

**Padronização do método de produção do antígeno para Intradermoreação de
Montenegro**

Janaína Pinho da Silva Passos

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

Orientação:

Dra Keyla Belizia Feldman Marzochi.

**Rio de Janeiro
2004**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Padronização do método de produção de antígeno para Intradermoreação de Montenegro

Janaína Pinho da Silva Passos

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Dra Keyla Belizia Feldman Marzochi _____

Dr. Akira Homma _____

Dr. José Godinho da Silva _____

Orientador:

Dra Keyla Belizia Feldman Marzochi _____

**Rio de Janeiro
2004**

Passos, Janaina Pinho da Silva

Padronização do Método de Produção de Antígeno de Montenegro. Bio- Manguinhos, FIOCRUZ / Janaina Pinho da Silva Passos: INCQS / FIOCRUZ, 2004

xv, 74 páginas

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa. Pós – Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2004. Orientador : Dra. Keyla Belizia Feldman Marzochi

1 Leishmaniose. 2 Intradermoreação de Montenegro. 3 Produção de Montenegro 4 Controle de qualidade. Prazo de Validade.

I Título

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças, por me protegerem e terem iluminado o meu caminho até aqui.

Aos meus pais, Jorge Carlos e Geanete, pelo amor, carinho, companheirismo e por serem tão presentes em minha vida.

Ao meu marido Jairo Passos, pelo amor, carinho, companheirismo e pelas madrugadas em frente ao computador, ajudando-me na redação dos textos.

A minha filha Bárbara, sempre presente com seu sorriso e carinho e ao meu bebê, ainda em gestação, que renova a minha fé e esperança de que a vida vale a pena;

Enfim, a todos os que acreditaram, com o seu apoio e incentivo, contribuindo para que eu chegasse até aqui.

Muito Obrigada!

MENSAGEM

“Para as pessoas que pensam ter razão,
para aquelas que têm um prazer especial
de fazer as coisas bem feitas,
então, que isso não seja só para elas,
mas para todas aquelas que sabem
que a vida é algo mais do que aquilo
que os nossos olhos vêem!”

Fernão Capello Gaivota

AGRADECIMENTOS

À Doutora Keyla Belizia Feldman Marzochi, pela orientação deste trabalho e por me fortalecer nos momentos de dificuldades;

A coordenação da Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ;

Ao Chefe de Departamento de Reativos Para Diagnósticos, Antônio Gomes, pela confiança depositada na realização desse trabalho;

Ao Gerente de Produção de Reativos Para Diagnósticos, Emílson Domingos da Silva, por tudo que representa para o meu desenvolvimento profissional e pessoal;

Á Doutoranda Aline Fagundes da Silva, pela co-orientação desta tese;

Ao Doutor José Godinho da Silva, por entender minhas dificuldades e ajudar-me de forma desprendida no desenvolvimento do meu trabalho;

Ao Doutor Renato Marchevsky, pela colaboração e orientações;

À Doutoranda Maria de Fátima Madeira e equipe do Serviço de Parasitologia do Departamento de Microimunoparasitologia, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas;

Ao doutorando Hilton Jorge da Silva, pelo o apoio, orientação e ajuda incansável que me dedicou;

Ao Mestre Edmílson Domingos da Silva, por estar ao meu lado, apoiando e ensinando-me, nos momentos de dificuldade;

A Jorge Augusto Paulo da Silva (Billy) meu irmão e amigo que muito me ajudou e ajuda na execução desta Tese;

À minha amiga e comadre Cláudia Barroso, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis;

À Marcelle Brall, pela ajuda na elaboração das tabelas;

À Regina Célia, pelo preparo e esterilização de todas as vidrarias utilizadas durante este trabalho;

À Elizabeth dos Prazeres, pelo companheirismo e por estar presente nos experimentos animais me substituindo;.

À Ana Paula Bezerra da Silva, pela ajuda que me dispensou, no início até o final desta tese;

A Eduardo Paulino da Silva, pelas Fotografias durante a experimentação animal;

A todos os companheiros e funcionários do Departamento de Reativos para Diagnóstico que diretamente ou indiretamente me ajudaram;

Aos companheiros do Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ;

Ao Departamento da Garantia da Qualidade Bio-Manguinhos/FIOCRUZ especialmente á Virginia Salgueiro Caetano;

Aos integrantes do de Centro de Referência Nacional em Leishmaniose Tegumentar, do Departamento de Microimunoparasitologia, sob coordenação do Dr. Armando Schubach IPEC / FIOCRUZ;

Ao Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, especialmente ao Luiz Eduardo de Carvalho Paes, integrante do Centro de Referência Internacional de Caracterização de Cepas de *Leishmania* coordenado pela Dra. Elisa Cupolillo.

Resumo

O teste intradérmico para o diagnóstico da Leishmaniose foi preconizado por Montenegro em 1926. Tratava-se de um extrato alcalino de formas promastigotas de *Leishmania* que se acreditava livre de partículas e de parasitos inteiros. Atualmente, os antígenos mais utilizados constituem-se ainda de formas promastigotas, algumas íntegras e outras sonicadas, a partir de “ pool “ cepas de *Leishmania* ou cepas únicas, diluídas em soluções preservadoras como salinas fenoladas 0,4% ou mertiolatadas 1:10.000.

A produção do antígeno, não tem portanto uma padronização definida no Brasil e no Mundo e várias preparações antigênicas em diferentes apresentações são descritas comprometendo a qualidade e a comparabilidade das respostas. Justificou-se assim, a necessidade de padronização da metodologia para a produção do antígeno de Montenegro, em diferentes fases. Este estudo propôs definições de padrões na produção do antígeno para a intradermoreação de Montenegro em relação a melhor inóculo padronizado de promastigotas, métodos de quantificação de concentração de proteínas, prazo de validade e controles de qualidade, universalmente aceitos.

Abstract

Montenegro's antigen was advocated publicly by Montenegro in 1926 for leishmaniasis diagnosis through intradermal test. It was an alkaline extract of *Leishmania* promastigotes forms, which was thought to be particles of and parasites free. However, nowadays the most used antigens are of promastigotes forms, some of which are integral and others are sonicated as from pool of *Leishmania* strains or single ones diluted in preserving solutions like phenol or merthiolate saline.

The production of this antigen has not been standardized in Brazil or worldwide; thus several antigen preparations, in different doses, are described jeopardizing the quality and comparison of answers.

Therefore, it was made necessary a standardized methodology to produce Montenegro's antigen in different phases. This study propose antigen definitions for Montenegro's intradermal reactions related to the best promastigotes inoculum, protein concentration checking methods, validity and quality controls equivalent to the vaccines ones.

LISTA DE SIGLAS / ABREVIATURAS

ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA -	Albumina Bovina
BOD-	Estufa Bacteriológica
FNS-	Fundação Nacional de Saúde
IDRM –	Intradermoreação de Montenegro
IPEC-	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
HCL-	Ácido clorídrico
LT A-	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTA –	Leishmaniose Tegumentar
µg-	Micrograma
mL-	Mililitro
nm-	Nanometros
NaOH-	Hidróxido de sódio
RDC-	Resolução do Diretório de Colegiados
Rpm -	Rotações por minutos
Ptn -	Protéínas
SNS/MS-	Secretaria Nacional de Saúde/Ministério da Saúde
SVS-	Secretária de Vigilância em Saúde
SUS-	Sistema Único de Saúde
TCA-	Ácido Tricloroacético
UV-	Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS, FIGURAS E FOTOS

Tabelas

- Tabela 1 - Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8. Medida por contagem de parasito em câmara de Neubauer e por Absorbância. 24
- Tabela 2 - Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8, demonstrado pela contagem de parasitos em Câmara de Neaubauer após diluição em azul de de Tripan 26
- Tabela 3 – Dosagem do Nitrogênio Protéico pelo Método Kjeldahl correspondente aos nove dias de crescimento em cultura de *Leishmania amazonensis* cepa PH8 27
- Tabela 4 – Comparação entre os experimentos para determonações de concentração de antígenos segundo inoculo, obtido no 4º dia de crescimento, através de contagem de parasitos em câmara de Neuabauer eo métodos de nitrogênio protéico e total 29
- Tabela 5 - Frascos de antígenos obtidos, para intradermorreação de Montenegro e respectivas dosagens de nitrogênio protéico, antes e após a definição do inóculo correspondente a 10^7 parasitos /mL 31
- Tabela 6 – Comparação entre as dosagens do nitrogênio protéico e proteínas totais para defini do melhor método de aferição antigênica 32
- Tabela 7 - Fatores de conversão entre as concentrações protéicas determinadas pelo (método Biureto e Kjeldalh Cp Biureto e Cp Kjeldah) 34

Gráficos

Gráfico I - Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8. demonstrado pelo numero de parasitas, contados em câmara de Neubauer e por absorbância durante dez dias. 25

Gráfico II - Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8, demonstrado pelo números de parasitos, contados em Câmara de Neubauer e por absorbância, após diluição com azul de Tripán. 26

Gráfico III - Curva da concentração do Nitrogênio Protéico pelo Método Kjeldahl durante aos nove dias de crescimento em cultura de *Leishmania amazonensis* cepa PH8. 28

Gráfico IV- Distribuição de inóculos de parasitos em cultura e correspondentes às determinações de nitrogênio protéico e total, segundo experimento I. 30

Gráfico V- Distribuição de inóculos de parasitos em cultura e correspondentes determinações de nitrogênio protéico e total, segundo experimento II. 30

Gráfico VI- Comparação entre as dosagens de nitrogênio protéico e proteínas totais para definição do melhor método de aferição antigênica 33

Figuras

Figura 1 Apresentação comercial do antígeno de Leishmania para reação de Montenegro	08
Figura 2 Fluxograma de produção	12
Figura 3 Histopatologia de pele de camundongos	36
Figura 4 Fluxograma proposto para produção	45

Lista de Anexos

Anexo1	Preparo de Azul de Tripan	54
Anexo2	Cálculos dos Experimentos das Dosagens de proteínas	55
Anexo3	Laudo do Teste de Esterilidade do Lote de Antígeno de Montenegro	58
Anexo 4	Laudo do Teste de Endotoxina do Lote de Antígeno de Montenegro Dentro do Prazo de Validade	61
Anexo 5	Laudo do Teste de Pirogênio do Lote de Antígeno de Montenegro Dentro do Prazo de Validade	62
Anexo 6	Laudo do Teste Histopatológico do Lote de Antígeno de Montenegro e Salina Dentro do Prazo de Validade	63
Anexo 7	Laudo do Teste de Esterilidade do Lote de Antígeno de Montenegro com Prazo de Validade Vencida	67
Anexo 8	Laudo do Teste de Endotoxina dos Lotes de Antígenos de Montenegro com Prazo de Validade Vencida	69
Anexo 9	Laudo do Teste de Pirogênio dos Lotes de Antígenos de Montenegro com Prazo de Validade Vencida	70
Anexo 10	Laudo do Teste Histopatológico dos Lotes de Antígeno de Montenegro com Validade Vencida	72

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	1
I.1 Aspectos Gerais	1
I.2 Morfologia e Bioquímica da Leishmania	2
I.3 O Antígeno de Montenegro	3
I.4 Diferentes Antígenos de Montenegro Produzidos	5
I.5 O Antígeno de Montenegro de Bio-Manguinhos e sua Produção	6
I.5.1 Detalhamento da Rotina Preconizada de Produção do Antígeno de Bio-Manguinhos (1992-2002)	9
I.5.2 Prazo de Validade do Antígeno para Reação de Montenegro	10
I.6 Considerações Críticas	10
II JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO	13
III OBJETIVOS	15
III.1 Objetivo Geral	15
III.2 Objetivos Específicos	15
IV METODOLOGIA	16
IV.1. Determinação das Curvas de Crescimento	16
IV.2 Determinação do Melhor Inóculo para a Produção Antigênica	18
IV.2.1 Verificação da Repetibilidade das Curvas	18
IV.3 Determinação do Método mais Adequado para Aferição da Concentração Antigênica	19
IV.3.1 Utilização do Método Kjeldahl	19
IV.3.2 Utilização do Método Biureto	20
IV.3.3 Verificação da Repetibilidade das quantificações	20
IV.4 Determinação dos Controles de Qualidade	21
IV.4.1 Determinação do Controle Microbiológico	21
IV.4.2. Controle Histopatológico -Teste de Inocuidade	22
IV.5 Avaliação do Prazo de Validade do Antígeno para Intradermorreação de Montenegro Bio-Manguinhos	23
V RESULTADOS	24
V.1 Curvas de Crescimento	24
V.2 Melhor inóculo destinado para produção	28
V.3 Método Definido para Aferição da Concentração Antigênica	32
V.4 Controles de Qualidade do Antígeno	35
V.4.1 Controles Microbiológicos	35
V.4.2 Teste de Pirogênio	35
V.4.3 Teste de Inocuidade - Controle Histopatológico	35
V.5 Definição do Prazo de Validade do teste para Intradermorreação de Montenegro	37
V.5.1 Controles Microbiológicos	37
V.5.1.1 Exame direto	37
V.5.1.2 Presença de Endotoxina	37
V.5.1.3. Teste de Pirogênio	37
VII CONCLUSÕES	46
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

I INTRODUÇÃO

I.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses representam um grave problema de Saúde Pública, considerando sua ampla distribuição mundial, seu espectro de manifestações clínicas, o envolvimento de uma multiplicidade de espécies de *Leishmania* e de vetores, de hospedeiros e reservatórios animais, e as dificuldades para o diagnóstico da doença e o tratamento dos doentes.

No Brasil, tanto a leishmaniose tegumentar, como a leishmaniose visceral ocorrem em praticamente em todas as regiões do País. Em 2002, foram notificados 36.601 casos de leishmaniose tegumentar e 2.754 de leishmaniose visceral no Brasil (FUNASA, 2002).

Clinicamente, a doença tegumentar se caracteriza por lesões na pele e (ou) mucosas, únicas ou múltiplas. Abrange desde formas inaparentes, ou com lesões de pele discretas com evolução à cura, até formas com ulcerações múltiplas, abrangendo mucosas da face, com evolução arrastada, tendência a metástases e recidivas, de tratamento difícil (Marzochi, 1992). A leishmaniose visceral, por outro lado, é doença sistêmica, comprometendo principalmente os órgãos linfóides (baço, fígado e medula óssea), produzindo principalmente hepato-esplenomegalia, anemia, pancitopenia e depressão da resposta imune celular específica (FUNASA/ 2002).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos acerca da LTA (FUNASA, 2002) têm sugerido mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que acomete ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA pode ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas, bem como em regiões periurbanas (Marzochi & Marzochi, 1997). Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico expresso tanto pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos, ou de áreas próximas a eles, como pelo aparecimento de surtos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis à transmissão da doença.

No período de 1985 a 2001, a LTA no Brasil apresentou coeficientes de incidência que oscilaram de 10,45 a 21,23 por 100.000 habitantes. Ao longo desse período observou-se uma tendência ao crescimento, registrando-se os coeficientes mais elevados

nos anos de 1994/1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 por 100.000 habitantes, respectivamente (FUNASA, 2002).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 80, foram registrados casos em 19 unidades federadas e, nos últimos anos, quase todas as unidades federadas registraram casos autóctones da doença.

Diferentes espécies de parasitos estão envolvidos no ciclo das leishmanioses tendo sido identificados até o momento 21 espécies capazes de infectar o homem em todo mundo (Shaw, 1994). No Brasil, os principais protozoários causadores da leishmaniose tegumentar são:

- *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), agente de leishmaniose cutânea e mucocutânea, que ocorre em diversas regiões brasileiras. Está presente nos ciclos peridomésticos da LTA, associa-se a uma grande variedade de espécies de flebotomíneos e pode infectar vários animais domésticos e silvestres.
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972), agente de leishmaniose cutânea e da leishmaniose cutânea-difusa, encontram-se nas florestas primárias e secundárias da região amazônica, na Bahia, Minas Gerais e Goiás (Silveira, 1984).
- *Leishmania (Viannia) guyanensis* agente de leishmaniose cutânea, ocorre ao norte da Bacia Amazônica (Barret & Senra 1989; Marzochi & Marzochi, 1994).
- *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agente da leishmaniose visceral, ocorre na região nordeste, porém está franca expansão nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, (Marzochi & Marzochi, 1997).

As estratégias para o controle da LTA devem variar conforme a situação epidemiológica local. Para implementação e fortalecimento das ações de controle no Brasil, envolvendo o controle vetorial além do aprimoramento do sistema de vigilância epidemiológica e entomológica, destacam-se entre outros : o conhecimento do maior número de casos suspeitos; o diagnóstico e tratamento precoce dos casos confirmados e a identificação do agente etiológico circulante na área (FUNASA 2002).

I.2 Morfologia e Bioquímica da Leishmania

A *Leishmania* é um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* (família *Trypanosomatidae*). Estes parasitos abrigam-se em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de seus hospedeiros vertebrados e têm como hospedeiros

invertebrados os insetos da família *Phlebotominae*, no Brasil compreendendo os gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (Garrido, 1983).

O parasito apresenta-se em duas formas:

1- Forma promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. Nesta forma a *Leishmania* encontra-se em forma flagelada, alongada, e é inoculada pelo inseto durante o repasto sanguíneo. No inseto, as formas promastigotas passam por processo de diferenciação celular, com alteração da composição de antígenos de superfície que as tornam infectivas para as células fagocitárias (Sacks, 1989 apud Silva, 1999). Após a diferenciação, as formas promastigotas migram para o aparelho sugador do inseto e são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado.

2- Forma amastigota, encontrada nas células do hospedeiro vertebrado. Após a inoculação das formas promastigotas na derme, parasitas que escapam do mecanismo de defesa inespecífica do hospedeiro são interiorizados pelas células do sistema mononuclear. No interior dessas células, ocorre novo processo de diferenciação, com arredondamento celular e perda do flagelo aparente. Dentro das células fagocíticas, nos vacúolos parasitóforos, conseguem resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Chang, 1983 apud Silva, 1999; Camus et al., 1995) e se multiplicar por divisão binária, ocorrendo a destruição da célula e a liberação de parasitos na derme, os quais serão novamente ingeridos por outro flebótomo.

I.3 O Antígeno de Montenegro

Com a finalidade de auxiliar o diagnóstico clínico da leishmaniose tegumentar, Montenegro, em 1926, introduziu na prática médica um teste realizado por intermédio da injeção intradérmica de uma suspensão de promastigotas mortas de *Leishmania braziliensis* (Montenegro, 1926). Ainda hoje o Teste de Montenegro ou Intradermorreação de Montenegro (IDRM), que provoca uma reação cutânea de hipersensibilidade retardada, é considerado o exame complementar mais importante no diagnóstico da LTA por sua grande especificidade e sensibilidade, apresentando-se positivo em 86,4 a 97,5% dos casos de LTA (Coutinho, 1981; Marzochi, 1992).

