao Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), localizado no departamento de Imunologia (DI) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O laboratório é responsável pela análise prévia, fiscal e controle de kits para diagnóstico in vitro das classes III e IV e pelo controle de hemoderivados como as albuminas, as imunoglobulinas, os complexos protrombínicos e os fatores de coagulação. Além disso, o LSH trabalha com demandas vindas do governo, atuando em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e os órgãos de Vigilância Sanitária dos Estados (VISAs).

#### **4.1.1 Painel positivo verdadeiro para Doença de Chagas**

O objeto principal deste estudo foi o painel sorológico positivo para Chagas, anteriormente validado no ano de 2008, resultado do trabalho de monografia de especialização (PASSO, 2008).

A composição desse painel é dada por 76 (setenta e seis) amostras de soro ou plasma verdadeiro positivas validadas, na qual cada uma é armazenada em criotubos de dois mililitros devidamente identificadas e codificadas para o uso na rotina do laboratório. Os volumes maiores das amostras são guardados em tubos Falcon e armazenadas à temperatura -20°C.

### **4.2 Identificação dos cadernos usados na coleta de dados**

O Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) possui cadernos anuais de registro de recebimento de kits para diagnóstico in vitro onde são registrados os produtos a serem analisados através de análise prévia, controle ou fiscal para HIV, HEPATITES B e C, SÍFILIS, HTLV e CHAGAS. Esses cadernos recebem uma numeração sequencial e a identificação do ano referente ao recebimento dos kits,



### **4.3 Seleção dos kits para análise**

Após a identificação dos cadernos usados como ferramenta para a coleta de dados fez-se a identificação dos kits destinados ao diagnóstico a Doença de Chagas. Em seguida, foram separados para análise somente os produtos que receberam laudo satisfatório emitido pelo Laboratório de Sangue e Hemoderivados. Essa informação relacionada ao laudo encontra-se nos cadernos utilizados nesse estudo.

#### **4.3.1 Identificação das metodologias**

As metodologias foram identificadas e selecionadas com base nos testes satisfatórios para sensibilidade e especificidade no período avaliado. Dessa forma, foi possível destacar as diferentes metodologias para detecção de anticorpos contra antígenos específicos para Doença de Chagas através do levantamento e avaliação dos dados dos cadernos citados anteriormente.

### **4.4 Seleção e análise dos protocolos**

Para a liberação dos laudos dos diferentes kits são gerados protocolos analíticos com o registro dos resultados de cada uma das amostras confrontadas com o produto em análise. Os protocolos recebem um número sequencial de modo a garantir a sua rastreabilidade. Os números dos protocolos gerados são adicionados ao caderno de registro após finalizar a análise de cada kit. Dessa forma foi feito o levantamento de dados e tabulação dos números de protocolos de cada kit, de modo a facilitar a etapa destinada a desarquivar os documentos referentes aos produtos selecionados.

Através da tabela com a discriminação dos protocolos os quais foram desarquivados e analisados. Nessa etapa identificou-se o perfil das amostras que compõem o painel positivo frente a cada um dos kits nas diferentes metodologias.



#### 4.5 Tabulação e avaliação dos dados

Após a seleção dos testes satisfatórios e identificação dos protocolos analíticos com o registro dos resultados das amostras foi possível elaborar uma planilha no Excel®, tabulando os resultados encontrados de cada uma das amostras que compõem o painel positivo. As informações contidas na planilha foram as seguintes:

- Identificação da amostra,
- Número do laudo de análise (LA) de cada kit tabulado,
- Identificação da metodologia de cada kit,
- Número do protocolo do documento com os resultados das amostras,
- Resultados das amostras em cada teste.

A tabela foi elaborada respeitando-se as peculiaridades de cada metodologia possibilitando a avaliação dos resultados. A padronização garante a aplicabilidade na leitura dos resultados na planilha de acordo com a metodologia adotada pelo kit, por exemplo, para a metodologia de ELISA a planilha engloba, além das informações destacadas acima, a densidade óptica (DO), o valor do *cut-off* (CO) e o *Racio*, que é a razão entre DO e CO.

$$\text{Racio} = \frac{\text{Densidade Óptica (DO)}}{\text{Cut-off (CO)}}$$

Para os testes de Aglutinação e Imunofluorescência adicionou-se à tabela a intensidade da resposta de cada amostra que é dada por cruces “+”, variando de 1+ a 4+, sendo 4+ a resposta máxima da intensidade. Dessa maneira a ferramenta apresentaria dados completos de acordo com a metodologia do kit analisado, garantindo maior confiabilidade do resultado final de cada uma das unidades analisadas.

A Figura 20 foi retirada da planilha elaborada através do Excel® após a tabulação dos resultados retirados dos cadernos analisados, onde é possível identificar as informações listadas anteriormente.

Figura 20 - Tabela usada como ferramenta para esse estudo.

|   | A        | S           | R        | S           | T        |
|---|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| 1 |          | TR 2014     |          |             |          |
| 2 | AMOSTRAS | LA: 2884/14 |          | LA: 4936/14 |          |
|   |          | #           | Resposta | #           | Resposta |
| 4 | 1        | 1559        | POS      | 1635        | POS      |
| 5 | 2        | 1559        | POS      | 1635        | POS      |
| 6 | 3        | 1559        | POS      | 1635        | POS      |
| 7 | 4        | 1559        | POS      | 1635        | POS      |

Fonte: (LSH, 2018).

#### 4.6 Critérios adotados para revalidação

Para a revalidação de cada amostra estabeleceu-se critérios que foram baseados minimamente nos métodos de validação das amostras, realizada através do trabalho de especialização no Laboratório de Sangue e Hemoderivados no ano de 2008. Os critérios usados na validação do painel sorológico positivo para a Doença de Chagas foram três ELISAS, um teste de Hemaglutinação, um de Aglutinação, um de Imunofluorescência e um Western Blot, (PASSO, 2008). Ou seja, as amostras deveriam ser revalidadas usando critérios iguais ou superiores para garantir robustez no método de revalidação.

Dessa forma, os **critérios de revalidação** foram estabelecidos, são eles:

- Reatividade em pelo menos cinco ELISAS com o *Racio* acima de 1,5;
- Reatividade em dois Testes Imunocromatográficos (teste rápido);
- Reatividade em pelo menos três Testes de Quimiluminescência com o *Racio* acima de 1,5;
- Positividade em pelo menos três testes IFI;
- Reatividade em um teste de Aglutinação;

- Reatividade em dois testes de Hemaglutinação.

Outro fator importante para revalidação do painel sorológico foi o volume das amostras, que deveria ser suficiente para a realização de futuras análises. Dessa forma, o valor exigido das amostras deveria ser igual ou superior a 10 mL.

Tendo em vista os critérios de revalidação referente às metodologias e ao volume esperado, as amostras foram avaliadas com o auxílio da tabela criada no Excel® a fim de verificar se cumprem as exigências estabelecidas acima, para finalmente reclassificar cada amostra individualmente estabelecendo se atende ou não os critérios determinados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção da amostragem

Após identificar e analisar minuciosamente os cadernos 15/2010, 16/2011, 17/2012, 18/2013, 19/2014 e 20/2015 observou-se o recebimento de 54 kits para diagnóstico in vitro para detecção da Doença de Chagas de diferentes metodologias para análise no Laboratório de Sangue e Hemoderivados, assim distribuídas: 2010 foram recebidos nove produtos, 2011 foi o ano com maior recebimento de kits no total de 15 produtos, 2012 foram oito, em 2013 apenas um kit foi recebido, em 2014 e 2015 foram 11 e 10 recebimentos respectivamente, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 - Levantamento dos dados dos cadernos de kits de diagnóstico no período de 2010 a 2015.

| Ano          | Número de Produtos Recebidos |
|--------------|------------------------------|
| 2010         | 9                            |
| 2011         | 15                           |
| 2012         | 8                            |
| 2013         | 1                            |
| 2014         | 11                           |
| 2015         | 10                           |
| <b>Total</b> | <b>54</b>                    |

Fonte: (LSH,2018).

A baixa demanda de kits recebidos no ano de 2013 não foi característica apenas dos produtos destinados à Doença Chagas. Observou-se que o total de kits para diagnóstico in vitro dos demais marcadores também apresentou uma redução, se comparado aos outros anos.

Os kits com laudo satisfatório foram tabulados a fim de avaliar as informações pertinentes para elaboração dos resultados. A tabela desenvolvida encontra-se exemplificada abaixo, onde é possível identificar o nome do kit destinado à detecção de anticorpos específicos para Chagas, o número e ano de caderno no qual o produto foi registrado, a página do caderno em que foi cadastrado as informações do kit, a empresa fabricante do produto e os números de protocolos dos documentos contendo os resultados das amostras frente a avaliação de desempenho destinadas ao controle de qualidade do produto. Esse esquema está ilustrado na Tabela 2.

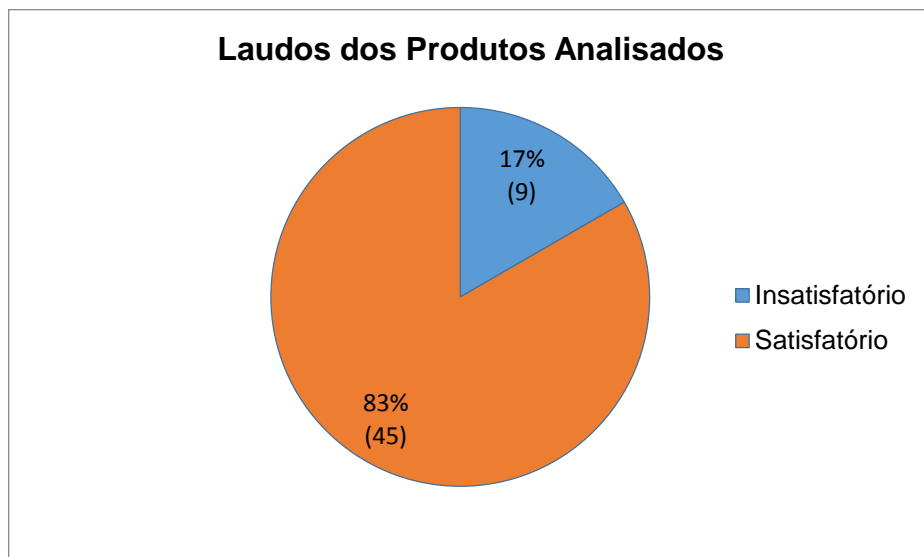
Tabela 2 - Formatação da planilha criada para gerar os primeiros resultados desse estudo.

| Nº e Ano do Caderno | Página do caderno | Nome do Produto | Fabricante | Nº de Protocolo |
|---------------------|-------------------|-----------------|------------|-----------------|
| 15/2010             | 1                 | Produto A       | Empresa X  | 1234            |

Fonte: (LSH, 2018).

Dessa forma, nove kits (17%) foram excluídos devido ao laudo de análise (LA) insatisfatório, resultando na reprovação dos mesmos e consequente impossibilidade de comercialização. Logo, o número amostral para realização desse estudo foi de 45 produtos, ou seja, 83% do total de kits recebidos no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015, como mostra a Figura 21.

Figura 21 - Distribuição dos resultados analíticos.

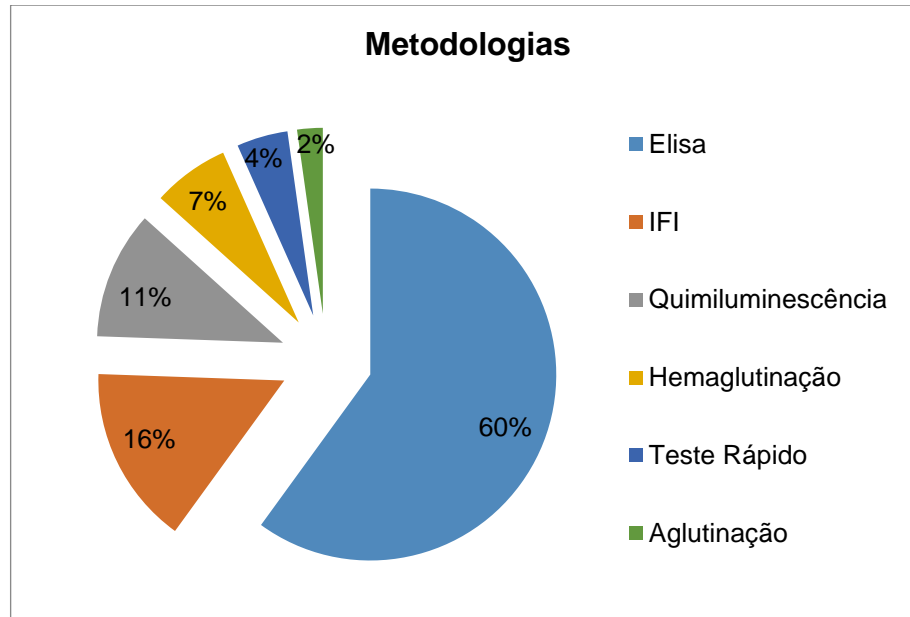


Fonte: (LSH, 2018).

## 5.2 Identificação das metodologias sorológicas

Através da seleção dos 45 produtos foi possível identificar as diferentes metodologias, sendo assim, foram encontrados 27 (60%) Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA); sete Testes de Imunofluorescência (16%); cinco testes de Quimiluminescência (11%); três testes de Hemaglutinação (7%); dois Testes Rápidos (4%) e apenas um Teste de Aglutinação (2%), conforme mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Distribuição das metodologias utilizadas no estudo.



Fonte: (LSH, 2018).

De acordo com o gráfico é possível identificar que o ensaio imunoenzimático, ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* é a metodologia sorológica de predominância. Esse fato foi descrito no ano 2000 em um trabalho publicado por Fitarelli, onde ele afirma que na época era a metodologia mais utilizada, mostrando que é a principal escolha no ensaio para determinação da Doença de Chagas no mercado de diagnóstico e esse quadro se manteve constante desde então, de acordo com o gráfico acima na Figura 22 (FITARELLI, 2000).

Sobre a metodologia de ELISA é importante ressaltar que suas vantagens estão compreendidas em apresentar alta sensibilidade e bom limite de quantificação, ou seja, existe um menor risco de diagnóstico falso negativo pela capacidade de detectar quantidades mínimas do analito. Essa metodologia permite avaliar variadas amostras ao mesmo tempo, possui realização rápida e de baixo custo. Por outro lado, para a realização desse ensaio é necessária mão de obra de profissionais qualificados, por se tratar de uma técnica específica e sensível, pois existe a possibilidade de erros de pipetagem, de tempo de incubação e do manuseio incorreto dos reagentes, pois quando expostos a luz e temperaturas inadequadas podem degradar com facilidade (WATSON, 2013).