Os trabalhos de Montenegro foram confirmados por Buss em 1929 (apud Salles Gomes, 1939), e outros autores, porém com um número limitado de pacientes. Utilizando suspensões alcalinas fenoladas de promastigotas de *L. braziliensis*, Salles Gomes testou 120 pacientes, dos quais 25 confirmados parasitologicamente, encontrando 117 (97,5%) positivos, respectivamente. As reações eram classificadas de 1 a 4 cruces, como reações

duvidosas até fortemente positivas, e lidas entre 48 e 72 horas após a aplicação. Comparando extratos com diferentes idades, verificou apenas uma ligeira perda de potência, não significativa, dos antígenos mais velhos.

Pessoa & Pestana (1940) confirmaram os dados de Salles Gomes e demonstraram que a intensidade da IDRM associava-se com a presença de lesão mucosa e que permanecia a positividade da reação em indivíduos curados. Concluíram que a alergia aos antígenos de *Leishmania* deveria permanecer por toda a vida do indivíduo. Assim, a IDRM constituiria ferramenta importante também no diagnóstico retrospectivo da leishmaniose, portanto útil para inquéritos epidemiológicos.

Echandi (1953) descreveu casos de possíveis reações “falso-negativas” em indivíduos com lesões cutâneas ou história de LT, acreditando que estes casos poderiam estar associados a possíveis fatores imunodepressores atuando em paralelo à realização da IDRM como infecções viróticas (sarampo, rubéola, febre amarela) e vacinação contra febre tifóide. O critério de leitura foi a medida da área da pápula apresentada e como ponto de corte da reação o diâmetro de 5mm, o qual tem sido utilizado até o presente momento.

Embora a leitura da reação normalmente seja realizada 48 horas após a aplicação do teste, Rabello *et al.* (1945) (apud Silva, 1999) e Fagundes *et al.* (2000), relatam o aparecimento de reações locais no ponto de inoculação do antígeno de Montenegro cerca de dez dias após a aplicação do teste, em indivíduos sadios negativos à leitura em 48 horas, sendo tais reações morfologicamente indiferenciáveis da resposta positiva clássica à IDRM.

Em relação à leishmaniose visceral, a IDRM tornou-se importante para estudos epidemiológicos, destacando-se o encontro de indivíduos positivos sem desenvolvimento de doença, que logo foi associado à infecção subclínica.

De regra geral, considerava-se a IDRM como altamente específica para o diagnóstico da LTA, apresentando sensibilidade em torno de 90,0% e manutenção da positividade por toda a vida do indivíduo. Muito mais tarde, estudos prospectivos mostraram que pode ocorrer negatificação da IDRM em indivíduos inicialmente positivos, cerca de cinco anos após o teste inicial, conforme demonstrado por Mayrink *et al.* (1976) e Marzochi *et al.* (1980). A alta especificidade e sensibilidade da IDRM como método diagnóstico, associada à sua praticidade e facilidade de execução, fez com que esse teste fosse considerado o melhor exame para o diagnóstico da LTA.

Vários estudos confirmaram posteriormente a utilidade da IDRM no diagnóstico clínico (Sessa *et al.* 1976; Cuba Cuba *et al.* 1980; Furtado, 1980; Guerra *et al.* 1985; Oliveira-Neto *et al.* 1988; Arbaji *et al.* 1993; Acedo Sanchez *et al.* 1996).

I.4 Diferentes Antígenos de Montenegro Produzidos

Em sua tese de mestrado, Silva (1999) fez uma revisão ampla sobre o antígeno de Montenegro, sobre a qual estamos nos referenciando nesta seção. A autora partindo de 1926, quando o antígeno de Montenegro foi descrito, destacou os trabalhos dos vários pesquisadores que, em diferentes épocas, vêm relatando estudos acerca do antígeno.

Em uma ordem cronológica são apontados esses estudos, a seguir:

1939/ 1940 - A intradermorreação de Montenegro foi utilizada e avaliada em larga escala e Salles Gomes a denominou de "Intradermorreação de Montenegro" (IDRM), para que fosse usado no diagnóstico em seres humanos (Salles-Gomes, 1939).

1941- Passa a predominar a utilização de suspensão parasitária fenolada a 0,4% (Correa, 1941 *apud* Silva, 1999).

1951- É utilizada fração polissacarídica de *L.braziliensis* em timerosal 1: 5000, em dois pacientes e 8 controles sadios, mas esse antígeno não foi avaliado (Pelegriño e Macedo, 1958 *apud* Silva, 1999).

1952 – Rotberg demonstrou que os extratos originais de Montenegro continham alguns parasitos íntegros ou mesmo restos parasitários particulados, os quais seriam desencadeantes da reação intradérmica. No mesmo trabalho, mostrou a correlação linear entre a concentração da suspensão de parasitas e o tamanho da endureção à IDRM, propondo a concentração de 10.000.000 de parasitos nos antígenos para diagnóstico .

1958 - Corrêa & Amato Neto, (1958) descreveram o processo de produção de antígenos de Montenegro com promastigotas de *Leishmania braziliensis* rompidas por ultra-som e diluídas em timerosal a 1:10. 000. Após o período de dois anos de sua produção o antígeno sonicado apresentou-se estável.

1969 / 1973 - Os trabalhos de Imperato e Diakite (1969) e Imperato *et al.* (1974) na África, mostraram a ocorrência de reações positivas à salina fenolada a 0,5 em cerca de 5% dos indivíduos testados concomitantemente com antígeno de Montenegro e solução veículo controle, e a ausência de reações falso positivas à solução veículo mertiolatada (Imperato *et al.* (1974). Após esses trabalhos iniciou-se a utilização em larga escala do Timerosal (Merthiolate®) como preservativo nos antígenos de Montenegro.

1972 - Barbosa *et al.* (1972) descreveram a utilização de antígenos de outros parasitos humanos e animais, compararam antígenos de *Leptomonas pessoai* e *Leptomonas braziliensis* com antígeno de *Leishmania braziliensis* em 30 pacientes de leishmaniose tegumentar e 64 portadores de outras afecções, obtendo 100% de especificidade nos pacientes e 100% de negatividade entre os controles. O ponto de corte utilizado foi de

10mm e 76,0% dos resultados foram concordantes entre os 3 antígenos utilizados (apud Silva, 1999)

1974/1975 - Shaw & Lainson (1975) produziram antígeno solúvel a partir de sobrenadantes de cultivo de *Leishmania* em sacos de diálise, obtendo reações tardias e imediatas em 28 de 36 pacientes de leishmaniose cutânea. Esses antígenos não têm sido usados em outros estudos

1977- Melo *et al* (1977) padronizaram antígenos de *Leishmania braziliensis* pela concentração padronizada de nitrogênio protéico/ml em veículo mertiolatado a 1:10000, obtendo correlação positiva entre a área endurecida apresentada e a concentração de nitrogênio do antígeno. Foram testados 100 pacientes com diagnóstico parasitológico de LTA e 30 indivíduos sadios, de áreas não endêmicas, como controles. Com a concentração de 40 µg/ml, a sensibilidade foi de 96,0% entre os 100 pacientes e foram obtidas reações negativas em todos os controles. O critério de leitura foi a medida da área da endureção, de acordo com o proposto por Pelegrino & Macedo(1956) para leitura de intradermorreações na esquistossomose. A produção de antígenos de acordo com Melo *et al* (suspensão sonicada, na concentração de 40 µg/ml de nitrogênio protéico), tem sido a mais utilizada nos antígenos de Montenegro produzidos no Brasil.

1986 - Reed *et al*(1986) produziram antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* para IDRM em pacientes de leishmaniose visceral, obtendo 95-100% de sensibilidade em pacientes curados de calazar e nenhuma reação positiva em controles sadios. O extrato foi padronizado com 25 µg de proteína/mL e esterilizado por filtração.

1990 - Badaró *et al*(1999) avaliaram a estabilidade do extrato após 1 e 3 anos de produção, mostrando a manutenção da sensibilidade e potência do extrato, apesar da degradação.

Contudo ainda hoje, como ressaltou Silva (1999), não está estabelecido um antígeno padrão para a IDRM de uso universal.

I.5 O Antígeno de Montenegro de Bio-Manguinhos e sua Produção

Desde 1992, Bio-Manguinhos, uma unidade técnico-científica da FIOCRUZ cuja principal missão é a produção de vacinas e insumos para diagnóstico, vem produzindo Antígeno para reação de Montenegro a partir de cultivo de *Leishmania amazonensis*, cepa PH8, fornecida pelo Centro de Referência Internacional de Caracterização de Cepas de *Leishmania*, Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz. Após o cultivo dos parasitos e o processamento da suspensão de *Leishmania* de forma estéril e a sonicção,

determina-se a concentração do nitrogênio protéico e o ajuste para 40 microgramas/ml (Melo et al, 1977). Em seguida a esta etapa, ocorre o envase do produto e a estocagem. O produto é encaminhado para o controle de qualidade, onde é submetido a testes de esterilidade e inocuidade envolvendo avaliação histopatológica.

O quadro I demonstra a distribuição de Antígenos de Leishmania P/ Reação de Montenegro Bio-Manguinhos® nos últimos sete anos, apresentados atualmente em frascos de 1 mL. Cada frasco de 1 mL contém 10 doses; os frascos de 5mL não estão sendo mais produzidos. Cada lote de antígeno corresponde, a cerca de 500 frascos, ou seja a aproximadamente 5000 testes.

Quadro I: Produção do antígeno de Montenegro Bio-manguinhos® em número de frascos e de doses no período de 1998 ate junho de 2004.

Ano	Frascos 1 mL	Frascos 5 mL	doses
1998	677	342	23.870
1999	196	390	21.460
2000	1898	306	34.280
2001	4393	687	78.280
2002	2422	68	27.620
2003	1791	-	17.791
2004	650	-	6.500
Total	11377	1.793	209.801

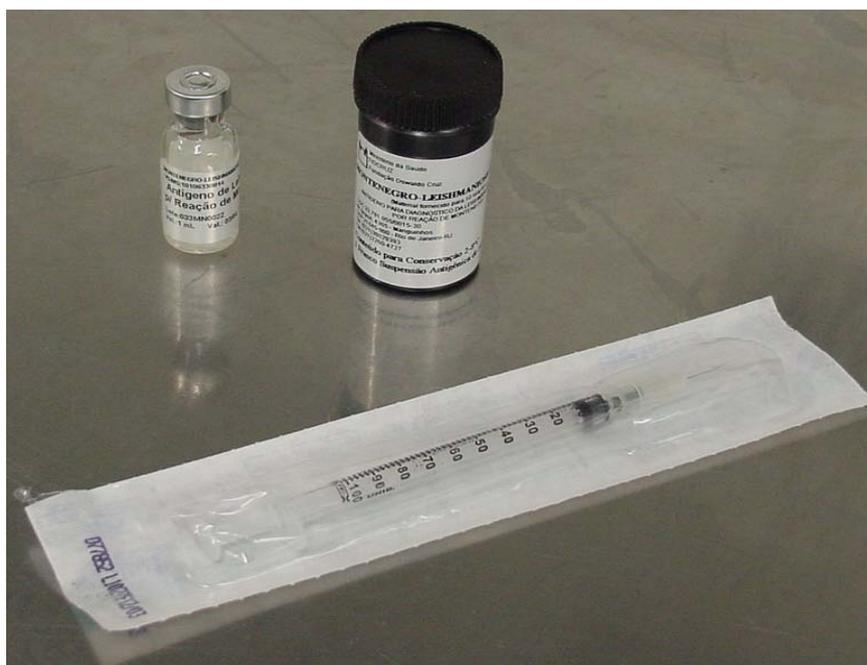


Figura 1- Apresentação Comercial do “Antígeno de Leishmania Para a Reação de Montenegro.”

O antígeno de Montenegro, após a sua aprovação pelo controle de qualidade, é armazenado em câmara fria com temperatura que varia entre 4° e 8° C na Central de Armazenamento de Produtos Acabados. Em relação ao prazo de validade de 1 ano, foi estabelecido por avaliações de esterilidades e inocuidades. O prazo para se obter um lote apto a distribuição é de aproximadamente 45 dias.

Cada frasco de 1ml antígeno de Montenegro custa para Rede de Saúde Pública cerca de quarenta e três reais.

As informações contidas na bula referem-se ao princípio do teste, à cepa e salina fenolada 0,4% utilizadas, conservação e validade do produto, cuidados e precauções, leitura e interpretação, referências bibliográficas e assistência ao usuário.

A legislação na ANVISA, que regula o registro de produção do antígeno de Montenegro corresponde às Portarias n° 686 e n° 8 e às RDCs n° 59 (sobre Boas Práticas de Fabricação de Produtos para saúde) e n°210 (sobre boas práticas de fabricação de medicamentos). Atualmente esse produto de Bio-Manguinhos encontra-se registrado na ANVISA dentro da categoria “correlatos”(produtos para saúde) com registro VS/ MS e n° 101063300014.

Recentemente, Fagundes *et al* (1999), considerando a hipótese do Teste de Montenegro apresentar reações falso-positivas devido ao Timerosal presente como conservante, definiram o melhor conservante a ser utilizado comparando o timerosal a

1:10.000 e o fenol a 0,4 %. A partir dessa pesquisa de cooperação entre o Centro de Referência Nacional em Leishmaniose Tegumentar, Departamento de Microimunoparasitologia do IPEC/FIOCRUZ e o Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos, através de amplo estudo randomizado e duplo cego, o antígeno BIOMANGUINHOS[®] passou a ser produzido em salina preservada com fenol a 0,4 %, a partir de maio de 2001.

I.5.1 Detalhamento da Rotina Preconizada de Produção do Antígeno de Bio-Manguinhos (1992-2002)

Para esse processo de produção, inicialmente inocula-se uma garrafa de 100 mL de cultura contendo *Leishmania amazonensis* na concentração de $3,8 \times 10^7$ promastigotas/ mL, em 1000 mL de meio de cultura Schneider, acrescido de 5% de soro fetal bovino. Depois, incuba-se a cultura em estufa BOD, à temperatura de 23° - 25° C por 4 dias.

Após este período, prepara-se uma lâmina para visualizar e contar os parasitas. Em seguida, centrifuga-se a cultura com salina fisiológica 0,9% estéril e ressuspende-se o sedimento com salina fenolada 0,4% .

A suspensão antigênica de *Leishmania* é sonicada (Correa & Amato Neto, 1958; Melo, 1977), depois visualizada, e uma alíquota encaminhada ao Laboratório de Análise Físico-Químico, Departamento de Controle de Qualidade, para dosagem do nitrogênio protéico e total pelo método de Kjeldahl. Com a liberação deste resultado, determina-se a quantidade de salina fenolada 0,4% que será adicionada para atingir a concentração de 40µg /mL. A suspensão é envasada em frascos de 1mL e depois encaminhada ao Laboratório de Controle Microbiológico, Departamento de Controle de Qualidade para controle de esterilidade. Com a emissão de laudos contendo aprovação, desta fase, inocula-se o antígeno em 2 camundongos fêmeas pesando aproximadamente 19 gramas, são observados por um período de 14 dias.

Após esse tempo, sacrificam-se os camundongos, retirando-se o baço, fígado, pulmão e pele para avaliação histopatológica. O Laboratório de Neurovirulência, Departamento de Controle de Qualidade, executa esta etapa, que após a conclusão da avaliação emite o laudo. Estando tudo dentro dos padrões, o lote do antígeno estará pronto para ser enviado. Desde a obtenção da massa parasitária de o antígeno de Montenegro, fica armazenado em temperatura a 4C° ,assim permanecendo até o período de estocagem.

Acerto da Concentração Antigênica.

Após o trabalho de Melo et al. (1977), que correlacionou a eficácia do antígeno de Montenegro à concentração de antígenos protéicos presentes, foi estabelecida dose de 40 microgramas de nitrogênio protéico /mL de suspensão, ou seja, 4 microgramas de nitrogênio protéico/ 0,1mL . Com não mais dispomos do método utilizado pelo trabalho referido (neslerização) para padronização dos 40µg/ mL de nitrogênio protéico, nos baseamos no antígeno utilizado por Melo et al. (1977) como padrão e o testamos em conjunto ao antígeno de Bio-Manguinhos, dosando o nitrogênio protéico pelo método de Kjeldalh (Farmacopéia japonesa 1986).

Após a testagem dos dois produtos, representados pelo antígeno de Melo produzido pela Biobrás e por Bio-Manguinhos®, realizada simultaneamente, foi estabelecido um fator de correção (2,29), o qual relaciona a quantidade de nitrogênio protéico obtida para o atual antígeno padrão à quantidade obtida para o antígeno teste. Para o acerto da concentração antigênica para 40µg de nitrogênio protéico/mL do antígeno teste, divide-se o resultado da dosagem de nitrogênio protéico pelo fator de correção (2,29). O resultado dessa divisão é multiplicado pelo volume de suspensão de Leishmania existente, resultando no volume final de suspensão a ser obtida para que o antígeno fique na concentração desejada.

I.5.2 Prazo de Validade do Antígeno para Reação de Montenegro

O prazo de validade do Antígeno de Leishmania para Intradermorreação de Montenegro Bio-Manguinhos® foi estabelecido arbitrariamente no ano de 1992, por inferência ao produto padrão Biobras o qual correspondia a 12 meses. À época, não havia normas legais de controle de qualidade.

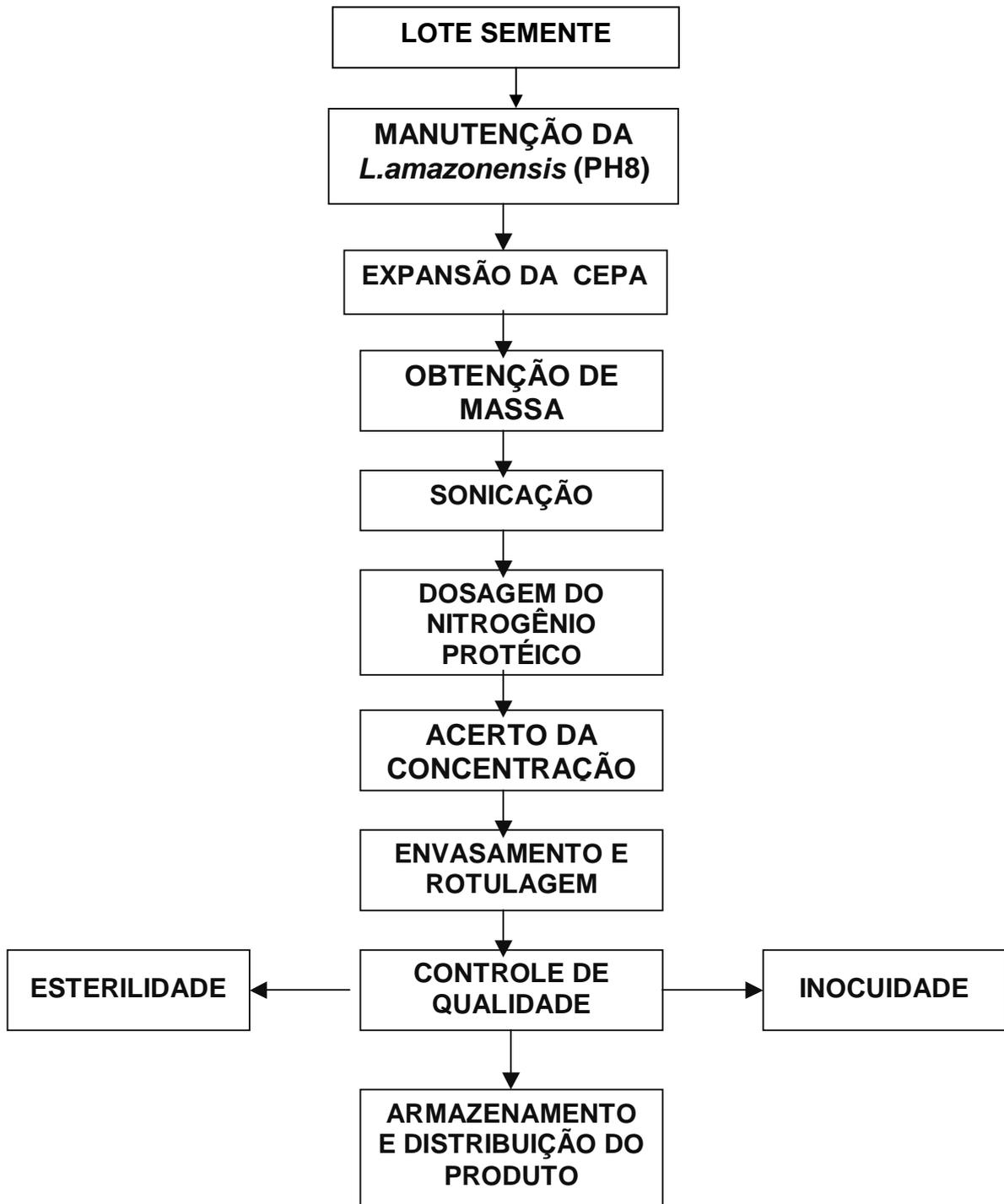
I.6 Considerações Críticas

O processo descrito de produção do Antígeno de Bio-Manguinhos para a Intradermorreação de Montenegro, e apresentado esquematicamente no fluxograma a seguir (figura 1), demonstra que, apesar de devidamente regulamentado pelos órgãos de controle do Ministério da Saúde, o atual processo requer o aprimoramento das seguintes etapas : (a) determinação da concentração do parasito conforme período de incubação ; (b) definição da fase de maior rendimento do antígeno; c) controle de qualidade incluindo (c₁) dosagens de endotoxinas e pirogênio; (c₂) avaliação da especificidade do antígeno; (c₃) avaliação do prazo de validade; (c₄) qualidade da solução preservadora. Além disso,

seria relevante poder utilizar um melhor método para a quantificação e o ajuste da concentração antigênica .

Uma vez atendidos os diversos pontos considerados, poderíamos produzir lotes de antígenos com maior rendimento e melhoria da qualidade, ainda, possivelmente, reduzindo os custos.

**Figura 1- FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO
ANTÍGENO DE LEISHMANIA PARA REAÇÃO DE MONTENEGRO
BIO-MANGUINHOS**



II JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

A implementação de programas coordenados pela Secretária de Vigilância em saúde/MS, visando ao controle das leishmanioses, vem mobilizando diversas instituições em âmbito Nacional, na tentativa de minimizar o problema.

A FIOCRUZ, por intermédio de Bio-Manguinhos, desde 1992 vem apoiando os Programas coordenados pela SVS/MS para o controle das Leishmanioses Tegumentar e Visceral Humana e Canina, com a produção e distribuição de antígenos para Reações de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Intradérmica de Montenegro (IDRM). Atualmente concentra-se na FIOCRUZ a produção e distribuição destes reativos para toda a rede pública de saúde do Brasil.

Por outro lado, em parceria com Bio-Manguinhos, o Centro de Referência Nacional em Leishmanioses sediado no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ, vem desenvolvendo, entre outros, estudos acerca da especificidade e valor diagnóstico/epidemiológico do Teste de Montenegro. Embora sendo um teste de uso universal para o diagnóstico das leishmanioses tegumentares, muitas questões necessitam ser melhor elucidadas, incluindo seus processos de produção que precisam ser aprimorados e padronizados principalmente tratando-se de um teste para uso *in vivo*.

Ainda que venha sendo utilizado na rotina diagnóstica desde a década de 30-40 (Salles Gomes, 1939), e permaneça atualmente como o teste de mais ampla indicação por sua sensibilidade, simplicidade e seu baixo custo relativo, as normas para sua produção e distribuição não sofreram, até hoje, uma padronização universal. Em consequência, uma grande variedade de antígenos é utilizada por laboratórios produtores, dificultando, no mínimo, a comparação de resultados entre diferentes grupos clínicos.

Assim, pela grande acessibilidade e utilização decorrente na rotina diagnóstica do Teste de Montenegro no Brasil, a necessidade de sua padronização tem sido freqüentemente assinalada, a começar pela seleção do antígeno .

A relevância do presente estudo fortalece-se pelo fato de estar dirigido à melhoria tecnológica de utilização do antígeno de Montenegro e sua imediata aplicação ao SUS, e de associar-se às leishmanioses, importante endemia brasileira incluída entre as ditas negligenciadas, portanto, cuja atenção, limita-se ao setor público.

Além do mais, a justificativa do objeto do trabalho é reforçada ao se considerar a capacidade instalada de Bio-Manguinhos como centro produtor e a FIOCRUZ como órgão de pesquisa e controle de qualidade em saúde, entre outras finalidades. Deve ser levada em conta também entre as facilidades para o desenvolvimento do trabalho, as funções do Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos e do Centro

de Referência Nacional em Leishmaniose Tegumentar do IPEC, associando a experiência acumulada tanto em produção quanto em avaliação clínica e de campo do insumo em questão.

Também, como mestranda do curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle Qualidade da FIOCRUZ e trabalhando na Tecnologia de Produção do Antígeno de Montenegro no Departamento de Reativos para Diagnóstico em Bio-Manguinhos, dispomos do local ideal para o desenvolvimento da pesquisa de natureza metodológica, que é o SEPRO (Setor de Protozoários desse Departamento) onde contamos com o apoio local, além do interesse das três unidades científicas da FIOCRUZ envolvidas.

Finalmente, mesmo compreendendo que o estudo do teste de Montenegro não se esgotará, no tempo demandado, todas as etapas consideradas (item 1.6), pretendemos dar um passo importante na normatização técnica e melhoria da qualidade do teste.

III OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

Padronizar o processo de produção do antígeno de *Leishmania* para a Intradermoreação de Montenegro, visando a sua produção em maior escala para atender às necessidades crescentes no diagnóstico clínico e de inquérito de campo das leishmanioses.

III.2 Objetivos Específicos

Estabelecer padrões de procedimentos técnicos no processo de produção de antígeno para o teste de Montenegro quanto a:

- Concentração antigênica - melhor inóculo;
- Controle físico-químico;
- Controle biológico - teste de inocuidade;
- Prazo de validade;

IV METODOLOGIA

O processo de trabalho foi desenvolvido em Bio-Manguinhos, envolvendo o Departamento de Reativos para Diagnóstico através do Setor de Protozoários e Setor de Química de Proteínas; e o Departamento de Controle de Qualidade, através do Laboratório de Controle Físico-Químico (Setor de Apoio e Pesquisa), Laboratório de Controle Microbiológico(Setor de Esterilidade e Setor de Controle Biológico) e o Laboratório de Neurovirulência.

- **Estabelecimento do Lote Semenete Com Cepa de *Leishmania* para obtenção do antígeno**

Manteve-se a utilização da cepa PH8 (IFLA /BR/ 1967/ PH8) de *Leishmania amazonensis*, isolada a partir de flebotomíneos da região amazônica. A escolha desse parasito deve-se a sua facilidade de crescimento em meio de cultivo *in vitro*, boa antigenicidade e utilização por diferentes laboratórios. Como de rotina, foram usadas na produção formas promastigotas do parasito e efetuada a manutenção da cepa através de repique a cada 72 horas, em garrafas contendo 25 mL de meio Schneider (Sigma) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Sigma) mais 5% de cultura de *Leishmania* (volume/volume) sendo as culturas armazenadas em estufa BOD à temperatura de 23°-25° C.

A escolha dessa faixa de temperatura deve-se à experiência de cultivo do parasito ao longo dos últimos anos de observação semanal da cepa em microscopia.

IV.1. Determinação das Curvas de Crescimento

- **Determinação da Curva Padrão**

Para a determinação da fase logarítmica, ou seja, a fase na qual os parasitos em cultivo estão em maior número e com boa viabilidade, foram realizadas três curvas básicas de crescimento, a partir do inóculo de 10^6 leishmanias considerando a prática geral na escolha desse quantitativo.

Foram utilizadas, para cada curva, 300mL do meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino, sendo distribuídos 10 mL em cada garrafa totalizando 30 garrafas Corning para cultivo celular medindo 25cm^3 . Para cada dia, 3 garrafas foram contadas em câmara de Neubauer. As culturas foram observadas diariamente, pelo período de 10 dias, e a contagem quase sempre foi realizada no mesmo horário. Paralelamente, por

determinação a 555 nanômetros, foi efetuada a quantificação dos parasitos através da medida da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro UV1203, durante o mesmo período.

- **Determinação da Curva com Azul de Tripán**

O objetivo da realização desta curva foi observar as formas integras de parasitas existentes durante o período de cultivo. Utilizou-se a coloração de azul de Tripán para quantificar as leishmanias em Câmara de Neubauer, visando a contar somente as formas completas das leishmanias, que não se impregnam pela ação do corante, possibilitando uma contagem mais correta e real. Esse processo foi repetido pelo período de dez dias, quase sempre se respeitando o mesmo horário. Além da contagem, também foi determinada a densidade ótica correspondente à medida de absorvância, feita por espectrofotômetro. Assim, pôde-se obter duas curvas de quantificação de leishmanias: por contagem direta e densidade ótica.

- **Quantificação dos antígenos protéicos para cada dia de crescimento da cultura**

Depois da contagem, as culturas contadas foram lavadas com salina fisiológica estéril 0,9%, centrifugadas a 3.000 rpm (2984 g) em 3 ciclos de 20 minutos cada e ressuspensas também em salina. Em seguida foram submetidas a um aparelho de ultrassom. E para que os parasitos estivessem totalmente rompidos (sonicados), em aparelho de ultrassom utilizou-se cinco ciclos de 20 minutos cada com intervalo de 5 minutos. No final, uma alíquota foi retirada e observada ao microscópio ótico para confirmar o rompimento dos parasitos pelo ultra-som. Após isso, a massa parasitária foi armazenada em *freezer* -20°C. De cada dia de cultivo, foram retirados 5 mL de suspensão sonicada e enviados ao Laboratório de Controle Físico-Químico desta unidade para quantificação de antígenos protéicos através da determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

O melhor ponto da curva de crescimento das leishmanias para a obtenção de antígenos correspondeu ao momento de maior multiplicação parasitária, detectada por maior nível de absorvância, e maior dosagem protéica.

IV.2 Determinação do Melhor Inóculo para a Produção Antigênica

A partir da determinação do melhor ponto da curva de crescimento para o cultivo, foi determinado o melhor inóculo visando a obtenção de lotes mais homogêneos, e maior rendimento da produção.

Para essa determinação, foram produzidos lotes pilotos com diferentes inóculos iniciais, os quais foram submetidos ao mesmo processamento para obtenção, quantificação, sonicação e posterior dosagem de antígenos protéicos das massas parasitárias. Para o crescimento, foram inoculados 4 frascos de 300mL de meio Schneider, acrescido de 10% de soro fetal bovino, com 30 mL de suspensão de parasitos, nas seguintes concentrações iniciais:

Frasco 1: 30mL de suspensão de parasitos contendo 10^5 parasitos/ mL

Frasco 2: 30mL de suspensão de parasitos contendo 10^6 parasitos/ mL

Frasco 3: 30mL de suspensão de parasitos contendo 10^7 parasitos/ mL

Frasco 4: 30mL de suspensão de parasitos contendo 10^8 parasitos/ mL

Quando as culturas atingiram a fase logarítmica, conforme determinado pela curva de crescimento, as massas parasitárias foram lavadas com salina fisiológica estéril 0,9%, centrifugadas a 3.000 rpm (2984 g) em 3 ciclos de 20 minutos cada e ressuspensas também em salina fisiológica. Em seguida, foram sonicadas (em 5 ciclos de 20 minutos cada, com intervalo de 5 minutos) e as massas armazenadas em *freezer* - 20°C. A seguir, foram quantificadas as proteínas totais, o nitrogênio protéico e o nitrogênio total.

Assim, o melhor inóculo corresponde, no final do processamento e quantificação dos antígenos protéicos, ao que apresentou melhor rendimento, determinado pela maior concentração de antígenos obtida.

IV.2.1 Verificação da Repetibilidade das Curvas

As determinações pelos métodos de contagem de parasitos em câmara de Neubauer e dosagem de nitrogênio protéico e total pelo método de Kejldahl foram realizados em dois experimentos para comparação dos resultados.

IV.3 Determinação do Método mais Adequado para Aferição da Concentração Antigênica

Foram comparados dois diferentes métodos de dosagem de antígenos protéicos para a determinação do melhor método de quantificação do extrato parasitário através de dosagem de nitrogênio protéico e nitrogênio total (Método de Kjeldahl), e de proteínas totais (Método do Biureto). Como etapa prévia à utilização dos métodos de Kjeldahl e Biureto, foi efetuada a precipitação da amostra com ácido tricloroacético.

- **Precipitação com ácido tricloroacético**

Para realização do Método de Kjeldahl, visando à determinação de nitrogênio protéico e total, utilizou-se 1 mL de suspensão proveniente dos diferentes inóculos (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) aos quais foram adicionados 2,0mL de água destilada e 0,5mL da solução aquosa de ácido tricloroacético 10%. A precipitação ocorreu em 60 minutos.

Para a posterior utilização do método do Biureto, que visa à quantificação de proteínas totais, partiu-se de 5 mL de suspensão proveniente dos diferentes inóculos (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8), às quais foram adicionados os 10,0 mL de água destilada e 2,5mL da solução aquosa de ácido tricloroacético 10%. A precipitação ocorreu em 60 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação por 2700 rpm (2684 g) durante 30 minutos foram descartados os respectivos sobrenadantes, enquanto o precipitado, após dissolução adequada, teve seu teor protéico determinados pelo métodos de Kjeldahl e do Biureto.

IV.3.1 Utilização do Método Kjeldahl

O precipitado formado (item IV.3) foi dissolvido em 10 mL de NaOH 2% e transferido para um balão de mineralização onde foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e uma “pitada” de catalisador de Demazert ou mistura selênica. Mineralizou-se a referida amostra em chapa mineralizadora durante 2 horas ou até que a mesma ficasse incolor. Em seguida, a amostra mineralizada foi destilada em aparelho de destilação tipo Kjeldahl, sendo utilizados 10 mL de solução hidróxido de sódio 40% para a liberação da amônia. A amônia liberada foi recolhida em um frasco Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, contendo 2 mL de ácido bórico 4% e 2-3 gotas de indicador misto. Interrompeu-se o recolhimento quando o volume atingiu cerca de 30 mL.

Procedeu-se a titulação usando-se HCL 0,014N. Por fim foi efetuado um ensaio em branco e duplicata das amostras.

IV.3.2 Utilização do Método Biureto.

Para a quantificação protéica pelo método do Biureto partiu-se da realização de uma curva, tendo como padrão a solução de BSA (ver anexo 2).

O precipitado acima formado (IV.3.1.) foi dissolvido em 1mL de NaOH 0,01N e, desta solução, foi utilizado 0,2 mL ao qual volume foi adicionado 0,05 mL de água destilada e 1mL do reativo de Biureto. Deixou-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Foi feita a determinação das absorbâncias das amostras no comprimento de onda de 555nm. Também foi feito um branco consistindo de 15 mL de água e 2,5 mL de TCA10%. A solução referente a este branco foi trabalhada igualmente às amostras do inóculo e utilizada para “zerar” o espectrofotômetro (absorbância = 0 ou transmitância = 100%).

Além da dosagem de proteínas das suspensões com diferentes inóculos iniciais conhecidos, foi dosado também o teor protéico de antígenos de Montenegro já na concentração de uso (40µg nitrogênio protéico/ mL).

Uma amostra de suspensão de Leishmania contendo 4,49 mg/mL de nitrogênio protéico foi ajustada após a diluição adequada para a concentração de 40µg de nitrogênio protéico/ mL. Em seguida, 5mL dessa suspensão ajustada foi adicionada a 10 mL de água e 2,5 mL de TCA 10%.

Deixou-se repousar por 30 minutos; centrifugou-se a 2.700 rpm durante 30 minutos; desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1mL de NaOH 0,01N.

Após o tratamento foi dosada a proteína pelo método do Biureto, em duplicata.

As quantificações são apresentadas no Anexo 2.

IV.3.3 Verificação da Repetibilidade das quantificações.

Foram comparados, em dois experimentos os resultados das quantificações de nitrogênio protéico e total pelo método de Kjeldahl e de proteínas totais pelo método do Biureto, sendo este último realizado em triplicata.

Considerando-se a indicação posterior de avaliação da reprodutibilidade da metodologia, após a definição do melhor inóculo e sua repetibilidade, é necessário definir a correspondência entre a quantidade de antígeno dosado pelo método de Kjeldahl e do Biureto.

Para isso será calculado um fator de correção utilizando-se as dosagem estimadas pelo o método do Biureto, levando-se em conta os resultados obtidos a partir dos diferentes inóculos iniciais.

IV.4 Determinação dos Controles de Qualidade

O controle de qualidade do antígeno padrão (inóculo 10^7) constituiu-se de: controle microbiológico para evidenciação de contaminação bacteriana e por fungos e controle histopatológico (teste de inocuidade) para aferição da segurança *in vivo* (com animais de experimentação).

IV.4.1 Determinação do Controle Microbiológico

Exame Direto

Foram utilizados tubos contendo 20mL do meio Tioglicolato de Sódio (MERCK) e tubos de meio Caseína Soja (MERCK) , para inocular 1ml da amostra e incubar por 14 dias.

O tubo contendo o meio Tioglicolato de Sódio foi mantido à temperatura de 30 a 35°C e o tubo contendo Caseína Soja à temperatura de 25°C, durante 14 dias; ambos os tubos foram observados todos os dias macroscopicamente (Otto Bier 1985).

Caso a observação macroscópica revelasse alguma alteração no meio de cultura (turvação, formação de grumos), era feita um esfregaço em lâmina do material para coloração de Gram e observação em microscópio óptico para identificação do contaminantes. Qualquer alteração macro ou microscópica nos meios de cultura utilizados indicava contaminação do antígeno e reprovação do mesmo para distribuição.

Dosagem de endotoxinas

Foi utilizado o teste gel *Clot*, para avaliar qualitativamente a presença de endotoxinas de acordo com o grau de sensibilidade (Anexo 4). Os testes fazem parte do kit Endosafe®.