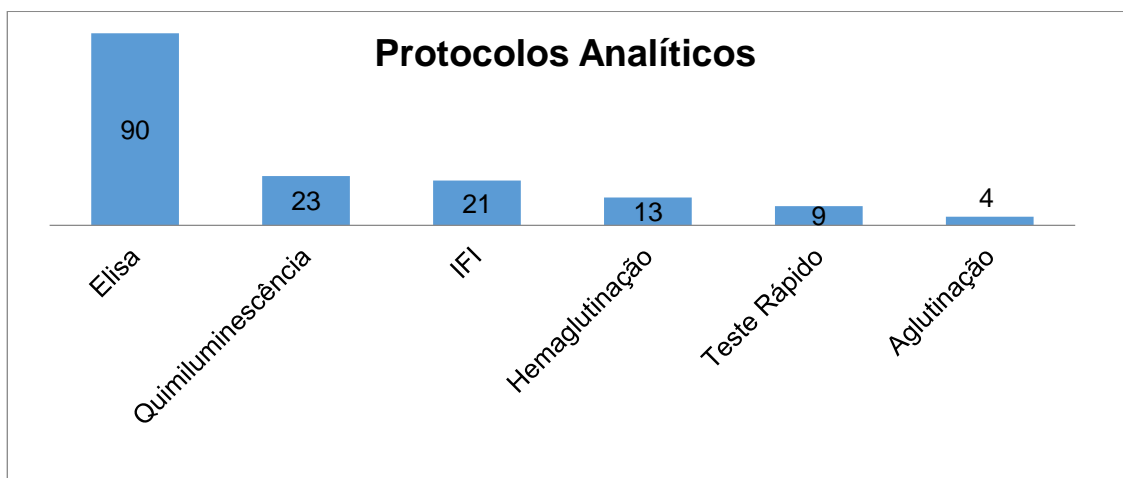
### 5.3 Identificação dos protocolos analíticos

A tabulação dos números de protocolos analíticos, como foi destacado na tabela 2, permitiu a rastreabilidade e análise da parte documental de cada um dos kits separadamente a fim de identificar os resultados das amostras.

Os protocolos analíticos se encontram arquivados em caixas devidamente identificadas no acervo do laboratório, no qual foi realizada a busca ativa contendo os resultados das amostras do painel verdadeiro positivo submetidas aos kits selecionados.

A amostragem dos protocolos desarquivados está expressa na Figura 23, totalizando 160 protocolos analisados neste estudo, no qual 90 (56,25%) dos protocolos eram destinados à ELISA, 23 (14,4%) de Quimiluminescência, 21 (13,1%) de Imunofluorescência, 13 (8,1%) de Hemaglutinação, nove (5,6%) de testes rápidos e quatro (2,5%) de Aglutinação.

Figura 23 - Quantitativo dos protocolos analisados por metodologia.



Fonte: (LSH, 2018).

### 5.4 Análise dos protocolos analíticos e tabulação dos resultados das amostras

Os 160 protocolos foram analisados e os dados foram acrescentados na planilha de acordo com a metodologia do produto, como ilustrado na Tabela 3 para ELISA, Tabela 4 referente ao método de Quimiluminescência, Tabela 5 para Hemaglutinação, Aglutinação e Imunofluorescência, e por fim, a Tabela 6 a respeito do Teste Rápido. As tabelas foram desenvolvidas de modo a apresentar

informações essenciais para a interpretação dos resultados de cada amostra no âmbito geral do estudo. A Tabela 3 exemplifica dados de três amostras quanto a metodologia de ELISA. No entanto, a tabela original é composta por 76 amostras e os dados coletados totalizam resultados de 27 Testes Imunoenzimáticos.

Tabela 3 - Exemplo da tabulação dos dados referentes à metodologia de ELISA.

| ELISA        |               |       |       |             |          |
|--------------|---------------|-------|-------|-------------|----------|
| LA: xxxx/Ano |               |       |       |             |          |
| Amostra      | #N° Protocolo | DO    | CO    | Racio DO/CO | Resposta |
| 1            | 1201          | 3     | 0,359 | 8,3565      | POS      |
| 2            | 1201          | 1,267 | 0,359 | 3,5292      | POS      |
| 3            | 1201          | 1,469 | 0,359 | 4,0919      | POS      |

Fonte: (LSH,2018).

A Tabela 3 apresenta informações quanto a densidade ótica e o valor do *cut-off*, sendo através da razão desses dados que é calculado o *racio* das amostras. Tal informação é importante para atender ao critério de revalidação referente a metodologia de ELISA, uma vez estabelecido que as amostras precisam apresentar reatividade em pelo menos cinco resultados com o *racio* acima de 1,5 para serem revalidadas.

Essas informações facilitam na análise individual das amostras, assim como ocorre na Tabela 4 para o método de Quimiluminescência, que usa o mesmo critério para o *racio* com valores acima de 1,5. A Tabela 4 exemplifica dados de duas amostras quanto a metodologia de Quimiluminescência. Vale ressaltar que a tabela original é composta por 76 amostras e os dados coletados totalizam resultados de cinco testes.

Tabela 4 - Exemplo da tabulação dos dados referentes a metodologia de Quimiluminescência.

| Quimiluminescência |               |       |          |
|--------------------|---------------|-------|----------|
| LA: xxxx/Ano       |               |       |          |
| Amostra            | #N° Protocolo | Racio | Resposta |
| 1                  | 1523          | 9,1   | POS      |
| 2                  | 1523          | 7,3   | POS      |

Fonte: (LSH,2018).



Os testes qualitativos, como as metodologias de Aglutinação, Hemaglutinação e Imunofluorescência apresentam resultados em forma de cruces e quanto maior o número de cruces, maior é a reatividade da amostra, como exemplificado na Tabela 5. Sobre a tabela original, as 76 amostras foram tabuladas frente as diferentes metodologias qualitativas, sendo cada uma das amostras confrontadas com sete testes de Imunofluorescência, três testes de Hemaglutinação e um teste de Aglutinação.

Tabela 5 - Exemplo da tabulação dos dados referentes as metodologias qualitativas.

| <b>Hemaglutinação/Aglutinação/Imunofluorescência</b> |                      |                    |                 |
|--|----------------------|--------------------|-----------------|
| <b>LA: xxxx/Ano</b>                                  |                      |                    |                 |
| <b>Amostra</b>                                       | <b>#N° Protocolo</b> | <b>Intensidade</b> | <b>Resposta</b> |
| 1  | 1201                 | 1+                 | <b>POS</b>      |
| 2  | 1201                 | 2+                 | <b>POS</b>      |
| 3  | 1201                 | 4+                 | <b>POS</b>      |

Fonte: (LSH, 2018).

A interpretação dos testes exemplificados na tabela 5 depende do profissional que realiza o ensaio, por exemplo, a amostra 1 na tabela 5 apresenta intensidade 1+, a amostra 2 apresenta 2+ e a amostra 3, intensidade em 4+, o que significa que todas as amostras são positivas, porém apresentam reatividade diferenciada, onde a amostra 3 é mais reativa que as demais amostras presentes na tabela.

A Tabela 6 representa os dados referentes à Imucromatografia, ou Teste Rápido Por se tratar de um método rápido e simples, a tabela seguiu o mesmo critério de padronização, informando apenas a amostra em teste, o número de protocolo analítico e as respostas das amostras do painel sorológico frente ao kit testado. A Tabela 6 exemplifica a padronização frente a tabulação dos Testes Rápidos, visto que a tabela original é composta pelos resultados das 76 amostras contidas no painel sorológico confrontadas com dois Testes Rápidos.

Tabela 6 - Exemplo da tabulação dos dados referentes a metodologia de Teste Rápido.

| <b>Teste Rápido</b> |                      |                 |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| <b>LA: xxxx/Ano</b> |                      |                 |
| <b>Amostra</b>      | <b>#N° Protocolo</b> | <b>Resposta</b> |
| 1                   | 1635                 | <b>POS</b>      |
| 2                   | 1635                 | <b>POS</b>      |
| 3                   | 1635                 | <b>POS</b>      |

Fonte: (LSH, 2018).

A padronização das tabelas de acordo com a metodologia, como ilustrado nas Tabelas 3, 4, 5 e 6, possibilitou inserir na planilha os resultados de cada uma das amostras presente nos protocolos de maneira clara e objetiva. Além disso, as tabelas apresentam informações necessárias para interpretar o perfil das amostras de acordo com cada uma das metodologias.

### 5.5 Critérios de revalidação

Após a elaboração da tabela padronizada foi possível submeter as amostras que compõem o painel sorológico verdadeiro positivo para Doença de Chagas aos critérios de revalidação anteriormente estabelecidos. Lembrando, os critérios de revalidação foram:

- Reatividade em pelo menos cinco ELISAS com o *ratio* acima de 1,5;
- Reatividade em dois Testes Imunocromatográficos (teste rápido);
- Reatividade em pelo menos três Testes de Quimiluminescência com o *ratio* acima de 1,5;
- Positividade em pelo menos três testes IFI,
- Reatividade em um teste de Aglutinação,
- Reatividade em dois testes de Hemaglutinação.
- Volume da amostra acima de 10 mL.

A partir da definição dos critérios de revalidação foi possível confrontar os resultados das amostras do painel e avaliar o comportamento de cada uma delas, pois dessa forma a revalidação garante que somente as amostras que atendam aos critérios de positividade/reactividade e volume permaneçam no painel sorológico

verdadeiro positivo destinado a análise dos kits para diagnóstico da Doença de Chagas.

Os resultados estão expressos abaixo levando em consideração cada critério de maneira individual.

### 5.5.1 ELISA

Todas as 76 amostras do painel sorológico para Chagas atenderam ao critério de revalidação de positividade em pelo menos cinco ensaios com o *Racio* acima de 1,5, dessa forma 100% dos resultados foram obtidos como o esperado.

### 5.5.2 Teste Rápido

As 76 amostras foram confrontadas quanto ao critério referente ao Teste Rápido e foi possível identificar que seis amostras não atenderam a reatividade esperada. As amostras 22, 24, 35 e 46 e 48 apresentaram discordância nos resultados em um teste rápido, enquanto a amostra 36 apresentou resultado negativo em dois testes imunocromatográficos, como observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para o Teste Rápido.

| Amostras | Quantitativo de resultado Negativo |
|----------|------------------------------------|
| 22       | 1                                  |
| 24       | 1                                  |
| 35       | 1                                  |
| 36       | 2                                  |
| 46       | 1                                  |
| 48       | 1                                  |

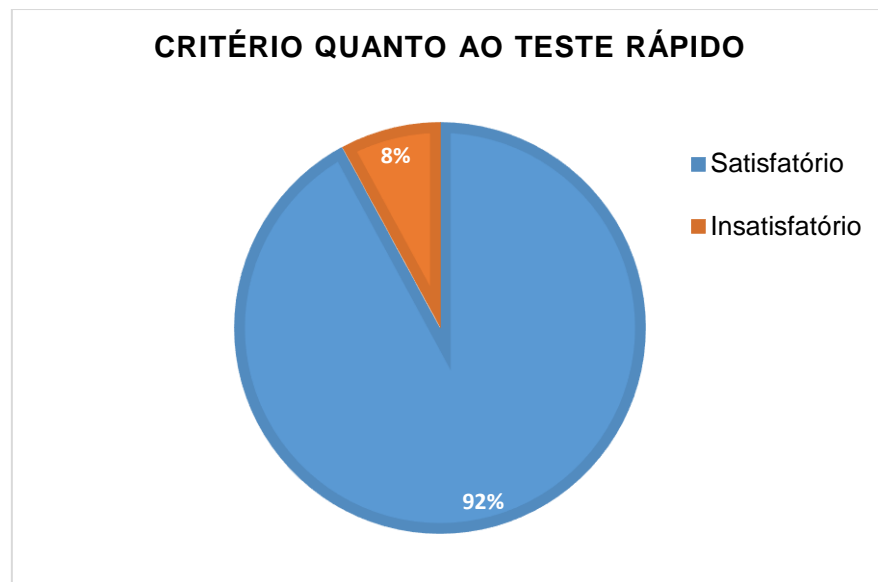
Fonte: (LSH, 2018).

As amostras presentes na tabela acima não atenderam ao critério de revalidação referente ao teste rápido. Sobre elas é importante observar que foram submetidas aos dois testes rápidos exigidos e não obtiveram a positividade esperada, ou seja, apesar de expostas ao quantitativo estabelecido de testes não foi obtido o resultado esperado no critério para revalidá-las. Portanto, essas amostras passam a fazer parte do painel sorológico pra Chagas denominado indeterminado,

que posteriormente será submetido a novos testes para complementar na caracterização.

A Figura 24 demonstra os resultados obtidos quanto a análise das amostras frente ao Teste Rápido, relacionando a porcentagem entre as amostras que estiveram em concordância e discordância, tendo 06 (8%) amostras não atendendo ao critério e 70 (92%) atenderam ao critério de positividade referente aos testes rápidos.

Figura 24 - Resultados para o critério para revalidação referente aos Testes Rápidos.



Fonte: (LSH,2018).

### 5.5.3 Testes de Quimiluminescência

Para essa metodologia, de acordo com o critério estabelecido, esperava-se a reatividade em três ensaios com o *ratio* acima de 1,5. Após a análise dos dados tabulados foi identificado que a amostra 36 apresentou resultado insatisfatório devido a um resultado negativo, como mostra a Tabela 8.

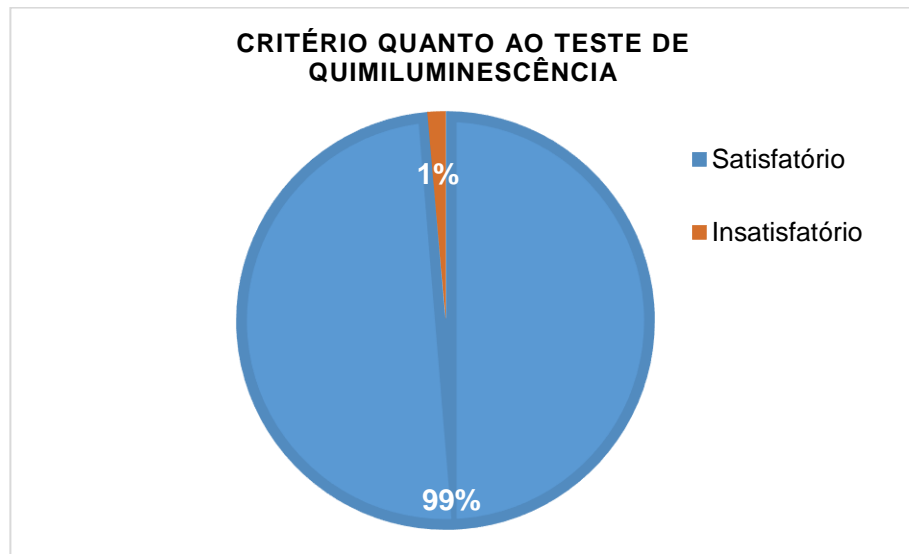
Tabela 8 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para Quimiluminescência.

| Amostras | Quantitativo de resultado Negativo |
|----------|------------------------------------|
| 36       | 1                                  |

Fonte: (LSH, 2018).

Dessa forma, a amostra em não conformidade foi direcionada para o painel indeterminado, para que posteriormente seja submetida a novos testes. As demais 75 amostras (99%) apresentaram a reatividade e *racio* necessários para atender ao critério de revalidação. Essa relação de discordância de resultados é possível observar na Figura 25.

Figura 25 - Critério de revalidação referente a metodologia de Quimiluminescência.