O teste pela técnica de gel *Clot*, fornece resultados binários, positivo ou negativo, conforme a formação de coágulo ou não; constituindo um teste muito objetivo, apesar de não ser quantitativo é considerado muito objetivo (Coopre,1990).

Teste de pirogênio

Foi utilizado o teste *in vivo* em coelhos, de acordo com a Farmacopéia Brasileira. Para cada amostra foram utilizados 3 coelhos de ambos os sexos. Estes coelhos foram submetidos a um exame preliminar pelo período de 72 horas, quando foi acompanhada a variação da temperatura corporal dos animais. Terminado este período somente os coelhos que não apresentaram variações acima de 0,5°C foram utilizados para o teste. Este consiste na introdução anal do antígeno nos três coelhos (respectivamente 1,9 ; 1,8 e 1,9 mL), seguida do registro de temperatura a cada 30 minutos durante 5 horas. No final do teste a temperatura não deverá ultrapassar a variação de 0,6°C para que seja considerado dentro do padrão de qualidade. (Anexo 5).

IV.4.2. Controle Histopatológico -Teste de Inocuidade

Para o teste de inocuidade, realizado *in vivo* foram utilizado *in vivo* em *Mus musculus* Suiços, fêmeas, pesando 20 gramas nos quais foi avaliado o antígeno após a padronização do inóculo antígeno padrão com solução salina fenolada 0,4% (preservante) e com solução salina fisiológica 0,9% (controle). Foram utilizados os seguintes reativos:

- Antígeno de Montenegro padrão 03UMN006Z
- Salina fenolada 0,4%
- Salina fisiológica 0,9%
- Grupo controle de animais não inoculados.

Cada produto foi inoculado em 5 camundongos fêmeas, pesando aproximadamente 20 gramas. Os 20 camundongos de linhagem Swiss foram oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório Animal (CECAL) /FIOCRUZ. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno específicas para a espécie e receberam ração peletizada e água filtrada *ad libitum*.

Os animais foram tricotomizados na região dorsal (cérvico-torácica). A seguir, foram inoculados por via intradérmica 0,1mL da suspensão do antígeno de Montenegro (Bio-Manguinhos), correspondente à mesma dose humana. Durante o período de quatorze dias os camundongos foram examinados com a finalidade de se observar as reações inflamatórias no local da inoculação. No final do período, todos os animais

foram submetidos á eutanásia por inalação de carbono Co₂ em câmara hermética e própria para o procedimento.

Após exame macroscópico, colheram-se fragmentos de pele, fígado e baço os quais foram fixados em formalina tamponada a 10%.

Uma vez fixados, fragmentos do fígado, baço e pele foram recortados em microtomo, lavados em água corrente, desidratados, clarificados, infiltrados por parafina, cortados a quatro micrômetros e corados pela técnica de hematoxilina-eosina, para serem examinados ao microscópio óptico.

Os critérios para aprovação do teste de inocuidade foram :

- Ausência de morte dos animais durante o teste.
- Ausência de alterações macroscópicas na necropsia.
- Padrão histológico normal dos órgãos examinados.

IV.5 Avaliação do Prazo de Validade do Antígeno para Intradermorreação de Montenegro Bio-Manguinhos

O cronograma da pesquisa impediu no momento, a análise do prazo de validade do teste aperfeiçoado pelo presente estudo, uma vez que esse produto requereria um tempo maior para acompanhamento. Por isso utilizamos como modelo de avaliação produtos estocados para inclusão no processo de padronização.

Diferentes frascos de antígenos estocados a 37°C, foram avaliados 20 meses após o vencimento do prazo de validade dos mesmos, estabelecidos previamente (sem estudo anterior) como de 12 meses. Corresponderam aos seguintes reativos:

Antígeno de Montenegro com validade até março de 2002 (lote 013MN005Z);

Antígeno de Montenegro com validade até janeiro de 2003 (lote 021MN001Z),

Antígeno de Montenegro dentro do prazo de validade como controle (lote 03UMN006Z).

A avaliação constituiu-se dos controles microbiológicos (item IV.4.1), sendo injetável, aplicação das normas de boas práticas de laboratório, área bio-limpa, procedimentos operacionais obedecendo as mesmas metodologias.

V RESULTADOS

V.1 Curvas de Crescimento

Curva Padrão

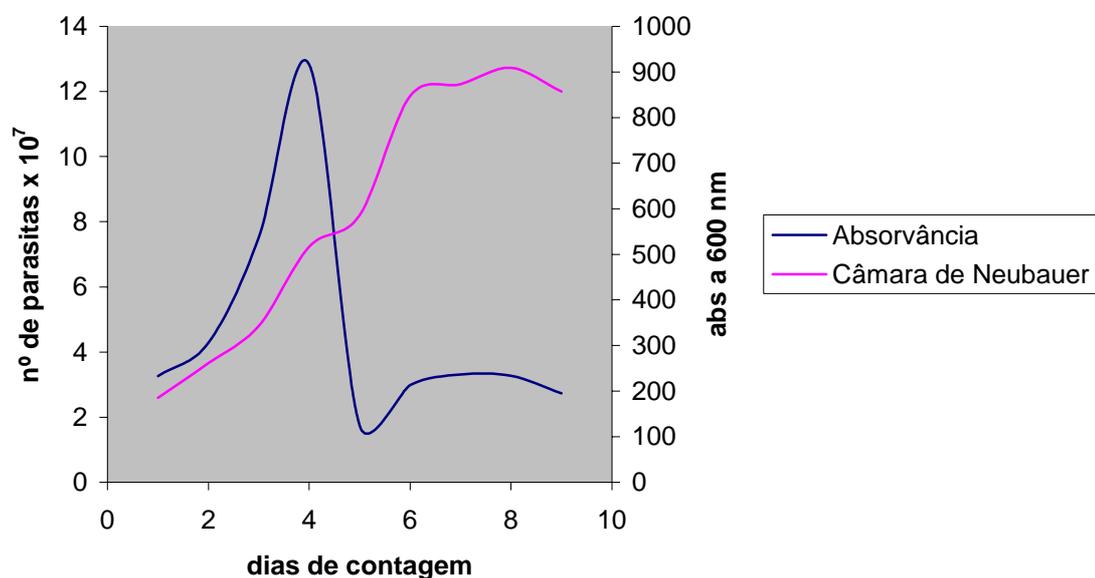
A tabela 1 mostra o crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8, durante nove dias (excluído o dia zero) demonstrado pela contagem em câmara de Neubauer e por Absorvância, representado pela média das 3 garrafas. No décimo dia de observação a cultura sofreu contaminação, tendo sido excluída do processo.

Tabela 1: Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8. Medida por contagem de parasitos em câmara de Neubauer por Absorvância.

Dias	Câmara de Neubauer (10 ⁶)	Absorvância (600nm)
1°	2,6	0,233
2°	3,7	0,306
3°	4,8	0,536
4°	7,3	0,916
5°	8,2	0,124
6°	11,8	0,213
7°	12,3	0,236
8°	1 2,7	0,234
9°	12,3	0,195

Os valores tabelados foram usados para a confecção do gráfico conforme demonstrado na tabela1. No caso não se levou em conta somente as formas viáveis do parasito, mas sim todas as formas (viáveis e não viáveis) contadas na câmara de Neubauer.

Gráfico I – Curva de crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8 demonstrado pelo número de parasitas, contados em câmara de Neubauer e por absorvância durante dez dias .



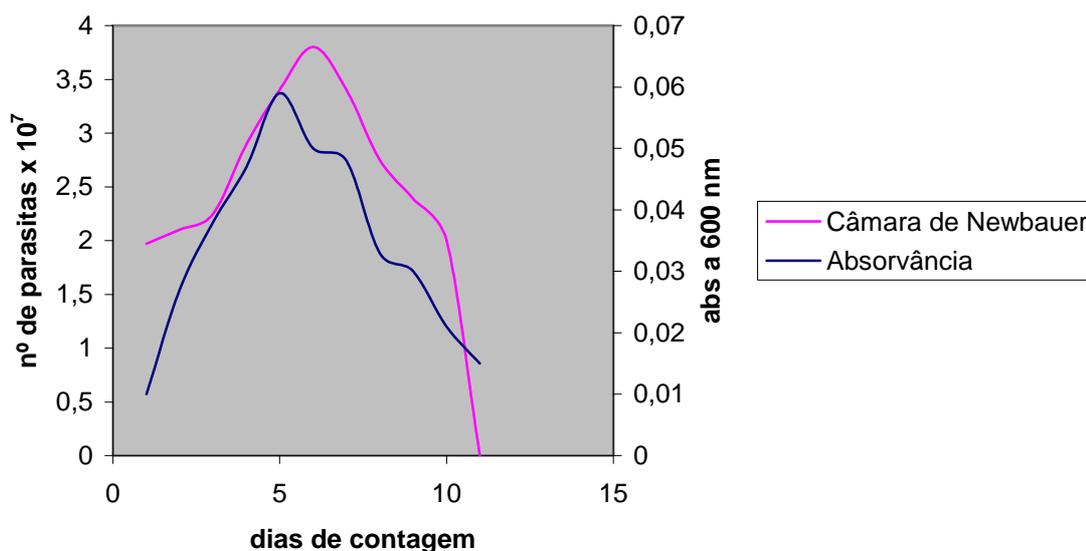
A tabela 2 e o gráfico II registram as concentrações de parasitos desde o momento após o repique, até o décimo dia, medida em Câmara de Neubauer, e encontradas por absorvância, a partir da diluição da cultura em azul de Tripán que preserva as formas íntegras das leishmanias

Considerando-se ambos os métodos, identificou-se que o crescimento máximo a partir do inóculo de 10^7 correspondeu aos 4º e 5º dias, respectivamente, sendo que a visualização dos parasitos íntegros em câmara de Neubauer de contagem decresceu a partir do 6º dia progressivamente (até negativar-se no 9º dia).

Tabela 2 : Crescimento de *Leishmania amazonensis* cepa PH8, demonstrado pela contagem de parasitos em câmara de Neubauer após diluição em azul de Tripán.

Dias de contagem	Contagem em Câmara de Neubauer ($\times 10^7$)	Medida de Absorvância
0	1,97	0,010
1°	2,10	0,027
2°	2,25	0,038
3°	2,90	0,047
4°	3,40	0,059
5°	3,80	0,050
6°	3,40	0,048
7°	2,75	0,033
8°	2,39	0,030
9°	2,00	0,021

Gráfico II - Curva de crescimento. *Leishmania amazonensis* cepa PH8 demonstrado pelo números de parasitos, contados em câmara de Neubauer e por absorvância, após diluição com azul de Tripán .



A curva de crescimento com a adição de azul de Tripán, um corante que permitiu apenas as formas parasitárias viáveis fossem contadas. A comparação entre os

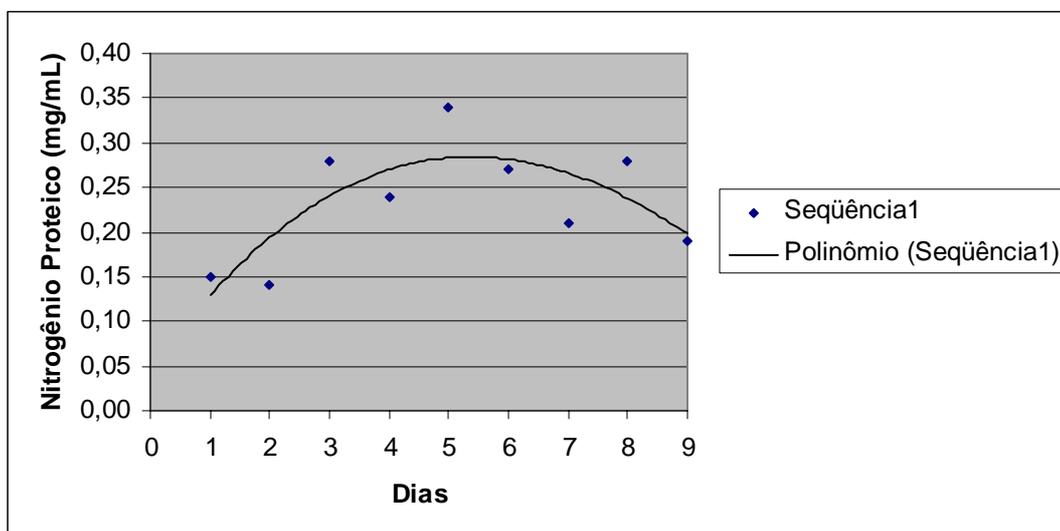
gráficos I e II mostra que as formas mortas presentes na suspensão parasitária e contadas na curva sem azul de Tripán podem influir na medida da densidade óptica das culturas. Na medida por absorvância, a contagem é maior que na contagem em câmara de Neubauer das leishmanias e indicou que o 4º dia de cultura correspondeu à fase de maior multiplicação do parasito.

A tabela 3 e o gráfico III mostram a concentração de nitrogênio protéico estimada pelo método de Kjeldahl durante nove dias de crescimento da cultura visando á determinação do ponto de maior concentração de antígeno.

Tabela 3: Dosagem do Nitrogênio Protéico pelo Método Kjeldahl correspondente aos nove dias de crescimento em cultura de *Leishmania amazonensis* cepa PH8.

Dias de contagem da curva	Dosagem de Nitrogênio protéico mg / mL
1	0,15
2	0,14
3	0,28
4	0,24
5	0,34
6	0,27
7	0,21
8	0,28
9	0,19

Gráfico III - Curva da concentração do nitrogênio protéico pelo Método Kjeldahl durante nove dias de crescimento em cultura de *Leishmania amazonensis* cepa PH8.



A tabela 3 e o gráfico III mostram, através da dosagem do nitrogênio protéico, que no 5º dia da cultura dos parasitos, estes se apresentaram em maior número tendo sido o ponto também onde foram obtidos os maiores valores para a dosagem de nitrogênio protéico. No entanto, foi o dia que antecedeu (vide tabelas 1 e 2 e graficos I e II) o aumento da mortalidade das culturas e menor viabilidade dos parasitas cultivados. Assim, considerando o desempenho das curvas de crescimento, definido pelos três diferentes métodos, associadamente `a necessidade de uma boa viabilidade das culturas para obtenção e produção dos antígenos protéicos, sem contaminantes provenientes da degradação parasitária e das proteínas no meio, optamos por trabalhar com o 4º dia de cultivo como padrão para os repiques de manutenção e produção de antígeno de Montengro.

V.2 Melhor inóculo destinado para produção.

Reprodutibilidade dos Experimentos

Após a seleção do melhor do melhor dia da curva de crescimento para a produção, determinou-se a padronização do inóculo em termos quantitativos para os repiques de produção de massa parasitária.

A tabela 4 relaciona os inóculos diferenciados, com seus quantitativos em câmara de Neubauer correspondentes às diferentes aferições determinadas pela dosagem de nitrogênio protéico e total, em dois experimentos realizados em épocas distintas.

Analisando a Tabela 4, não podemos observar uma correlação linear entre número de parasitos inoculados, crescimento observado em câmara de Neubauer, e as dosagens de nitrogênio protéico e total, nos dois experimentos. Em ambos, o número de parasitos foi similar, embora os resultados das dosagens de nitrogênio correspondente não tenham sido igualmente reprodutíveis.

Considerando a dosagem de nitrogênio protéico como mais diretamente representativa da quantidade de antígenos protéicos, admitimos que os melhores resultados foram os que aproximadamente se repetiram, correspondendo aos inóculos na faixa de 10^7 parasitos.

Tabela 4 – Comparação entre os experimentos para determinações de concentração de antígenos segundo inóculo, obtido no 4º dia de crescimento, através de contagem de parasitos em câmara de Neubauer e os métodos de nitrogênio protéico e total.

Experimentos	Inóculo	Câmara de Neubauer	Nitrogênio Protéico (µg/mL)	Nitrogênio Total (µg /mL)
I	10^5	$5,4 \times 10^5$	35	10
	10^6	$4,1 \times 10^6$	05	20
	10^7	$3,8 \times 10^7$	47,5	98
	10^8	$6,0 \times 10^8$	45,5	117
II	10^5	$3,2 \times 10^5$	24,7	395
	10^6	$3,9 \times 10^6$	23,1	500
	10^7	$4,4 \times 10^7$	43,1	605
	10^8	$5,9 \times 10^8$	35,2	47,9

Os gráficos 4 e 5, expressam a correspondência entre os resultados demonstrados na repetibilidade dos dois experimentos visando à determinação do melhor inóculo para a produção.

Gráfico IV – Distribuição de inóculos de parasitos em cultura e correspondentes determinações de nitrogênio protéico e total, segundo o experimento I.