Fonte: (LSH,2018).

#### 5.5.4 Imunofluorescência

Para essa metodologia o critério de revalidação estabelecido é a positividade em pelo menos três testes. Diante desse parâmetro todas as 76 amostras do painel sorológico em estudo apresentaram resultados satisfatórios, com isso, 100% dos resultados foram obtidos como o esperado.

#### 5.5.5 Aglutinação

Para essa metodologia e baseado no critério de revalidação estabelecido, ou seja, esperando-se a reatividade em um teste de Aglutinação, as amostras 24 e 25 não atenderam a esse critério, como ilustrado na Tabela 9.

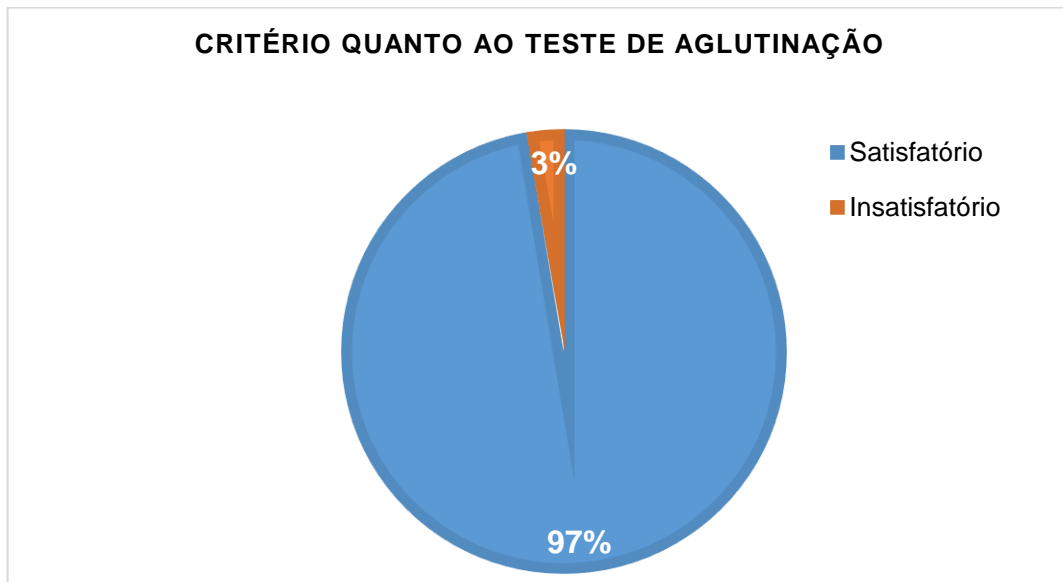
Tabela 9 - Amostras que não atenderam ao critério de revalidação para Aglutinação.

| Amostras | Quantitativo de resultado Negativo |
|----------|------------------------------------|
| 24       | 1                                  |
| 45       | 1                                  |

Fonte: (LSH, 2018).

As amostras 24 e 45 apesar de terem sido submetidas a quantidade necessária de testes, não obtiveram a reatividade necessária para atender ao critério de revalidação, faltando um resultado positivo para cada uma. Dessa forma, das 76 amostras avaliadas quanto a esse critério duas apresentaram resultados discordantes, representando 3% do painel sorológico, como observado na Figura 26.

Figura 26 - Critério de revalidação referente a metodologia de Aglutinação.



Fonte: (LSH,2018).

### 5.5.6 Hemaglutinação

Diante dessa metodologia e baseado no critério de revalidação estabelecido, espera-se que as amostras apresentem positividade em pelo menos dois testes de Hemaglutinação. Tendo em vista esse parâmetro, as amostras 63, 65, 71, 72 e 73, listadas na Tabela 10, não obtiveram a positividade necessária para atender ao critério de revalidação, apesar de submetidas às quantidades necessárias de testes.

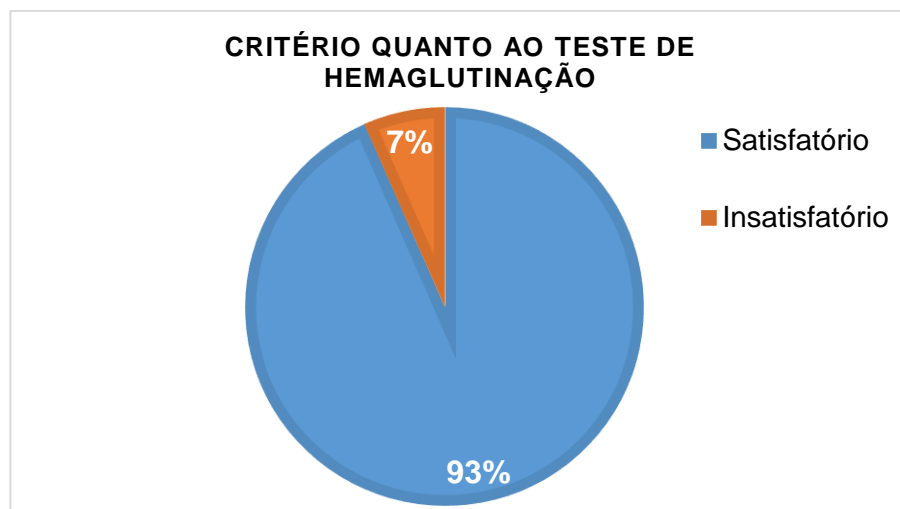
Tabela 10 - Amostras que não atenderam ao critério de Revalidação para o Hemaglutinação.

| Amostras | Quantitativo de resultado Negativo |
|----------|------------------------------------|
| 63       | 1                                  |
| 65       | 1                                  |
| 71       | 2                                  |
| 72       | 1                                  |
| 73       | 2                                  |

Fonte: (LSH, 2018).

Do painel sorológico composto por 76 amostras houve resultado discordante para as cinco amostras destacadas nas Tabela 10. Frente a metodologia de Hemaglutinação 71 amostras apresentaram resultados conforme o esperado, totalizando 93% do painel sorológico, como ilustrado na Figura 27.

Figura 27 - Critério de revalidação referente a metodologia de Hemaglutinação.



Fonte: (LSH, 2018).

## 5.6 Revalidação das amostras verdadeiro positivas

### 5.6.1 Amostras com resultados discordantes

Após aplicar os critérios de revalidação em cada amostra do painel sorológico positivo para a Doença de Chagas foi possível identificar que 12 amostras não apresentaram comportamento necessário para compor o painel revalidado. Diante disso, as amostras 22, 24, 35, 36, 45, 46, 48, 63, 65, 71, 72 e 73 passam a

compor um painel indeterminado por não atenderem aos critérios de revalidação estabelecidos nesse estudo, como pode ser observado na Tabela 11. Posteriormente elas serão submetidas a novos testes de modo que sejam devidamente caracterizadas.