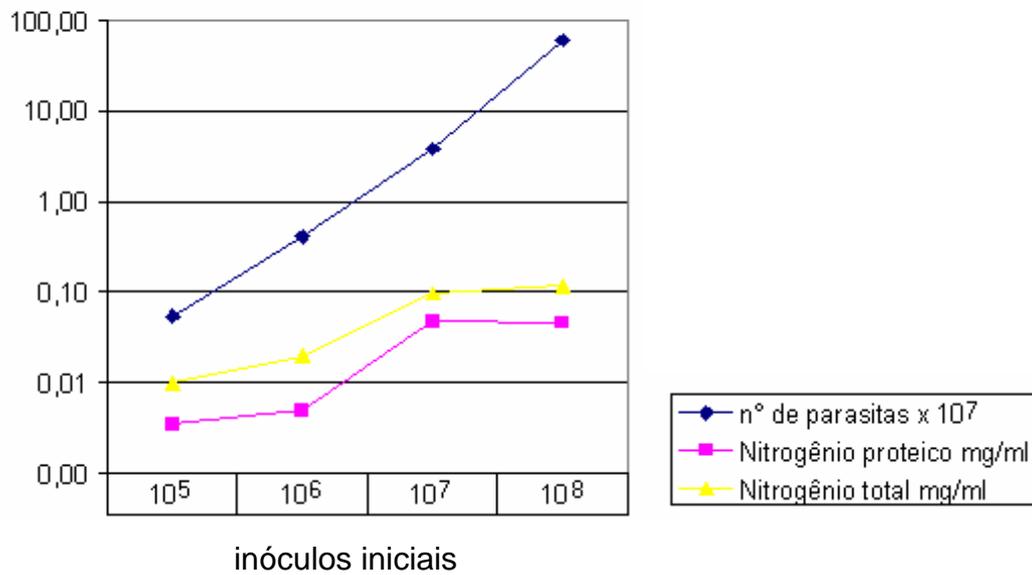
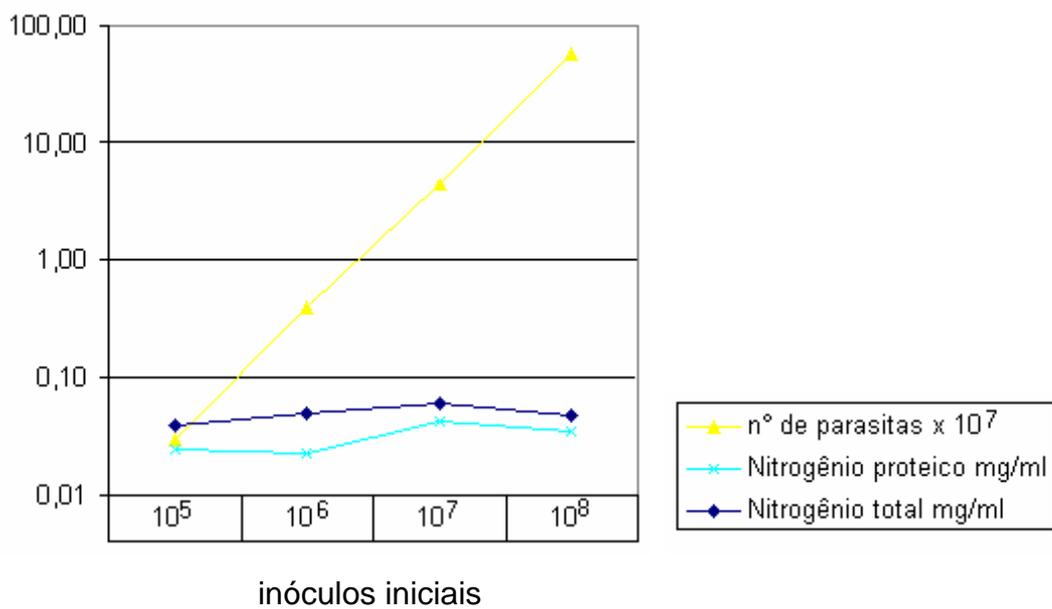


Gráfico V – Distribuição de inóculos de parasitos em cultura e correspondentes ás dosagens de nitrogênio protéico e total segundo o experimento II



Rendimento da produção a partir da padronização do inóculo

A tabela 5 mostra que a opção do 4º dia de crescimento parasitário para a ampliação do cultivo visando à produção e a adoção de inóculo padronizado para a obtenção de massa, trouxe melhoria significativa para o rendimento da produção. Analisando-se quatro lotes produzidos antes dessa padronização, entre junho e setembro de 2002, e outros quatro produzidos após, entre abril e novembro de 2003, observamos que o rendimento medido pelas quantidades de nitrogênio protéico e pelo número de frascos obtidos, para cada lote, foi expressivamente maior após a padronização. Representou, em média, uma elevação de rendimento de, respectivamente, 83,2% e 93,4% (tabela 5).

Tabela 5: Frascos de antígenos obtidos para intradermoreação de Montenegro e respectivas dosagens de nitrogênio protéico, antes e após a definição do inóculo padronizado correspondente a 10^7 parasitos/ml.

Período	Anterior a padronização inóculo 10^8 (6 a 9/ 2002)	Após a Padronização: inoculo - 10^7 (4 a 11/ 2003)	Elevação Rendimento
Lote do Produto (nº do lote)	027MN003Z 028MN007Z 029MN010Z 029MN011Z	034MN003Z 033MN004Z 03OMN005Z 03UMN006Z	
Nº de Frascos	774	2217	
Média Nº de Frascos/lote	258	499	93,4 %
Dosagem de Nitrogênio Protéico (mg %)	027MN003Z – (3,1) 028MN007Z – (2,89) 029MN010Z –(2,89) 029MN011Z –(2,26)	034MN003Z – (4,49) 033MN004Z –(5,72) 03OMN005Z –(3,75) 03UMN006Z –(6,47)	
Média Dosagem N ₂	2,79	5,11	83,2 %
Desvio Padrão	0,36	1,22	

V.3 Método Definido para Aferição da Concentração Antigênica.

Em paralelo à dosagem de nitrogênio protéico, foram testados métodos de dosagem de proteínas totais, com vistas a possível substituição do método de Kjeldahl para aferição da concentração antigênica. As massas parasitárias obtidas a partir dos experimentos I e II foram utilizadas para padronização dos experimentos de dosagens de proteínas totais pelo método do Biureto.

Visando à comparação dos dois métodos utilizados, os valores obtidos para a dosagem de nitrogênio protéico foram usados para cálculo de estimativa do teor de proteínas totais correspondentes. A Tabela 6 e o gráfico VI resumem os resultados obtidos, e os cálculos referentes aos mesmos são apresentados no anexo 2. Os experimentos foram realizados em triplicata, estando a tabela representando os valores médios dos 3 experimentos. Detectou-se uma maior sensibilidade do método de Biureto, tendo sido a quantidade de proteína detectada bem maior do que a estimada pela inferência a partir do método Kjeldahl.

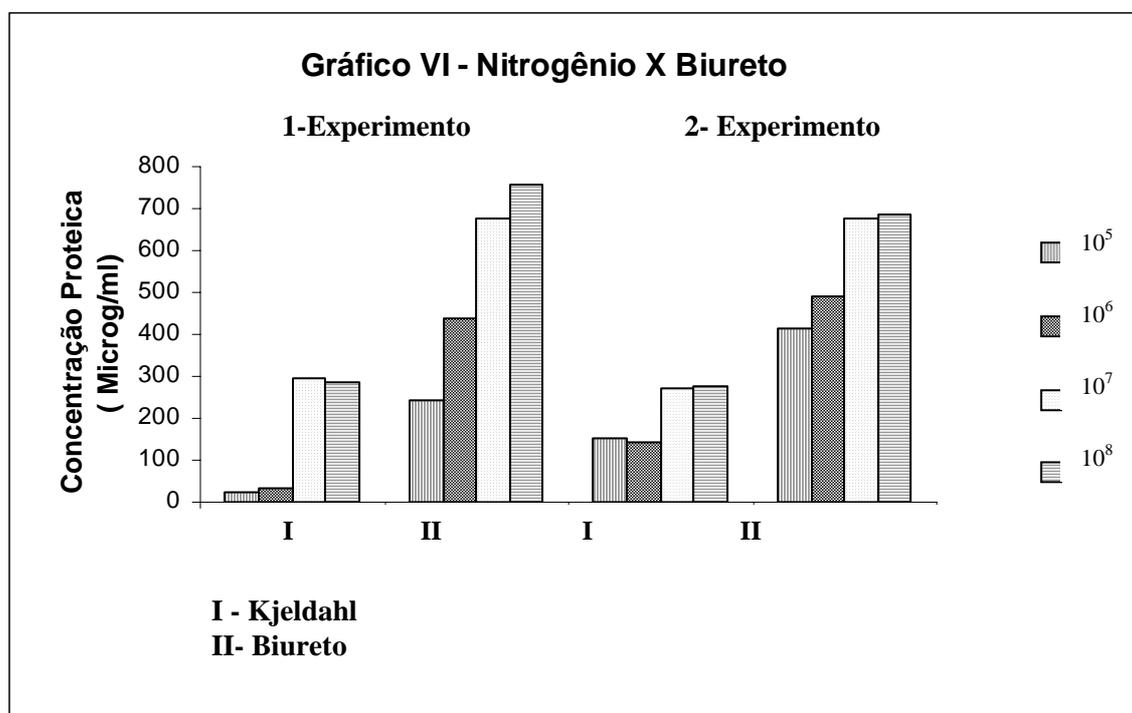
Tabela 6 : Comparação entre as dosagens do nitrogênio protéico e proteínas totais para definição do melhor método de quantificação antigênica.

Inóculos	EXPERIMENTO I			EXPERIMENTO II		
	Concentração N ² Protéico* ((µg/ml) Met.Kjeldahl)	Concentração de prtn estimada * (µg/mL)	Concentração de ptn de ptn Met. Biureto** (µg/mL)	Concentração N ² Protéico* (µg/mL) Met. Kjeldahl (µg/mL)	Concentração de prtn estimada * (µg/mL)	Concentração de prtn obtida ** Met. Kjeldahl (µg/mL)
10 ⁵	3,5	21,87	243,75	24,0	154,37	411,94
10 ⁶	5,0	31,25	436,30	23,1	144,37	489,13
10 ⁷	47,5	296,87	675,97	43,1	269,37	674,37
10 ⁸	45,5	284,37	755,60	35,2	220,00	687,47

* Os valores estimados são resultados do produto de concentração do nitrogênio protéico determinada pelo método de Kjeldahl X 6,25 (assumindo-se o valor médio de 16% do nitrogênio em proteínas)

** Valores obtidos pelo método do Biureto X Fator de correção 4,785 (19,5 x 1,25) considerando as diluições da amostra e da curva padrão.

Gráfico VI: Comparação entre as dosagens do nitrogênio protéico e proteínas totais para definição do melhor método de aferição antigênica.



Admitindo-se que o padrão do antígeno para intredermorreação de Montenegro é definido pela concentração de 40 microgramas de nitrogênio protéico / ml (Mello e col. 1977); que a dosagem pelo método de Kjeldahl apresentou discrepâncias na repetibilidade e que o método do Biureto apresentou maior consistência de resultados, considerou-se que este pode substituir com vantagens o método de Kjeldahl ,

Os cálculos referentes aos dados da tabela 6 e gráfico VI são apresentados no Anexo 2.

Para a correlação entre a estimativa da dosagem de proteínas pelos dois métodos utilizados, foi elaborada uma tabela de conversão, considerando os valores dos dois experimentos.

Os valores mostrados na tabela de conversão resultam da divisão da média de valores da dosagem de proteína pelo método do Biureto, que foram divididos pelos resultados obtidos de estimativa de proteína pelo método de Kejdalh , para cada inóculo inicial.

Tabela 7 – Fatores de conversão entre as concentrações protéicas determinadas pelo método Biureto e Kjeldahl (Cp Biureto e Cp Kjeldahl)

Inóculo	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
EXPERIMENTO I	-	-	2,28	2,66
Fator de Correção				
EXPERIMENTO II	2,66	3,39	2,507	3,12
Fator de Correção				

Cp – Concentração de proteínas

Eliminando-se os valores obtidos pelo método do Kjeldahl para os inóculos 10⁵ e 10⁶ do experimento I, que, conforme dito anteriormente parecem os mais inadequados, é possível calcular-se um fator médio de conversão entre as concentrações protéicas estimadas por ambos os métodos . Esse será da ordem de 2,52 (Cp Biureto e Cp Kjeldahl), se eliminarmos o fator de conversão de 3,39, o mais discrepante entre todos, ou de 2,66 se levarmos em conta o aludido fator discrepante (ver tabela 7). O valor de conversão a ser assumido de 2,52 mostra o desvio em relação a todos os fatores de conversão obtidos exceto o de 3,39 portanto correspondente a um erro relativo < 10 %.

Cálculo:

Experimento I

10⁵ * desprezado

10⁶ * desprezado

10⁷ -> 2,28

10⁸ -> 2,66

$$10^7 \rightarrow 675,97 \div 296,87 = 2,28$$

$$10^8 \rightarrow 755,60 \div 284,60 = 2,66$$

Experimento II

$$10^5 \rightarrow 411,94 \div 154,37 = 2,66$$

$$10^6 \rightarrow 489,13 \div 144,37 = 3,39$$

$$10^7 \rightarrow 674,37 \div 269,37 = 2,50$$

$$10^8 \rightarrow 687,47 \div 220,00 = 3,13$$

O fator 2,52 é resultado de média do experimento I + os experimentos II

V.4 Controles de Qualidade do Antígeno

V.4.1 Controles Microbiológicos

Exame Direto

O controle microbiológico do Antígeno, por exame direto, do material da cultura mantida em meio de Tioglicolato e no Fluido de Caseína de soja, realizado conforme a rotina estabelecida, Após dias de cultivo acompanhado de observações macroscópica e microscópica não foi identificado crescimento de microorganismo. O mesmo aconteceu nos 7º e 8º dias e depois no 14º dia de cultivo. Os laudos são apresentados no Anexo 3.

Presença de Endotoxinas

Não foi observada presença de endotoxinas, conforme laudo emitido pelo setor de Controle Microbiológico. O laudo é apresentado no Anexo 4.

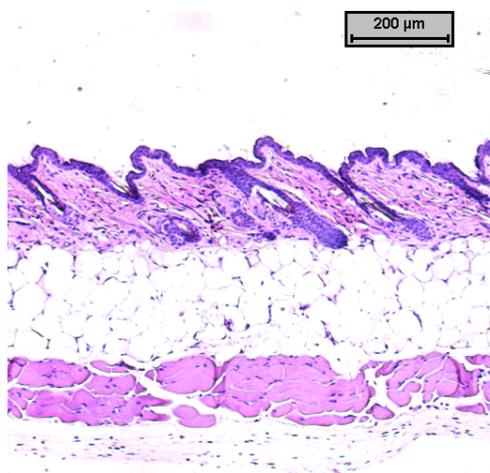
V.4.2 Teste de Pirogênio

Em relação, ao teste de pirogênio não se verificou que a soma da variação da temperatura dos coelhos não atingiu 0,6°C, estando dentro do limite para aprovação do teste, conforme laudo emitido no Anexo 5.

V.4.3 Teste de Inocuidade - Controle Histopatológico

Após o período de 14 dias de observação, em que não se observou nenhuma alteração no ponto de inoculação do antígeno, a histopatologia da pele, do fígado e baço também não apresentou alterações conforme laudo no Anexo 6. A figura 3 corresponde ao conjunto histopatológico da pele, referente ao teste de inocuidade em camundongos inoculados com antígeno padrão, camundongos inoculados com salina fenolada e não inoculados.

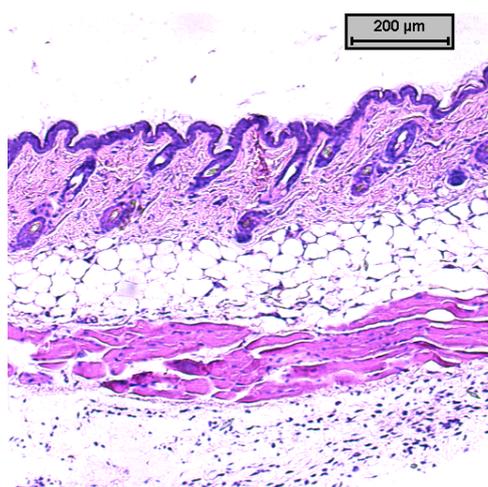
Figura 3 – Histopatologia de pele de camundongos inoculado com Antígeno Padrão (A), Salina fenolada (B), Não Inoculados (C), lote vencido (D) e lote de antígeno reprovado (E).



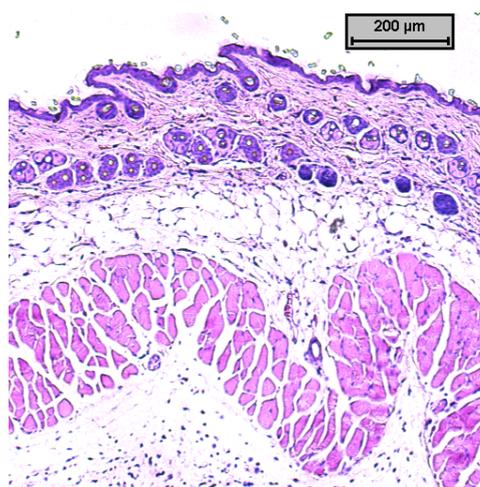
A (controle 118 03)



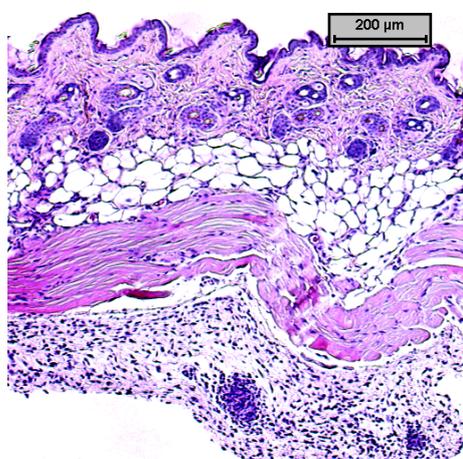
B (lote padrão 161 03)



C (salina fenolada 122 03)



D (Ag Vencido 121 03)



E (reprovado 53 02)

V.5 Definição do Prazo de Validade do teste para Intradermorreação de Montenegro

V.5.1 Controles Microbiológicos

V.5.1.1 Exame direto

O exame macro e microbiológico realizado pelo método de Gram nos lotes 013MN005Z e 021MN001Z após 20 meses, em estufa à 37°C, resultaram negativos, não se detectando crescimento de bactérias e/ou fungos, nas amostras e no controle, conforme atesta-se em laudo no Anexo 7.

V.5.1.2 Presença de Endotoxina

Em relação à presença de endotoxina em ambos os lotes testados o resultado foram satisfatórios conforme laudo no Anexo 8.

V.5.1.3. Teste de Pirogênio

Quanto ao teste de pirogênio em ambos os lotes analisados os coelhos apresentaram variação da temperatura de 0,5°C pelo período de 5 horas estando dentro do limite de aprovação do teste de acordo com laudo no Anexo 9.

VI DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica em 88 países do mundo, dentre os quais o Brasil, e apresenta diferentes desafios aos profissionais envolvidos em seu diagnóstico, tratamento e controle, principalmente levando – se em conta a multiplicidade de formas clínicas que apresenta, a relativamente baixa sensibilidade do diagnóstico etiológico de certeza, a multiplicidade de parasitas, vetores e reservatórios envolvidos em seu ciclo biológico, as dificuldades com a terapêutica e a falta de quaisquer medidas satisfatórias de prevenção (Marzochi & Marzochi 1994).

Quanto ao aspecto de diagnóstico, a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) vem sendo largamente utilizada desde o final da década de 1930, no Brasil e no mundo, como teste preliminar indicativo de leishmaniose tegumentar, sendo, ainda hoje, o exame complementar mais sensível e específico disponível para a Rede de Saúde de diversos países.

No Brasil, o teste é largamente utilizado em todas as regiões, admitindo-se a ampla distribuição da doença. Considerando a média anual de 35 mil casos notificados da doença/ ano, poderíamos estimar que, ao menos, um número equivalente de testes deveriam ser realizados anualmente no país. Isso sem considerar inquéritos de campo para avaliação da prevalência da infecção.

Contribuem para a ampla utilização da IDRM, além da sua alta sensibilidade e especificidade, a facilidade de aplicação, o baixo custo do teste e a não exigência de equipamentos para sua utilização, como requerem os testes sorológicos e mesmo os métodos de diagnóstico de certeza. Este fato, associado ao predomínio da LTA em áreas pobres do país, leva-nos à óbvia dedução de que, em muitas regiões, a IDRM é a única ferramenta disponível para o diagnóstico da LTA.

No entanto, devemos lembrar que estamos nos referindo a um teste realizado *in vivo*, ou seja, o paciente recebe em seu próprio organismo o antígeno de *Leishmania*, ao contrário de outros exames, realizados com amostras de soro e outros materiais coletados e enviados ao laboratório. Do ponto de vista da Vigilância Sanitária (VISA), portanto, a IDRM constitui-se em agente de risco. Logo, é pertinente que seja alvo de observação e controle pela VISA em todas as etapas de sua utilização: produção do insumo, aplicação e leitura da reação, notificação de efeitos adversos e resultados alcançados (eficácia e efetividade do teste).

No início da utilização da IDRM as normas para pesquisa clínica e laboratorial não estavam claramente estabelecidas quanto aos seus aspectos éticos, nem quanto a avaliação e qualidade do produto, que, no caso, há muitas décadas, caiu no mercado e foi “consagrada pelo uso”. No entanto, além das demandas regulamentares, sabemos que há falta de padronização na produção desse insumo. Consideramos então, de fundamental importância, investimentos que visem a aprimorar a IDRM e adequar sua produção e utilização às normas vigentes, com o fim de avaliar, monitorar e minimizar o risco ao paciente e maximizar a efetividade do teste.

Neste trabalho especificamente, procuramos investir na padronização do insumo necessário para a realização da IDRM, o antígeno de *Leishmania* (leishmania). A importância dessa padronização deve-se principalmente a dois pontos: 1) falta de uma cepa padrão para a produção de um teste diagnóstico utilizado por toda a rede do país, associada a uma multiplicidade de espécies de *Leishmania* envolvidas na LTA e seus diferentes ciclos epidemiológicos, com vistas à comparabilidade dos resultados da IDRM em diferentes áreas endêmicas,. 2) ao atendimento a normas técnicas de segurança e controle de qualidade, visando a minimizar o risco ao paciente que recebe o produto .

O antígeno de Montenegro é produzido através da sonicação de uma cultura de parasitas, o que leva a uma suspensão antigênica, contendo antígenos solúveis, semi-solúveis e particulados, de diferentes características moleculares. A padronização da composição dessa suspensão torna-se portanto, extremamente difícil, bem como a reprodutibilidade do seu processo produtivo. Para a melhoria dessa reprodutibilidade e a melhor homogeneidade dos lotes de antígeno produzidos, optamos por padronizar essencialmente a fase de crescimento parasitário utilizada no processo de produção, através da utilização de parasitas na mesma fase de cultivo, estabelecida pela curva de crescimento. Tratando-se de aprimoramento de produto para uso em escala comercial, escolhemos como o melhor dia para utilização dos parasitos para o antígeno aquele no qual as promastigotas estavam não somente em grande número, mas também com sua melhor viabilidade e presumidamente uma boa expressão de antígenos, que corresponderia ao final da fase logarítmica de crescimento e início da fase estacionária, o qual, em nossa curva correspondeu ao 4º dia de crescimento, como demonstramos por absorbância (tabela 2 e gráfico II). Excluímos a avaliação com base na contagem de parasitos em Câmara de Neubauer pelo valor subjetivo implicado nessa observação.

Além disso, procuramos, no aprimoramento do processo produtivo, utilizar mecanismos que possibilitassem a melhoria do rendimento da produção, de forma a aumentar o tamanho dos lotes, e, por conseqüência, reduzir custos. Para isso, buscamos investigar qual o melhor inoculo, a ser utilizado na produção da massa parasitária, que levaria ao maior lote possível, sem perda da qualidade da suspensão. Nossos resultados mostraram que essa abordagem fez sentido, já que, com a padronização do inóculo, o rendimento da produção, medido em número de frascos produzidos, aumentou significativamente. Além disso, o processo de padronização do inoculo não implicou em retardamento do tempo de produção do antígeno, nem novos investimentos.

A partir daí, a quantificação dos antígenos protéicos na suspensão de *leishmanias*, relacionadas ao inóculo da maneira mais precisa possível, torna-se de fundamental importância para a obtenção de um antígeno de qualidade. A concentração de antígenos protéicos para o antígeno de *Leishmania* foi estabelecida em 1977 e até hoje é considerada ideal. As metodologias de quantificação desses antígenos é que variaram ao longo do tempo, indo do método de nesslerização até o método de Kjeldahl, utilizado hoje em dia por Biomanguinhos. Considerando a baixa sensibilidade deste método e a existência de outros mais sensíveis, rápidos e adequados para a dosagem de proteínas, optamos por estabelecer o método do Biureto como o de escolha para a quantificação de antígenos protéicos em nosso extrato.

Assim, pudemos comparar os resultados obtidos com os mesmos inóculos iniciais e com a mesma metodologia (Kjeldahl) em dois tempos distintos, bem como com as duas metodologias testadas (Kjeldahl e Biureto) também em tempos diferentes.

Na primeira situação, observou-se que os valores obtidos para os experimentos I e II

(ver tabela 6 e anexo 2) com o método de Kjeldahl foram bastante discrepantes entre si (comparar 21,87 X 154,37; 31,25 X 144,37), mostrando a pouca reprodutibilidade do método e ausência de correlação entre o inóculo utilizado para a dosagem e a quantidade de proteína estimada. Em relação aos inóculos 10^7 e 10^8 os valores em geral obtidos foram melhores que os referentes aos inóculos mais diluídos, em ambos os experimentos, sendo que para os dois inóculos os desvios observados nesses experimentos, assumindo-se sempre o maior valor como 100%, foram menores que 9,4% (comparar 296,87 X 269,37 e 284,37 X 220,00).

No segundo caso, referente à comparação dos valores obtidos com os dois métodos utilizados, pôde-se observar que as concentrações protéicas estimados pelo

método do Biureto foram sempre superiores às aquelas estimadas pelo método de Kjeldahl, comparando-se os mesmos inóculos e dentro do mesmo experimento. Além disso, confrontando-se as dosagens de proteína pelo Biureto para os 4 inóculos nos experimentos I e II, vimos que os resultados foram de uma forma geral mais similares do que os decorrentes da dosagem de nitrogênio protéico, mostrando maior repetibilidade pelo método de Biureto.

Essas análises comparativas têm ainda mais sentido se considerarmos que as técnicas de tratamento das amostras dos antígenos, prévias às dosagens protéicas, foram idênticas incluindo até a precipitação com TCA.. E, se assim é o caso, como um dos métodos de dosagem de proteínas mostrou, aproximadamente, uma concentração protéica aproximadamente 2,5 vezes maior do que a outra? Deve-se lembrar que os métodos usados são baseados em propriedades diferentes, ou melhor, o método do Biureto prevê a ligação de Cu^{+2} em meio alcalino aos pares de elétrons disponíveis no nitrogênio das ligações peptídicas, enquanto o método de Kjeldahl dosa ou quantifica o nitrogênio de qualquer material como NH_4^+ , incluindo o nitrogênio protéico. Nesta situação, geralmente, assume-se o valor médio de 16 % de nitrogênio nas proteínas, daí o fator 6,25 que é utilizado para multiplicar os valores do nitrogênio protéico e assim fornecer a concentração protéica aproximada. Mesmo que se assuma que o TCA precipita todas, e somente, proteínas, os valores de correlação protéica podem estar errados se o teor médio de nitrogênio das proteínas não for igual a 16 %. Classicamente, o método do Biureto tem vantagens sobre o método de Kjeldahl e mesmo sobre outros métodos espectrofotométricos mais modernos (CBG-250, Folin-Lowry clássico e modificado, Bicinchonínico e outros) (Zaia *et al*,1998). Mesmo sendo, menos sensível dos métodos citados ele é mais preciso, fácil utilização e com conservante adequado pode ser armazenado indefinidamente.

Assim, cumpre-se sugerir que o método de Biureto seja doravante usado em substituição ao método de Kjeldahl. Se este for o caso, deve-se levar em conta que, para efeitos da amostragem futura, o valor da concentração de proteína estimada pelo Biureto deva ser dividido por 2,5 para alcançar-se o valor da concentração protéica estimada pelo nitrogênio protéico, levando-se em conta o fator 6,25 (16% de nitrogênio de proteínas). Além disso, antes da produção em larga escala e distribuição de antígeno à rede de saúde com base na dosagem de proteínas, os métodos de Kjeldahl e Biureto deverão ser avaliados por outros laboratórios, para validação dos resultados obtidos neste trabalho, ainda em fase pré-clínica.

A partir do insumo tecnicamente padronizado, segue-se a etapa dos controles de qualidade necessários à sua utilização como produto, mais uma vez levando-se em conta as características particulares como antígeno veiculado e sua forma de uso.

Na rotina já estabelecida em Bio-Mamguinhos, são realizados o controle microbiológico a partir do exame direto, e o teste de inocuidade em animais experimentais, a partir do exame histopatológico de fragmentos de pele e vísceras de animais inoculados com o antígeno produzido. Como complemento desses controles, objetivamos avaliar a introdução dos testes para detecção de endotoxinas e pirogênios.

As endotoxinas são estruturas encontradas na parede celular de bactérias Gram – negativas, as quais podem causar problemas de saúde a quem as recebe, incluindo a elevação da temperatura corporal, mesmo na ausência do microrganismo vivo. É de suma importância a investigação de sua presença em injetáveis, considerando que quantidades muitíssimo pequenas dessas substâncias são suficientes para o desencadeamento de manifestações clínicas. Para a dosagem de endotoxinas, optamos pelo método de LAL, por ser o utilizado no controle da vacina da Febre amarela, em diversos diluentes e água para injetáveis.

Não encontramos na literatura relatos de dosagem de endotoxinas nos antígenos de Montenegro produzidos, portanto, não poderíamos definir, *a priori*, os níveis máximos aceitáveis para esse produto. Logo, optamos por trabalhar dentro dos limites estabelecidos para o controle de vacinas e diluentes. Não foi observada a presença de endotoxinas em nenhuma das amostras examinadas, em todos os experimentos, de acordo com a sensibilidade e limites de detecção do teste utilizado, o que sugere que o insumo foi produzido em condições apropriadas de esterilidade, aumentando a segurança daquele que o recebe. Novamente, tratando-se de uma abordagem recém introduzida, a interpretação dos resultados dos testes de endotoxina deverá ser cuidadosamente avaliada. Por outro lado devemos destacar que, de forma positiva, a introdução do mesmo no controle de qualidade da produção do antígeno, não trouxe aumento do tempo de produção dos lotes estudados.

Em relação ao pirogênio, trata-se de um importante teste que determina os limites aceitáveis de riscos para reações febris em pacientes que recebem produtos injetáveis. Este teste também é recomendado no controle de qualidade de vacinas, diluentes e água para injetáveis. Novamente, não encontramos registros anteriormente publicados de dosagem de pirogênios em antígenos de Montenegro produzidos. Em nosso trabalho, não foram encontrados níveis de pirogênios em quantidade que elevasse

a temperatura corporal a mais de 0.6°C dos coelhos examinados como determina o critério de normalidade do teste. Sendo assim, todos os antígenos testados foram considerados livres de pirogênios. Mais uma vez, ressaltamos a necessidade da continuidade da repetição e avaliação contínua desses resultados e destacamos que a inclusão deste teste também não trouxe acréscimo significativo ao tempo de produção do insumo.

Quanto ao teste de inocuidade *in vivo* (prova de segurança) é utilizado na rotina como teste padrão para a aprovação de um lote de antígeno de Montenegro, sendo semelhante ao teste de toxicidade inespecífica utilizado no controle da vacina contra Sarampo. No protocolo de nosso estudo, esse teste foi seguido de avaliação histopatológica não só do local de inoculação do produto, mas também de diferentes vísceras (fígado e baço) para detecção de possível toxicidade sistêmica. Nenhum camundongo apresentou qualquer alteração local ou sistêmica que determinasse a reprovação do lote do produto, de acordo com os critérios considerados (citados na Metodologia) nem comprometesse a saúde e a viabilidade dos animais inoculados. Dessa forma, acreditamos que esse teste é importante para auxiliar a detecção da presença de contaminantes e/ou substâncias indesejáveis as quais poderiam desencadear manifestações clínicas adversas, num modelo mais sensível do que os testes *in vitro*. Em nosso experimento, avaliamos também, de forma comparativa, um grupo controle de camundongos não inculados e um grupo inoculado com o preservante do antígeno diluído em salina fisiológica, para identificarmos possíveis reações adversas decorrentes da presença do fenol na composição do insumo. Consideramos que esses novos grupos controle, cujo número de animais deverá ser determinado pelo setor que realiza o teste, obedecendo às condições determinadas pela Comissão de Ética Animal (CEUA) da FIOCRUZ e a definição de amostragem, devam ser absorvidos á rotina de controle de qualidade do antígeno de Montenegro.

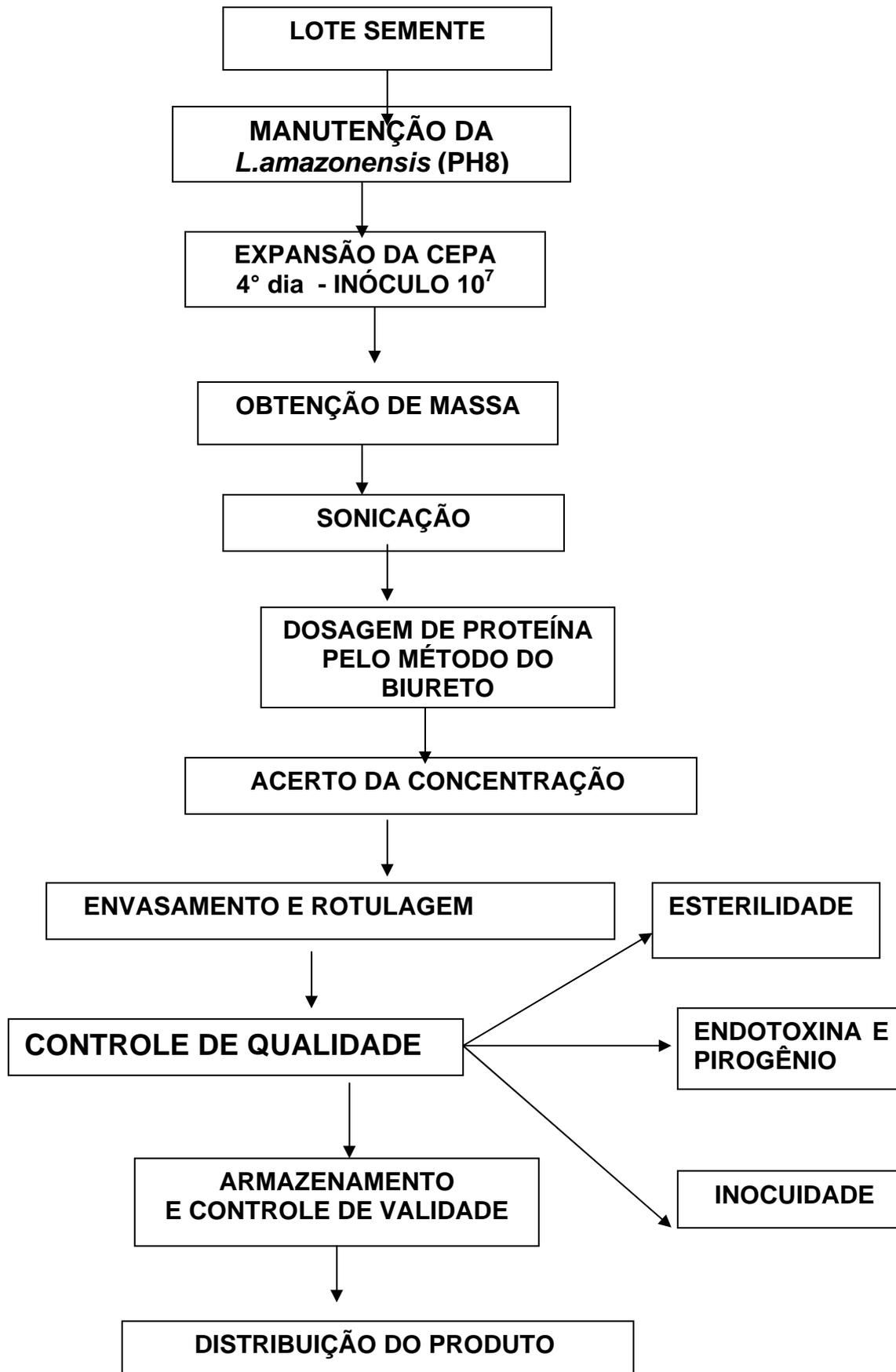
Por fim, iniciamos estudos preliminares para determinar, com o maior grau de precisão possível, o prazo de validade desse tipo de produto. Para isso, deixamos alguns lotes já produzidos, estocados a 37 °C e por tempo superior ao prazo de validade (20 meses) pré – estabelecido, submetendo-os aos mesmos testes realizados no antígeno padrão que definimos. Os resultados obtidos foram basicamente idênticos aos observados nos antígenos recentemente produzidos e nos controles, mostrando que, sob esse aspecto, e estocado em condições mais extremas que as utilizadas rotineiramente, o produto não sofreu contaminação e/ou alteração significativa capaz de comprometer a

sua segurança. Um estudo clínico a seguir é devidamente necessário para completa definição do melhor prazo de validade do novo produto.

Consideramos que essas abordagens, em seu conjunto, conforme proposto, e complementadas por estudos posteriores controlados de potência do antígeno, devem contribuir para a necessária oferta de um teste clássico e universal para o diagnóstico das leishmanioses, porém devidamente padronizado e com controle de qualidade como insumo e produto final, simples e acessível, e com provável redução de custo.

O fluxograma a seguir (figura 4) ilustra como poderá se desenvolver o processo de produção da leishmania em área biolimpa, controlada, utilizando-se Boas Práticas de Laboratório(BPL) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) com a inclusão dos novos controles físico-químicos e de qualidade padronizados.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA PADRONIZADO PROPOSTO



VII CONCLUSÕES

1-O inóculo para a produção de massa parasitária deverão ser de 10^7 parasitas/mililitro de meio de cultura para a produção do maior número possível de frascos por lote de produto.

2-Os repiques de expansão da cepa para a produção de massa parasitária deverão ser realizados com promastigotas no 4º dia de crescimento *in vitro* em meio de cultura Schneider mais soro fetal bovino.

3 -O rendimento da produção aumentará de forma significativa com a adoção do inóculo e dia de cultivo padronizados, sem aumento de custos e de tempo de produção do Antígeno.

4- O método de dosagem de proteínas pelo Biureto mostrou-se mais adequado que o método atualmente em uso para dosagem de nitrogênio protéico (método de Kjeldahl), sendo sugeridos mais estudos para que o referido método do Biureto seja utilizado na rotina padrão de produção dos antígenos da *leishmania*.

5 -Novos métodos de controle microbiológico e ampliação dos testes de inocuidade *in vivo* devem ser incluídos na rotina da produção do insumo para maior garantia de qualidade.

6 -São necessários estudos complementares paralelos para a determinação dos prazos máximos de validade do novo produto em diferentes condições de estocagem, bem como estudos controlados de potência do antígeno pré-clínicos e clínicos.

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO, S.C. Martin, S.J, Vélez B. I.D.; Sanchis M.M.C.; LouassiniM.; Maldonado, J.; Morillas, M.F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). **Int J Parasitol**, v. 26, p. 303-310, 1996.