Tabela 11 Amostras que não atenderam aos critérios de revalidação estabelecidos.

| Amostras | Critério Reprovado               |
|----------|----------------------------------|
| 22       | Teste Rápido                     |
| 24       | Teste Rápido/ Aglutinação        |
| 35       | Teste Rápido                     |
| 36       | Teste Rápido/ Quimiluminescência |
| 45       | Aglutinação                      |
| 46       | Teste Rápido                     |
| 48       | Teste Rápido                     |
| 63       | Hemaglutinação                   |
| 65       | Hemaglutinação                   |
| 71       | Hemaglutinação                   |
| 72       | Hemaglutinação                   |
| 73       | Hemaglutinação                   |

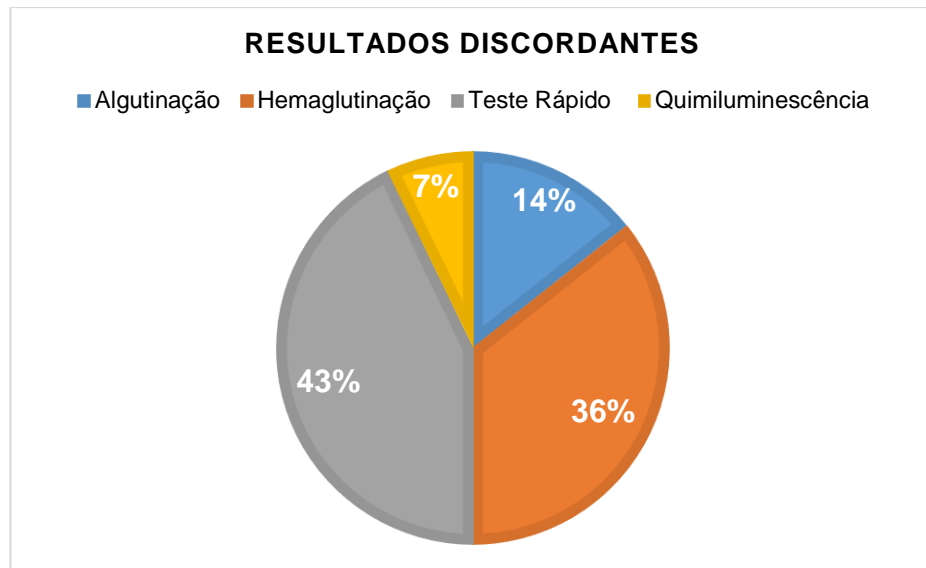
Fonte: (LSH, 2018).

Essas amostras poderão ser utilizadas na análise de produtos, no entanto, não serão consideradas verdadeiro positivas. Já as demais amostras estão devidamente caracterizadas, revalidadas, de modo a garantir resultados confiáveis nas suas próximas análises e volume suficiente para realização de procedimentos futuros.

Diante disso, a Figura 28 ilustra em porcentagem a relação entre a quantidade de amostras discordantes com a metodologia em que os critérios não foram atendidos. Pode-se observar que as seis amostras reprovadas no critério do Teste Rápido representam 43% dos resultados discordantes, enquanto que as cinco amostras com resultados negativos na metodologia de Hemaglutinação são responsáveis por 36% dos resultados discordantes. O critério de revalidação para a Aglutinação representa 14% dos resultados discordantes com duas amostras de resultados negativos. Por fim, 7% dos resultados discordantes é referente a uma amostra com resultado negativo na metodologia de Quimiluminescência.



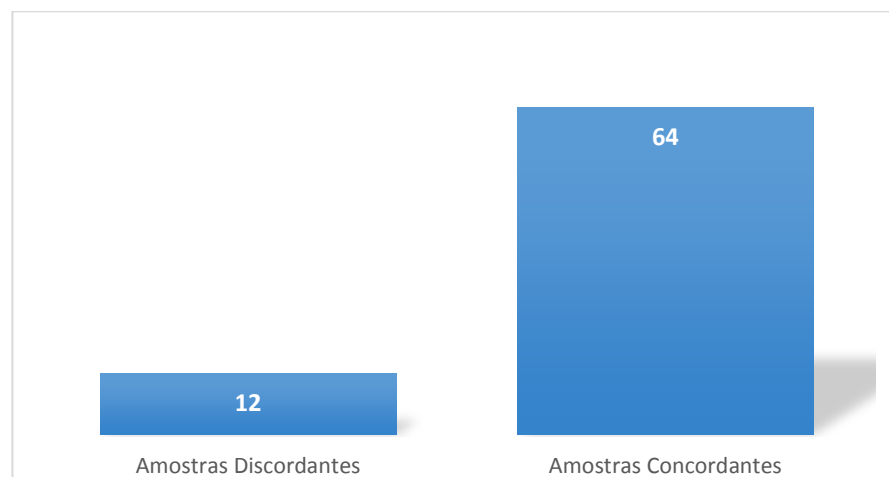
Figura 28 - Porcentagem de amostras discordantes em cada metodologia.



Fonte: (LSH, 2018).

A Figura 29 retrata os resultados discordantes das 12 amostras que não atenderam aos critérios de revalidação estabelecidos e as 64 amostras revalidadas com resultados satisfatórios.

Figura 29 - Revalidação das amostras.



Fonte: (LSH, 2018).

## 5.7 Fatores que influenciam nos resultados analíticos

Sobre o comportamento das amostras em discordância, a mudança das respostas quando comparadas aos resultados de validação pode ser explicada devido ao tempo de uso, que resulta na queda da titulação dos anticorpos das amostras. Além disso, algumas amostras são mais reativas que outras. Ou seja,

dependendo do tempo de uso e do limite de detecção do kit, pode haver um comportamento negativo quanto aos seus resultados. Tendo em vista esse cenário, fica claro que o painel sorológico é uma ferramenta de constante renovação e por esse motivo a revalidação é um procedimento necessário para garantir um painel com amostras bem caracterizadas.

Sobre o processo de congelamento e descongelamento do painel, não há interferência nesse aspecto frente a titulação dos anticorpos nas amostras. A Universidade de São Paulo (USP) realizou uma avaliação em que se estudou a estabilidade de amostras positivas para HIV, que foram submetidas a ensaios de ELISA, Western Blot e imunofluorescência. Nesse estudo foram realizados 11 ciclos de congelamento e descongelamento onde não foi identificado efeito estatisticamente significativo na reatividade dos anticorpos específicos. Portanto, o procedimento de congelamento e descongelamento não causou efeitos adversos na reatividade das amostras de soro positivas para detecção de anticorpos, sem ocorrência de reações falso-negativas (CASTEJÓN, 2012). Tal fato também foi comprovado neste estudo, pois as amostras foram descongeladas pelo menos 45 vezes durante o processo de revalidação.

## 5.8 Volume das amostras

O último critério estabelecido para a revalidação está relacionado com o volume das amostras, que devem ter no mínimo 10 mL. Esse valor foi definido para garantir que haja volume suficiente para os próximos ensaios de kits que darão entrada no LSH para fins de análise. A partir desse levantamento foi identificado que apenas uma amostra não atende a esse critério, como ilustrado na Tabela 12, apresentando 9,0 mL.

Tabela 12 - Amostra que não atendeu ao critério de revalidação para o teste rápido.

| Amostras | Volume |
|----------|--------|
| 35       | 9,0 mL |

Fonte: (LSH, 2018).

A amostra 35 foi a única que não atendeu ao critério de revalidação quanto ao volume mínimo desejado de 10 mililitros. A perda de volume é uma característica

comum às amostras do painel com o passar dos anos, pelo uso constante devido à grande demanda do laboratório, principalmente quando se trata de análises automatizadas, no qual o equipamento exige volumes maiores para realização do teste. A Figura 30 aborda em porcentagem esse resultado, onde 99% do painel atendeu ao critério de volume.

Figura 30 - Critério de revalidação referente ao critério de volume.



Fonte: (LSH, 2018).

Além disso, as amostras recebidas passaram por um processo de filtração para eliminar fibrinas presente nas amostras, que resulta na diminuição do volume total. Dessa forma, a renovação constante do painel torna-se necessária, uma vez que as amostras tendem a se esgotar em volume, devido ao tempo de uso.

## 5.9 Resultado final

Enfim, após o processo de revalidação o painel passou a ser composto por 64 amostras devidamente caracterizadas, ou seja, 84% das amostras permaneceram no painel e 16% das amostras (12/76) foram direcionadas ao painel indeterminado, como mostra a Figura 31.

Figura 31 - Resultado final do estudo de revalidação.