BADARÓ, R. Pedral, S.D.; Johnson, W.D.; Reed, S.G. Evolution of the stability of a soluble interdermal skin test antigen preparation in American visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, p. 226-7, 1990.

BARBOSA, G.M. Marzochi, M.C., Massard, C.L., Lima G. P., Confort, E.M. Epidemiological Aspects of Canine American Tegumentari Leishmaniasis in the Municipality of Paraty State of Rio de Janeiro – Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, p. 641-6, 1999.

BARBOSA, W.; Sousa, M.C.M.; Rassi, D.M.; Oliveria, R.L.; Mota, L. Investigação sobre epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana I – Intradermorreação de Montenegro *concomitante com antígenos de Leptomonas pessoai e L.brasiliensis*. **Rev Pat Trp**, p. 377 –383, 1972.

BARRET, T.V.; Senra, M.S. Leishmaniasis in in Manaus Brasil. **Parasitology Today**, p. 255-257, 1989.

BRASIL. Portaria nº8 de 23 de janeiro de 1996. Dispõe sobre o registro de produtos para diagnóstico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil** Seção I. Disponível em: <http://www.anvisa.gov>. Acesso em: 12 de junho de 2004.

BRASIL. Portaria nº 686 /MS/SVS, 27 de Agosto de 1998. Instituir e implementar as Boas Práticas de Fabricação para estabelecimento que fabriquem ou comercializam produtos para diagnóstico, de forma garantir a qualidade do processo de produção e o controle de fatores de riscos para saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. 28 de Agosto de 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov>. Acesso em: 14 de junho de 2004.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº59, de junho de 2000 . Instituir e implementar requisito de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimento que fabriquem ou comercializam produtos médicos, art.11, inciso IV, do Regulamento da ANVS aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov>. Acesso em: 12 de junho de 2004.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº210, de 4 de agosto de 2000. Instituir e implementar requisito de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimento que fabriquem Medicamentos. Aprovado pelo decreto nº3029, de 16 de abril de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov>. Acesso em: 12 de junho de 2004.

CAMUS, D.; Zalis, M.G.; Vannier-Santos, M.A.; Banic, D.M. The art of parasites survival Braz. **J Med Biol Res**, v. 28, p. 399-413, 1995.

CHANG, K.P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in Leishmaniasis. **Int Rev Cytol Suppl**, v. 14, p. 267-305, 1983.

COOPRE, J.F. Resolving Lal Test Interferences. **J. Parent. Sci & Tech**, v. 44, p.1, 1990.

CORREIA, C.A. Intradermoreação de Montenegro na Tuberculose. **Arq. Hig. Saúde Pública**, p. 61-63, 1941a.

CORRÊA, M.A.; Amato Neto, V. Intradermoreações com antígeno de culturas de *Leishmania brasiliensis* submetidas à ação do ultra-som: resultados obtidos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 1958.

COUTINHO, S.G.; Marzochi, M.C.; Souza, W.J.S.; Amendoeira, M.R.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **JBM**, v. 41, n. 4, p. 104 –118, 1958.

CUBA, C.H.; Marsden, P.D.; Barreto, A.G.; Rocha. R.; Sampaio, R.R.; Patzlaff, L. Parasitologic and Immunologic diagnosis of America cutâneois leishmaniasis. **Bol oficina Sanit Panam**, v. 89, p. 195-208, 1980.

ECHNANDI, C.A. Estudos sobre la sensibilidade cutânea en la leishmaniosis tegumentar en Costa Rica. **Rev Biol Trop**, v. 1, p. 173-195, 1953.

FAGUNDES, A.; Marzochi, K.B.F.; Marzochi, M.C.A. Reação Cutânea tardia (12 a 16 dias) ao teste intradérmico de Montenegro em voluntários normais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 585, 1996.

FAGUNDES, A.; Marzochi, K.B.F.; Marzochi, M.C.A. Resposta Cutânea ao Antígeno de Montenegro com Diferentes Veículos em. Área Indene para Leishmaniose Tegumentar. **Anais da V Jornada Científica da FIOCRUZ**, p. 28, 1998.

FAGUNDES, A.; Marzochi, K.B.F.; Marzochi, M.C.A.; Schubach, A.; Perez, M.; Schubach, T.; Ferreira, A.G.; Silva J.P. Immune response to Montenegro skin test antigen with different preservatives in a non endemic area for tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 196, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição p.5.1- 5.3

FUNASA. **Situação da Prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil**. Ministério da Saúde, Brasília, p. 27-29, 2002.

GARRIDO, R.B. Leishmanias y Leshmaniasis Tegumentaria Em America Latina. **Bol Of Sanit Panam**, v. 95, n. 5, p. 418-426, 1983.

GUERRA, M.O.P.; Furtado, T.; Barros, G.C.; Sssa, P.A.; Daher, Vr. Infecção subclínica na leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol**, v. 60, p. 365-369, 1985

IMPERATO JP, Diakite S. Leishmaniasis inthe Republic of Mali Trans **R Soc Trop Méd Hyg**, v. 63, p. 236-241, 1969.

IMPERATO, P.J.; Fofana, B. Positive leishmnin skin sensitivity in the absence of clinical leishmaniasis. **J.Trop Med Hyg**, v. 76, p. 132 – 134, 1973.

IMPERATO, P.J.; Fofana, B.; Sow, O.; Dioallo, S. Leishmanim Skin sensitivity in the inland delta of Niger. **Trop Geogr Med**, v. 26, p. 303 – 306, 1974.

LAINSON, R.; Shaw, J.J. Leishmaniasis of the new world taxonomic problems. **British Medical Bull**, v. 28, p. 44-48, 1972.

Minimum Requirements for Biological Products Association of Biologicals Manufacturers of Japan 1986 Technical Report series n°872/1998

MARZOCHI, M.C.; Coutinho, S.G.; Sabrosa, P.C.; Souza, W.J. Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American Cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro) . Comparative study results observed in 1974 and 1978 . Rev. **Inst.Med Trop São Paulo**, v. 22, p. 149 –155, 1980.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **JBM**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M.C.A.; Marzochi, K.F.B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil emerging antropozoonosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Públ**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M.C.A.; Marzochi, K.B.F. Leishmaniose em áreas urbanas. **Rev Bras Med Trop** v. 30, n. 1, p. 162 – 164, 1997.

MELO, M.N.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Dias, M.; Williams, P.; Araújo, F.G.; Coelho, M.V.; Batista, S.M. Padronização do Antígeno de Montenegro. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 19, p. 161-164, 1977.

MAYRINK, W.; Williams, P.; Costa, C.A.; Magalhães, P.A.; Dias, M.; Coelho, M.V.; Araújo, F.G.; Williams, P.; Figueiredo, Y.P.; Batista, S.M. [Montenegro's Intradermal test in American cutaneous leishmaniasis after antimonial treatment]. **Rev Inst Méd Trop São Paulo**, v. 18, p. 182-185, 1976.

MONTENEGRO, J. A cutis reação na leishmaniose. **Ann Fac Med Univ SP**, v. 1, p. 323-330, 1926.

MUNIZ, J.; Medina, H. Leishmaniose Tegumentar do cobaio.(1) (*Leishmania enriette* n.sp.) n.2. **Hospital**, v. 33, p. 7 –25, 1948.

OTTO, B. **Bacteriologia e Imunologia**, 23º edição. São Paulo, 1984.

OLIVEIRA NETO, M.P.; Piremez, C.; Rangel, E.; Schubach, A.; Grimaldi Junior, G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a peribuan area of Rio de Janeiro city, Brazil : clinical and epidemiological studies .**Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 427 – 435, 1988.

PELLEGRINO, J. Nota preliminar sobre a de reação intradérmica feita com a fração polissacarídica isolada de formas de cultura *Leishmania braziliensis* em casos de leishmaniose tegumentar americana. **Hospital**, v. 39, p. 859-863, 1951.

PESSOA, S.B.; Lopes, J.A.S. Sobre a intradermorreação de Montenegro em região endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral . **Revst Inst Med Trop SP**, v. 5, p. 170 –175, 1963.

PESSOA, S.B. Dados sobre a epidemiologia da leishmaniose tegumentar em São Paulo. **Arq. Hig. Saúde Pública**, v. 6, p. 103-121, 1941a.

PIRMEZ, C.; Coutinho, S.G.; Marzochi, M.C.; Nunes, M.P.; Grimaldi, G.Jr. Canine American cutaneous : a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro. **Brazil. Am J Trop Med Hyg**, v. 38, p. 52-8, 1941a.

RABELLO, F.E.; Portugal, H., Serra, O. 1945. Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, alergia específica, estrutura histológica e número de gérmenes, p37 -71 **I Reunião de DERMATO-SIFILIOGRAFOS BRASILEIROS. s.l.**, Rio de Janeiro.

RESTREPO, ISAZA M. The Montenegro test in the epidemiology of South American leishmaniasis. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 89, p. 130-138, 1980.

ROTERBEG, A. Contribuição para o estudo da alergia na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev.Hosp.N.S. Aparecida**, v. 5, p. 1 –88, 1952.

SACK, D.L. Metacylogenesis in Leishmania promastigotes. **Exp Parasitol**, v. 69, p. 100-103, 1989.

SALLES GOMES, L. A intra-dermo-reacção de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. **Brasil-Medico**, p. 1079-1087, 1939.

SILVA, A.F. 1999. **Avaliação do Teste Intradérmico de Montenegro em Populações Militares do Brasil ; Positividade e Resposta Inespecífica**. Tese de Mestrado Rio de Janeiro, 1999 FIOCRUZ, CPGBP, XV, 105 p.

SILVEIRA, F.T.; Lainsson, R.; Shaw, J.J.; Ribeiro, R.S.M. Leishmaniose Cutanea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de Infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmanias: Leishmania Braziliensis e Leishmania Mexicana Amazonensis. **Rev Inst Med Trop**, v. 26, n. 5, p. 272-275, 1984.

SHAW, J.A. Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471- 478, 1994.

SHAW, J.J.; Lainson, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observation of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering, from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 69, p. 323-335, 1975.

SHAW, J.J.; Lainson, R. Letter: An Immediate intradermal reaction to leishmanial antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 68, p. 168 – 169, 1974.

SANTOS, E.G.; Marzochi, M.C.; Conceição, N.F.; Brito, C.M.; Pacheco, R. S. Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test

canine areas of humana Americam in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**,40,41-47, 1998.

WHO Expert Commitee on Biological Standardization, nº 329, ano 1966

ZAIA,D.M., Z AIA, C.T., LICHTIG, J. Determinações de Proteínas Totais Via Espectrofometria: Vantagens e Devantagens . **Química Nova**, 21 (6) 787- 793,1998

ANEXO 1- Preparo da técnica Azul de Tripán

Preparo da solução Azul de Tripán

0.1 g de azul de Tripán

50 mL de salina 0,9% estéril

Procedimento

Fazem-se diluições seriadas de 1:10; 1:100; 1:1000;

ex: 0,9 mL de azul tripán + 0,1mL de cultura de leishmania.

Monta-se a câmara de Neubauer.

Adiciona-se aproximadamente 100µL da diluição 1:100.

Conta-se cada quadrante.

Somam-se os quadrantes e dividi-se por 4;

ex: 200: 4 = 50 x 10² x 10⁴ = 5 X 10⁷

ANEXO 2- Cálculos de Experimentos

Cálculos referentes a tabela 6

Cálculos dos Experimentos

Curva Padrão

2.1 Método de Kjeldhal (Quantificação de nitrogênio protéico) : **Teste executado em Out/2003**

Inóculos	Kjeldahl
10^5	$0,0035 \text{ mg/mL} \times 6,25 = 0,021875 = 21,87 \mu\text{g/ ml}$
10^6	$0,005 \text{ mg/mL} \times 6,25 = 0,03125 = 31,25 \mu\text{g/ml}$
10^7	$0,0475 \text{ mg/mL} \times 6,25 = 0,26987 = 296,87 \mu\text{g/ml}$
10^8	$0,0455 \text{ mg/ml} \times 6,25 = 0,24837 = 284,37 \mu\text{g /mL}$

2.2 Metodo de Biureto (Quantificação de proteínas) : **Teste executado em Outubro/2003**

Inoculo	Biureto	x	Cálculo $(\frac{19,5 \times 1,25}{5}) = 4,875$
10^5	0,049		$0,2389 \text{ mg/ ml} = 238,9 \mu\text{g/ml}$
	0,059		$0,2876 \text{ mg/mL} = 287,6 \mu\text{g/ml}$
	0,051		$0,2486 \text{ mg/mL} = 248,6 \mu\text{g/ml}$
10^6	0,096		$0,4680 \text{ mg/ ml} = 468,0 \mu\text{g/ml}$
	0,089		$0,4339 \text{ mg/ ml} = 433,9 \mu\text{g/ml}$
	0,090		$0,4387 \text{ mg/ ml} = 438,7 \mu\text{g/ml}$
10^7	0,138		$0,6727 \text{ mg/ ml} = 672,7 \mu\text{g/ml}$

	0,139	0,6776 mg/ ml = 677,6 µg/ml
	0,139	0,6776 mg/ ml = 677,6 µg/ml
10 ⁸	0,163	0,7976 mg/ ml = 797,6 µg/ml
	0,155	0,7556 mg/ ml = 755,6 µg/ml
	0,155	0,7556 mg/ ml = 755,6 µg/ml

2.3 Método de Kjeldahl (Quantificação de nitrogênio protéico): **Teste executado em Jan/2004**

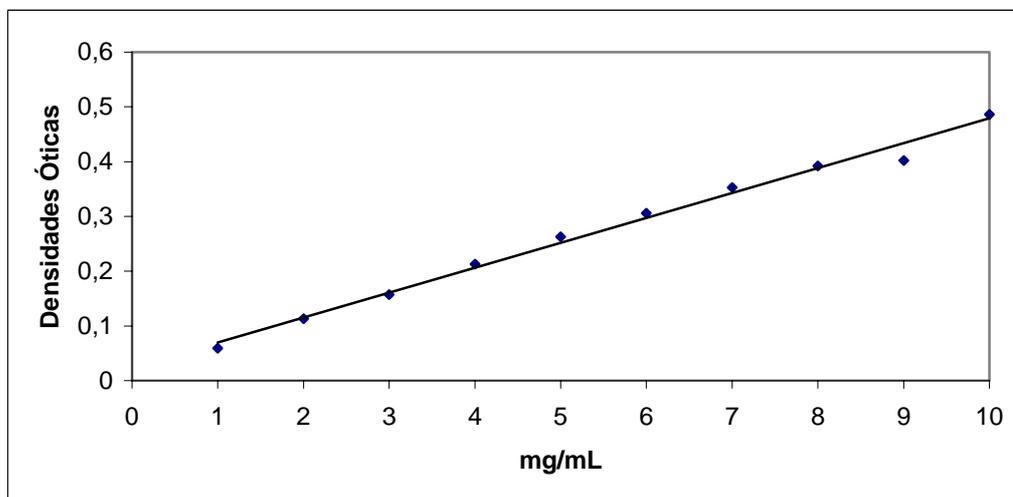
Inóculos	Kjeldahl
10 ⁵	0,0247 mg/mL x 6,25 = 0,15437 = 154,37µg/ ml
10 ⁶	0,0231 mg/mL x 6,25 = 0,14437 = 144,37 µg/ml
10 ⁷	0,0431 mg/mL x 6,25 = 0,26937 = 269,37 µg/ml
10 ⁸	0,0352 mg/ mL x 6,25 = 0,22 = 220 µg/ ml

2. 4 Método de Biureto (Quantificação de proteínas) : **Teste executado em Janeiro/2004**

Inoculo	Biureto	x	Cálculo $(\frac{19.5 \times 1,25}{5}) = 4.875$
10 ⁵	0,085		0,4144 mg/ ml = 414,4µg/ml
	0,084		0,4095 mg/mL = 409,5 µg/ml
	0,081		0,3949mg/mL = 394 ,9 µg/ml
10 ⁶	0,101		0,4924 mg/ ml = 492,4 µg/ml
	0,099		0,4826 mg/ ml = 482,6 µg/ml

	0,101	0,4924 mg/ ml = 492,4 μ g/ml
10 ⁷	0,141	0,6874 mg/ ml = 687,4 μ g/ml
	0,136	0,6630 mg/ ml = 663,0 μ g/ml
	0,138	0,6727 mg/ ml = 672,7 μ g/ml
10 ⁸	0,141	0,6874 mg/ ml = 687,4 μ g/ml
	0,142	0,6925 mg/ ml = 692,5 μ g/ml
	0,140	0,6825 mg/ ml = 682,5 μ g/ml

2.5 Curva Padrão com BSA



ANEXO 3- Controles Microbiológico Laudo dos Testes de Esterilidade(Exame Direto)do lote de Antígeno de Montenegro e Salinas dentro do prazo de validade.



Folha ___ / ___

**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO
TESTE DE ESTERILIDADE**

Produto: Antígeno de Leishmania para a Reação de Montenegro

Lote nº : 03UMN006Z

Nº dose por frasco : ...x....

Data de entrada : 16/12/2003

Protocolo : 015714006

Data do Teste : 19/12/2003

Data do 1º Repique :

Data do 2º Repique : --/--/--

Método : **DIRETO**

Nº de amostras : 03

Volume por frasco : 1ml

MEIOS UTILIZADOS

FLUÍDO DE TIOGLICOLATO/LOTE Nº :030/03
(30 - 35°C)

FLUÍDO DE CASEINA DE SOJA/LOTE Nº : 058/03
(20 - 25°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x....

ml Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5

ml Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5 ml

RESULTADOS

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Placa de controle ambiental/lote nº: ACasoy 056/03

Resultado: Satisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Resultado: (X) Satisfatório () Insatisfatório

Final do teste: 02/01/2004

CONCLUSÃO FINAL: (X) APROVADO () REPROVADO

Observação: ...x....

Analista: Beatriz; Cátia;

Data: 02/01/2004

Chefe de Controle Microbiológico:

Suely Soares Duarte
Suely Soares Duarte
FioCruz / Mar. 8103-6
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos

Revisão
04

**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO**

TESTE DE ESTERILIDADE

Produto: Salina Fenolada 0,4%

Lote nº : 03OSF005Z

Data de entrada : 26/11/2003

Data do Teste : 27/11/2003

Método : **DIRETO**

Nº de amostras : 01

Nº dose por frasco : ...x....

Protocolo : 015305005

Data do 1º Repique :

Data do 2º Repique : --/--/----

Volume por frasco : 5mL

MEIOS UTILIZADOS

FLUÍDO DE TIOGLICOLATO/LOTE Nº :028/03
(30 - 35°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x....

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 2,5

FLUÍDO DE CASEINA DE SOJA/LOTE Nº : 055/03
(20 - 25°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

ml Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

ml Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 2,5 ml

RESULTADOS

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Placa de controle ambiental/lote nº: ACasoy 053/03

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Final do teste: 11/12/2003

CONCLUSÃO FINAL: (X) **APROVADO** () **REPROVADO**

Observação: ...x....