Fonte: (LSH, 2018).

Após a análise das 76 amostras frente aos 45 kits estudados de seis metodologias diferentes, e depois de estabelecido os critérios de revalidação foi possível compor um painel sorológico de chagas composto por 64 amostras verdadeiro positivas devidamente revalidadas, destinadas ao controle de qualidade de kits para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas.

A planilha final está exposta no apêndice A desse trabalho e as amostras não revalidadas estão especificadas no apêndice B.

## 6 CONCLUSÃO

A identificação dos kits para diagnóstico in vitro para detecção da Doença de Chagas possibilitou levantar os resultados das amostras do painel positivo e confeccionar a planilha utilizada como ferramenta principal desse estudo. Os kits que obtiveram resultados insatisfatórios não foram utilizados nesse processo de revalidação retrospectiva, pois os resultados das amostras frente a esses kits não teriam a confiabilidade necessária devido a reprovação desses produtos.

A tabulação dos resultados permitiu identificar o comportamento de cada uma das amostras frente aos kits aprovados no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015 e, além disso, os critérios usados para revalidação puderam ser estudados individualmente através da planilha criada.

Dessa forma, o painel contendo 66 amostras verdadeiro positivas para Doença de Chagas foi caracterizado. Seu uso como ferramenta garante resultados confiáveis e amplia a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados no controle de qualidade de kits para diagnóstico da Doença de Chagas.

O painel sorológico positivo passou a ser composto por 66 amostras revalidadas com volume suficiente para realização de novas análises voltadas ao controle de qualidade de kits para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas utilizados em laboratórios de Análises Clínicas e Serviços de Hemoterapia.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B. R.; SANTILIANO, F. C. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a Doença de Chagas. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer-Goiânia**, v. 8, n. 14, p. 1586, 2012.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico in vitro, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 20 ago. 2018.

BRASIL. Lei Federal nº 6360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da Doença de Chagas aguda e crônica. **Rev Patol Trop**, v. 42, n. 4, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol.**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. **Bol Epidemiol.**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015. Disponível em: [www.portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#situacao](http://www.portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#situacao). Acesso em: 21 jan. 2019.

BITTENCOURT, Achiléa L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 403-408, 1992.

BONAMETTI, Ana M. *et al.* Infecção por *Trypanosoma cruzi* em candidatos a doador de sangue. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, p. 566-571, 1998.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220-224, 1963.

CASTEJÓN, Márcia Jorge *et al.* Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 573-581, 2012.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, Carlos. Nova entidade morbida do homem: resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, n. 2, p. 219-275, 1911.

CHAGAS, Carlos. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Braz Med**, v. 11, p. 225, 1913.

CHAGAS, Carlos. Tripanosomíase americana: forma aguda da molestia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, n. 2, p. 37-60, 1916.

CIARLINI, Luciana Del Rio Pinoti; CIARLINI, Paulo César; FEITOSA, Francisco Leydson Formiga. Quimiluminescência: princípio e aplicações. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, n. 2, p. 181-187, 2002.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

DIAS, João Carlos Pinto *et al.* Globalização, iniquidade e Doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, supl. 1, p. S13-S22, 2007.

DIAS, João Carlos Pinto *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

FITARELLI, Douglas B.; HORN, Joel F. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para Doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 310-314, 2009.

GLOBO. Nove pessoas da mesma família são infectadas pela Doença de Chagas após beber suco contaminado. G1, 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2018/12/08/nove-pessoas-da-mesma-familia-sao-infectadas-pela-doenca-de-chagas-apos-beber-suco-contaminado.ghtml>. Acesso em: 21 jan. 2019.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, supl.1, 2009.

LEWINSOHN, Rachel. Carlos Chagas (1879–1934): the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 513-523, 1979.

LONGO, Paulo Eduardo *et al.* Avaliação comparativa de teste imunocromatográfico para identificação forense de sangue humano. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 1, n. 1, p. 16-21, 2011.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. **Parasitologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 136-149.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio *et al.* Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 591-596, 2012.

MATOS, Christiane Santos. **Doença de Chagas em Bambuí: estado atual e vigilância**. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde com concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2014.

MELLO, Marcelle Bral de. **Padronização do Kit de ELISA Recombinante para o diagnóstico da doença de Chagas visando sua utilização nos Serviços de Hemoterapia**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PASSO, Roberto Machado . **Confecção de painel para controle da qualidade de conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” empregados no diagnóstico sorológico da Doença de Chagas**. Tese (Pós - Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária ) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, , Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

PEREIRA DA SILVA, L. H. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 1, p. 99-118, 1959.

RAMOS, Francisco Lúzio de Paula *et al.* Boletim epidemiológico do IEC, ano 1, n. 1, jan/abr. 2015. 2015. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#situacao>. Acesso em: 21 jan. 2019.

SILVEIRA, ANTONIO CARLOS; REZENDE, DF de. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, supl. 3, p. 11-22, 1994.

STOTHARD, J. R.; FRAME, I. A.; MILES, M. A. Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: dual drug-resistant" progeny" from episomal transformants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 189-193, 1999.

WATSON, HILL. **Teste ELISA e sua aplicação**. 2013. Disponível em: <https://www.webartigos.com/artigos/teste-elisa-e-sua-aplicacao/115312>. Acesso em: 24 jan. 2019.

WENDELL, S. Doença de Chagas transfusional. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 411-27.



WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** Geneva, 2012. (World Health Organization technical report series, n. 975).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec.**, v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 21 jan. 2019.

**APÊNDICE A – PLANILHA FINAL UTILIZADA COMO FERRAMENTA PARA A REVALIDAÇÃO (continuação)**

| Amostras | 5<br>Elisas<br>Racio<br>>1,5 | Falta<br>? | 2 Tr | Falta? | 3 Quimi<br>Racio ><br>1,5 | Falta<br>? | 03 If | Falta<br>? | 02<br>Hema | Falta<br>? | 1 Aglut | Falta<br>? | Vol<br>(mL) | Atende?<br>> 10 mL | Amostras<br>Revalidadas<br>? |
|----------|------------------------------|------------|------|--------|---------------------------|------------|-------|------------|------------|------------|---------|------------|-------------|--------------------|------------------------------|
| 1        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 21,8        | Sim                | Sim                          |
| 2        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 58          | Sim                | Sim                          |
| 3        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 48,8        | Sim                | Sim                          |
| 4        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 37,5        | Sim                | Sim                          |
| 5        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 37          | Sim                | Sim                          |
| 6        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 35          | Sim                | Sim                          |
| 7        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 19,5        | Sim                | Sim                          |
| 8        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 63          | Sim                | Sim                          |
| 9        | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 41          | Sim                | Sim                          |
| 10       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 46          | Sim                | Sim                          |
| 11       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 34,5        | Sim                | Sim                          |
| 12       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 14          | Sim                | Sim                          |
| 13       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 67,5        | Sim                | Sim                          |
| 14       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 112,5       | Sim                | Sim                          |
| 15       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 148         | Sim                | Sim                          |
| 16       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 112,5       | Sim                | Sim                          |
| 17       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62,5        | Sim                | Sim                          |

APÊNDICE A – PLANILHA FINAL UTILIZADA COMO FERRAMENTA PARA A REVALIDAÇÃO (continua)

| Amostras | 5<br>Elisas<br>Racio<br>>1,5 | Falta<br>? | 2 Tr | Falta? | 3 Quimi<br>Racio ><br>1,5 | Falta<br>? | 03 If | Falta<br>? | 02<br>Hema | Falta<br>? | 1 Aglut | Falta<br>? | Vol<br>(mL) | Atende?<br>> 10 mL | Amostras<br>Revalidadas<br>? |
|----------|------------------------------|------------|------|--------|---------------------------|------------|-------|------------|------------|------------|---------|------------|-------------|--------------------|------------------------------|
| 18       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52,5        | Sim                | Sim                          |
| 19       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 97,5        | Sim                | Sim                          |
| 20       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 107         | Sim                | Sim                          |
| 21       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 57,5        | Sim                | Sim                          |
| 22       | Sim                          | Ok         | Não  | 1      | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 51          | Sim                | Não                          |
| 23       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 58          | Sim                | Sim                          |
| 24       | Sim                          | Ok         | Não  | 1      | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Não     | 1          | 62,5        | Sim                | Não                          |
| 25       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52          | Sim                | Sim                          |
| 26       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52,8        | Sim                | Sim                          |
| 27       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 57,5        | Sim                | Sim                          |
| 28       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 58,3        | Sim                | Sim                          |
| 29       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 37          | Sim                | Sim                          |
| 30       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52,5        | Sim                | Sim                          |
| 31       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 57,5        | Sim                | Sim                          |
| 32       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52          | Sim                | Sim                          |
| 33       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52          | Sim                | Sim                          |
| 34       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52          | Sim                | Sim                          |
| 35       | Sim                          | Ok         | Não  | 1      | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 9           | Não                | Não                          |
| 36       | Sim                          | Ok         | Não  | 2      | Não                       | 1          | SIM   | OK         | SIM        | OK         | Sim     | Ok         | 87          | Sim                | Não                          |
| 37       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 55,3        | Sim                | Sim                          |

|    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |      |     |     |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|------|-----|-----|
| 38 | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | 56,5 | Sim | Sim |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|------|-----|-----|

**APÊNDICE A – PLANILHA FINAL UTILIZADA COMO FERRAMENTA PARA A REVALIDAÇÃO (continua)**

| Amostras | 5<br>Elisas<br>Racio<br>>1,5 | Falta<br>? | 2 Tr | Falta? | 3 Quimi<br>Racio ><br>1,5 | Falta<br>? | 03 If | Falta<br>? | 02<br>Hema | Falta<br>? | 1 Aglut | Falta<br>? | Vol<br>(mL) | Atende?<br>> 10 mL | Amostras<br>Revalidadas<br>? |
|----------|------------------------------|------------|------|--------|---------------------------|------------|-------|------------|------------|------------|---------|------------|-------------|--------------------|------------------------------|
| 39       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 55          | Sim                | Sim                          |
| 40       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 47          | Sim                | Sim                          |
| 41       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 65,5        | Sim                | Sim                          |
| 42       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 36          | Sim                | Sim                          |
| 43       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52,5        | Sim                | Sim                          |
| 44       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 52,5        | Sim                | Sim                          |
| 45       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Não     | 1          | 58          | Sim                | Não                          |
| 46       | Sim                          | Ok         | Não  | 1      | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 28          | Sim                | Não                          |
| 47       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 53          | Sim                | Sim                          |
| 48       | Sim                          | Ok         | Não  | 1      | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 58          | Sim                | Não                          |
| 49       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 57          | Sim                | Sim                          |
| 50       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 53          | Sim                | Sim                          |
| 51       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 72          | Sim                | Sim                          |
| 52       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 54,5        | Sim                | Sim                          |
| 53       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62          | Sim                | Sim                          |
| 55       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62          | Sim                | Sim                          |
| 56       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 67          | Sim                | Sim                          |
| 57       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 27          | Sim                | Sim                          |
| 58       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 47          | Sim                | Sim                          |
| 59       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62          | Sim                | Sim                          |

|    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |    |     |     |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|
| 60 | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | Sim | Ok | 34 | Sim | Sim |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|

### APÊNDICE A – PLANILHA FINAL UTILIZADA COMO FERRAMENTA PARA A REVALIDAÇÃO (conclusão)

| Amostras | 5<br>Elisas<br>Racio<br>>1,5 | Falta<br>? | 2 Tr | Falta? | 3 Quimi<br>Racio ><br>1,5 | Falta<br>? | 03 If | Falta<br>? | 02<br>Hema | Falta<br>? | 1 Aglut | Falta<br>? | Vol<br>(mL) | Atende?<br>> 10 mL | Amostras<br>Revalidadas<br>? |
|----------|------------------------------|------------|------|--------|---------------------------|------------|-------|------------|------------|------------|---------|------------|-------------|--------------------|------------------------------|
| 61       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 67,5        | Sim                | Sim                          |
| 62       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 20          | Sim                | Sim                          |
| 63       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Não        | 1          | Sim     | Ok         | 52,5        | Sim                | Não                          |
| 64       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62,5        | Sim                | Sim                          |
| 65       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Não        | 1          | Sim     | Ok         | 87          | Sim                | Não                          |
| 66       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 27,5        | Sim                | Sim                          |
| 67       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 21,5        | Sim                | Sim                          |
| 68       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 87          | Sim                | Sim                          |
| 69       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 82,5        | Sim                | Sim                          |
| 70       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 62,5        | Sim                | Sim                          |
| 71       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Não        | 2          | Sim     | Ok         | 80          | Sim                | Não                          |
| 72       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Não        | 1          | Sim     | Ok         | 27          | Sim                | Não                          |
| 73       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Não        | 2          | Sim     | Ok         | 27,5        | Sim                | Não                          |
| 74       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 147         | Sim                | Sim                          |
| 75       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 147,5       | Sim                | Sim                          |
| 76       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 92          | Sim                | Sim                          |
| 77       | Sim                          | Ok         | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok         | Sim   | Ok         | Sim        | Ok         | Sim     | Ok         | 110,5       | Sim                | Sim                          |

### APÊNDICE B – PLANILHA FINAL DAS AMOSTRAS NÃO REVALIDADAS

| Amostras | 5 Elisas<br>Racio<br>>1,5 | Falta? | 2 Tr | Falta? | 3 Quimi<br>Racio ><br>1,5 | Falta? | 03 If | Falta? | 02 Hema | Falta? | 1 Aglut | Falta ? | Vol (mL) | Atende?<br>> 10 MI | Amostras<br>não<br>Revalidadas |
|----------|---------------------------|--------|------|--------|---------------------------|--------|-------|--------|---------|--------|---------|---------|----------|--------------------|--------------------------------|
| 22       | Sim                       | Ok     | Não  | 1      | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Sim     | Ok      | 51       | Sim                | Não                            |
| 24       | Sim                       | Ok     | Não  | 1      | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Não     | 1       | 62,5     | Sim                | Não                            |
| 35       | Sim                       | Ok     | Não  | 1      | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Sim     | Ok      | 9        | Não                | Não                            |
| 36       | Sim                       | Ok     | Não  | 2      | Não                       | 1      | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Sim     | Ok      | 87       | Sim                | Não                            |
| 45       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Não     | 1       | 58       | Sim                | Não                            |
| 46       | Sim                       | Ok     | Não  | 1      | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Sim     | Ok      | 28       | Sim                | Não                            |
| 48       | Sim                       | Ok     | Não  | 1      | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Sim     | Ok     | Sim     | Ok      | 58       | Sim                | Não                            |
| 63       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Não     | 1      | Sim     | Ok      | 52,5     | Sim                | Não                            |
| 65       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Não     | 1      | Sim     | Ok      | 87       | Sim                | Não                            |
| 71       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Não     | 2      | Sim     | Ok      | 80       | Sim                | Não                            |
| 72       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Não     | 1      | Sim     | Ok      | 27       | Sim                | Não                            |
| 73       | Sim                       | Ok     | Sim  | Ok     | Sim                       | Ok     | Sim   | Ok     | Não     | 2      | Sim     | Ok      | 27,5     | Sim                | Não                            |