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

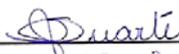
Resultado: Satisfatório

Resultado: (X) Satisfatório () Insatisfatório

Analista: Marta;Rodrigo;

Data: 11/12/2003

Chefe de Controle Microbiológico:


Suelly Soares Duarte
Fisiciz / Mat. 6103-6
Laboratório de Bio-Manguinho

Revisão
04

**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO**

TESTE DE ESTERILIDADE

Produto: Salina Fisiológica 0,9%

Lote nº : 03OSF005Z

Nº dose por frasco : ...x....

Data de entrada : 26/11/2003

Protocolo : 015304005

Data do Teste : 27/11/2003

Data do 1º Repique :

Data do 2º Repique : --/------

Método : **DIRETO**

Nº de amostras : 01

Volume por frasco : 5mL

MEIOS UTILIZADOS

FLUÍDO DE TIOGLICOLATO/LOTE Nº :028/03
(30 - 35°C)

FLUÍDO DE CASEINA DE SOJA/LOTE Nº : 055/03
(20 - 25°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x....

ml Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 2,5

ml Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 2,5 ml

RESULTADOS

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Placa de controle ambiental/lote nº:ACasoy 053/03

Resultado:Satisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Resultado: (X) Satisfatório () Insatisfatório

Final do teste: 11/12/2003

CONCLUSÃO FINAL: (X) **APROVADO** () **REPROVADO**

Observação: ...x....

Analista: Marta,Rodrigo;

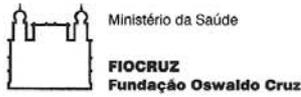
Data:11/12/2003

Chefe de Controle Microbiológico:


Mady Soares Duarte
Flocruz / Mat. 6103-6
Manguinhos, Rio de Janeiro

Revisão
04

ANEXO 4 - Controle Microbiológico - Laudo de Presença de Endotoxinas do Lote de Antígeno de Montenegro Dentro do Prazo de Validade



Folha ____ / ____

**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO**

TESTE DE ENDOTOXINA

Produto: Suspensão antigênica de Leishmania

Lote nº: 03UMN006Z N° dose por frasco: 10

Data de entrada: 27/07/2004 Protocolo: 11

Data do teste: 29/07/2004

Método: LAL - gel clot

N° de amostras: 02

Diluição da Amostra:

1:2	1:4	1:8	1:10		Controle positivo	Controle negativo
-	-	-	-	/	+	-
-	-	-	-	/	+	-
-	-	-	-	/	+	-

Especificação: Lactose (< 6 ± 50% UE / ml)
VZA / VFA / VFB (< 5.0 UE / dose)
VMB (< 100 UE / µg PS)
PSA / PSC (< 20 UE / µg PS)
Diluyente / WFI (Máximo 0,25 UE / ml)
Diluyente Salina (< 0,25 UE / ml)

Endotoxina : Lote: Ex 23232 Val.: 12/2005

LAL: Sensib.: 0,125 UE/ml Lote: T1991L Val.: 01/2007

Cálculo: 2 x 0,125 = 0,25 UE/ml

Resultado: < 0,25 UE/ml

CONCLUSÃO FINAL: () **APROVADO** () **REPROVADO**

Observação: 11

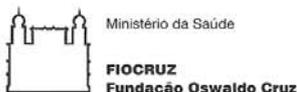
Analista: Ricardo / Helena Data: 29/07/2004

Chefe do Controle Microbiológico: Duarte

Suely Soares Duarte
FIOCRUZ

Revisão
05

ANEXO 5 – Controle Microbiológico - Laudo do Teste de Pirogênio do Antígeno de Montenegro dentro do Prazo de Validade



DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE SETOR DE CONTROLE BIOLÓGICO

TESTE DE PIROGÊNIO

Produto: Antígeno de Listeria para reação de Montenegro
 Lote: 03UMN006Z Registro: 281
 Data da entrada: 28/07/04 Data do ensaio: 04/08/04
 Amostragem: 13 ml Teste: [] [2]
 Via de inoculação: Endovenosa Peso do coelho: 1500 g a 3000g

COELHO Nº.	80	81	82	RESULTADOS:		
SEXO	♂	♂	♂	FARMACOPÉIA EUROPÉIA		
PESO (g) DIA - 3	1870	1670	1712	Nº DE COELHOS	SATISFATÓRIO	NÃO SATISFATÓRIO
DIA 0	1917	1670	1732	03	≤ 1,1° C	≥ 2,6° C
TEMPERATURA MÉDIA	39.2	39.8	39.2	06	≤ 2,8° C	≥ 4,3° C
VOLUME INJETADO (ml)	1.9	1.7	1.7	09	≤ 4,4° C	≥ 5,9° C
T0 + 30'	39.2	39.9	39.2	12	≤ 6,6° C	> 6,6° C
T0 + 60'	39.2	40.1	39.2	CRITÉRIOS: a) Satisfatório – se no 1º teste nenhum dos 3 coelhos apresentar temperatura individual ≥ 0,6°C e o somatório da variação individual de temperatura dos mesmos estiver no limite estabelecido na 2ª coluna. b) Repetir o teste – se o somatório da temperatura individual dos coelhos na 1ª coluna estiver entre a 2ª e a 3ª, e se algum coelho apresentar temperatura ≥ 0,6°C no 1º teste. c) Não satisfatório – Se o somatório da temperatura individual dos coelhos na 1ª coluna, for ≥ a temperatura da 3ª coluna e se mais que 3 dos coelhos usados no total dos testes apresentar temperatura individual ≥ 0,6°C.		
T0 + 90'	39.1	40.2	39.3			
T0 + 120'	39.1	40.1	39.2			
T0 + 150'	39.1	40.0	39.3			
T0 + 180'	39.0	39.8	39.3			
VARIÇÃO INDIVIDUAL DE TEMPERATURA	0.0	0.4	0.1			
SOMA DAS VARIÇÕES DE TEMPERATURA	0.5 °C					

T0 = Temperatura inicial

CONCLUSÃO FINAL: () APROVADO () REPROVADO

Observação: — x —

Operador: Yone, Fábio e Jovianista

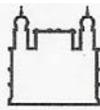
Data: 06/08/04

Chefe do Controle Biológico: Pedro J. S. Correia

Tpiroge2

PEDRO JORGE DE O. CORREIA
Controle Biológico
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Mat. 01872-1

ANEXO 6 – Controle Histopatológico –Laudos dos Testes de Inocuidade Lote de Antígeno de Montenegro e Salinas Dentro do Prazo de Validade.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico n°: 12/2004

Entrada em: 28/01/04

Saída em: 09/02/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Fragmentos de Fígado/Baço/Pele

Hipótese diagnóstica: Camundongos inoculados com Ag. de Montenegro Teste Lote 03UMN006Z (15/01/04)

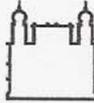
Pesquisador: Janaína

Macroscopia: Não foram observadas alterações dignas de registro

Microscopia: Tecidos examinados morfológicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados sem alterações histológicas dignas de registro


Renato Sérgio Marchevsky
SETOR DE CONTROLE DE NEUROVIRULÊNCIA
BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ
MATRÍCULA SIAPE 462616



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico nº: 80/2004

Entrada em: 22/6/04

Saída em: 10/7/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

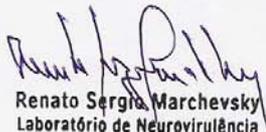
Hipótese diagnóstica: Camundongos controles (Teste de 26/5/04)

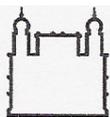
Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões;

Microscopia: Órgãos examinados morfológicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados sem alterações histológicas.


Renato Sérgio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico nº: 37/2004

Entrada em: 16/3/04

Saída em: 4/4/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

Hipótese diagnóstica: Cinco camundongos inoculados com salina fisiológica

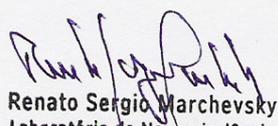
Lote 030SF005Z

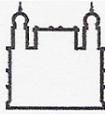
Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões

Microscopia: Órgãos examinados microscopicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados sem alterações histológicas.


Renato Sergio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico n°: 36/2004

Entrada em: 16/3/04

Saída em: 4/4/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

Hipótese diagnóstica: Cinco camundongos inoculados com salina fenolada

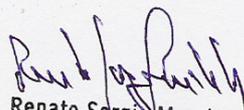
Lote 030SFe005Z

Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões

Microscopia: Órgãos examinados microscopicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados sem alterações histológicas.


Renato Sergio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616

ANEXO 7 - Laudos do Exame Direto dos Lotes de Antígeno de Montenegro com Prazo de Validade Vencida



Folha ___ / ___

**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO
TESTE DE ESTERILIDADE**

Produto: Antígeno de Leishmania para a Reação de Montenegro

Lote nº : 013MN005Z (37°C)

Nº dose por frasco : ...x....

Data de entrada : 14/11/2003

Protocolo : 015043005

Data do Teste : 17/11/2003

Data do 1º Repique :

Data do 2º Repique : --/--/----

Método : **DIRETO**

Nº de amostras : 03

Volume por frasco : 1mL

MEIOS UTILIZADOS

FLUÍDO DE TIOGLICOLATO/LOTE Nº :028/03
(30 - 35°C)

FLUÍDO DE CASEINA DE SOJA/LOTE Nº : 055/03
(20 - 25°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

Nº tubos: ...x.... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5 ml

RESULTADOS

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Placa de controle ambiental/lote nº: ACasoy 048/03

Resultado: Satisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Final do teste: 01/12/2003

CONCLUSÃO FINAL: (X) APROVADO () REPROVADO

Observação: ...x....

Analista: Beatriz,Cátia;

Data:01/12/2003

.....Chefe de Controle Microbiológico:

Beatriz
Beatriz Soares
Ficruz / MZ 6103-6
Microbiologia / Bio-Manguinhos

Revisão
04

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
LABORATÓRIO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO
TESTE DE ESTERILIDADE

Produto: Antígeno de Leishmania para a Reação de Montenegro

Lote nº : 021MN001Z (37°C)

Nº dose por frasco : ..x...

Data de entrada : 14/11/2003

Protocolo : 015042001

Data do Teste : 17/11/2003

Data do 1º Repique :

Data do 2º Repique : -/-/-

Método : **DIRETO**

Nº de amostras : 03

Volume por frasco : 1mL

MEIOS UTILIZADOS

FLUÍDO DE TIOGLICOLATO/LOTE Nº : 028/03
(30 - 35°C)

FLUÍDO DE CASEINA DE SOJA/LOTE Nº : 055/03
(20 - 25°C)

Repique: 1º# ...x....

Repique: 2º# ...x....

Repique: 1º# ...x.....

Repique: 2º#x.....

Nº tubos: ...x... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x.... ml

Nº tubos: ...x..... /15ml vol. Inoc./tubo: ...x..... ml

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5

Nº tubos: 01 /100 ml vol. Inoc./tubo: 1,5 ml

RESULTADOS

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Primeiro controle: (3º,4º,5º dia) (-) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Segundo controle: (7º,8º dia) (-) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Terceiro controle: (14º dia) (-)

Placa de controle ambiental/lote nº: ACasoy 048/03

Resultado: Satisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Resultado : (X) Satisfatório () Insatisfatório

Final do teste: 01/12/2003

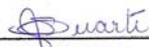
CONCLUSÃO FINAL: (X) **APROVADO** () **REPROVADO**

Observação:x....

Analista: Beatriz;Cátia;

Data: 01/12/2003

Chefe de Controle Microbiológico:


Suely Soares Duarte
Física / Mat. 6103-6
Microbiologia / Bio-Manguinhos

Revisão
04

ANEXO 8 – Resultado do Teste de Endotoxinas dos Lotes de Antigenos de Montenegro Com Prazo de Validade Vencida

Janaina Pinho Passos

De: Wilma D'Elia
Enviado em: quinta-feira, 15 de janeiro de 2004 16:31
Para: Janaina Pinho Passos
Assunto: Resultados LAL

Boa tarde, esses são os resultados dos Antígenos de Leishmania :

Lote 021MN001Z : < 0,125 UE/mL

Lote 013MN005Z : < 0,125 UE/mL

Qualquer dúvida contacte-nos.
Atenciosamente
Wilma, Helena, Ricardo.

ANEXO 9- Laudos do Teste de Pirogênio dos lotes Antígenos de Montenegro com Prazo Validade Vencida.



**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
SETOR DE CONTROLE BIOLÓGICO**

TESTE DE PIROGÊNIO

Produto: Antígeno de Leishmania p/leod de Montenegro
 Lote: 013MN0054 Registro: 020
 Data da entrada: 06/02/2004 Data do ensaio: 16/02/2004
 Amostragem: 10ml Teste: [] [] [2]
 Via de inoculação: Endovenosa Peso do coelho: 1500 g a 3000g

COELHO N°	25	26	27	RESULTADOS:		
SEXO	♂	♀	♂	FARMACOPÉIA EUROPÉIA		
PESO (g) DIA - 4	1.660	1.802	1.595	N° DE COELHOS	SATISFA-TÓRIO	NÃO SATISFATÓRIO
DIA 0	1.736	1.965	1.763	03	≤ 1,1° C	≥ 2,6° C
TEMPERATURA MÉDIA	39.2	39.4	39.3	06	≤ 2,8° C	≥ 4,3° C
VOLUME INJETADO (ml)	1,7	2,0	1,8	09	≤ 4,4° C	≥ 5,9° C
T0 + 30'	39.1	39.2	39.3	12	≤ 6,6° C	> 6,6° C
T0 + 60'	39.2	39.2	39.4	CRITÉRIOS: a) Satisfatório – se nenhum dos 3 primeiros coelhos apresentar temperatura > 0,6° C e o somatório da Temperatura dos coelhos da 1ª coluna estiver no limite estabelecido na 2ª coluna. b) Repetir o teste – se o somatório da temperatura dos coelhos na 1ª coluna estiver entre a 2ª e 3ª Coluna. c) Não satisfatório – Se na repetição do teste, mais de 3 coelhos do mesmo grupo apresentar temperatura > que 0,6° C e se o somatório da Temperatura dos coelhos na 1ª coluna for > que a Temperatura da 3ª coluna.		
T0 + 90'	39.1	39.1	39.5			
T0 + 120'	39.1	39.2	39.5			
T0 + 150'	39.0	39.2	39.5			
T0 + 180'	39.0	39.3	39.6			
VARIÇÃO INDIVIDUAL DE TEMPERATURA	0.0	0.0	0.3			
SOMA DAS VARIÇÕES DE TEMPERATURA	0.3 °C					

T0 = Temperatura inicial

CONCLUSÃO FINAL: (X) APROVADO () REPROVADO

Observação: _____ x _____

Operador: Yone de Kar e Rosemaria Data: 16/02/2004

Chefe do Controle Biológico: P. Yone

PEDRO JORGE DE O. CORREA
 Controle Biológico
 Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
 Mat. 01872-1

Tpiroge2



**DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE
 SETOR DE CONTROLE BIOLÓGICO**

TESTE DE PIROGÊNIO

Produto: Antígeno de Leishmania p/ração de Montenegro
 Lote: 021MN00170 Registro: 021
 Data da entrada: 06/02/2004 Data do ensaio: 16/02/2004
 Amostragem: 10ml Teste: [] [2]
 Via de inoculação: Endovenosa Peso do coelho: 1500 g a 3000g

COELHO Nº.	22	23	24	RESULTADOS:		
SEXO	♂	♂	♂	FARMACOPÉIA EUROPÉIA		
PESO (g) DIA - 4	1700	1648	1652	Nº DE COELHOS	SATISFA-TÓRIO	NÃO SATISFATÓRIO
DIA 0	1803	1863	1812	03	≤ 1,1° C	≥ 2,6° C
TEMPERATURA MÉDIA	38.6	39.2	39.2	06	≤ 2,8° C	≥ 4,3° C
VOLUME INJETADO (ml)	1,8	1,9	1,8	09	≤ 4,4° C	≥ 5,9° C
T0 + 30'	38.8	39.0	39.2	12	≤ 6,6° C	> 6,6° C
T0 + 60'	38.5	39.0	39.2	CRITÉRIOS: a) Satisfatório – se nenhum dos 3 primeiros coelhos apresentar temperatura > 0,6° C e o somatório da Temperatura dos coelhos da 1ª coluna estiver no limite estabelecido na 2ª coluna. b) Repetir o teste – se o somatório da temperatura dos coelhos na 1ª coluna estiver entre a 2ª e 3ª Coluna. c) Não satisfatório – Se na repetição do teste, mais de 3 coelhos do mesmo grupo apresentar temperatura > que 0,6° C e se o somatório da Temperatura dos coelhos na 1ª coluna for > que a Temperatura da 3ª coluna.		
T0 + 90'	38.6	39.1	39.3			
T0 + 120'	38.7	39.1	39.4			
T0 + 150'	38.6	39.1	39.4			
T0 + 180'	38.7	39.1	39.4			
VARIÇÃO INDIVIDUAL DE TEMPERATURA	0.2	0.0	0.2			
SOMA DAS VARIÇÕES DE TEMPERATURA	0.4 °C					

T0 = Temperatura inicial

CONCLUSÃO FINAL: () APROVADO () REPROVADO

Observação: _____

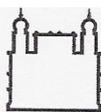
Operador: Yone & Erika e Joznaide Data: 16/02/2004

Chefe do Controle Biológico: 12/ Yoneky

PEDRO JORGE DE B. CORREA
 Controle Biológico
 Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
 Mat. 01872-1

Tpiroge2

ANEXO 10 - Laudos do Controle Histopatológico dos Lotes de Antígeno de Montenegro com Prazo de Validade Vencida.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico nº: 39/2004

Entrada em: 16/3/04

Saída em: 4/4/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

Hipótese diagnóstica: Cinco camundongos inoculados com Ag. de Montenegro
Lote 021MN001Z

Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões

Microscopia: Órgãos examinados microscopicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados com morfologia normal.

Renato Sergio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico nº: 38/2004

Entrada em: 16/3/04

Saída em: 4/4/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

Hipótese diagnóstica: Cinco camundongos inoculados com Ag. de Montenegro

Lote 013MN005Z

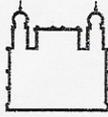
Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões

Microscopia: Órgãos examinados microscopicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados com morfologia normal.

Renato Sérgio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

LABORATÓRIO DE NEUROVIRULÊNCIA-LANEU

Exame Anátomo-patológico nº: 34/2004

Entrada em: 16/3/04

Saída em: 4/4/04

Espécie: *Mus musculus* Suiços

Sexo: Fêmeas

Procedência: DRD

Natureza do material: Pele/Baço/Fígado

Hipótese diagnóstica: Camundongos controles (Teste de 2/3/04)

Pesquisador: Janaína Pinho

Macroscopia: Ausência de lesões

Microscopia: Órgãos examinados morfológicamente normais

Diagnóstico: Órgãos examinados sem alterações histológicas.

Renato Sérgio Marchevsky
Laboratório de Neurovirulência
Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
Matrícula SIAPE 462616