

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE
DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À
VIGILÂNCIA SANITÁRIA

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Márcia Miyuki Hashimoto

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO KIT DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO DE DUPLO PERCURSO
DE BIO-MANGUINHOS**

Rio de Janeiro

2014

Márcia Miyuki Hashimoto

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DO KIT DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO DE DUPLO PERCURSO
DE BIO-MANGUINHOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Produtos, Ambiente e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Hashimoto, Márcia Miyuki

Estudo de estabilidade do kit de leishmaniose visceral canina de ensaio imunocromatográfico de duplo percurso de Bio-Manguinhos / Márcia Miyuki Hashimoto. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

36 f, il,

Monografia (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária). Programa de Controle de Qualidade de Produtos, Ambiente e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2014.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Técnicas Imunocromatográficas. 3. Kit de Reagentes para Diagnóstico. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Márcia Miyuki Hashimoto

ESTUDO DE ESTABILIDADE DO KIT DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA DE
ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO DE DUPLO PERCURSO
DE BIO-MANGUINHOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Produtos, Ambiente e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em- 16/06/2014

BANCA EXAMINADORA

Lucia Maria Corrêa Werneck (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

Wildeberg Cál Moreira (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

Adenauer Cruz Teixeira (Mestre)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof. Maria Aparecida Affonso Boller pela atenção, compreensão e paciência.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS /FIOCRUZ.

Aos meus chefes Darcy Akemi Hokama e Luiz Alberto Pereira pelo apoio e compreensão.

Ao amigo Adenauer Cruz Teixeira pela paciência, atenção e pelos importantes conhecimentos transmitidos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao amigo Francis Carazzai Reisdörfer, pela amizade e ajuda na finalização deste trabalho.

À equipe do LACORE, pelo apoio, carinho, amizade e cooperação nos momentos em que fiquei ausente.

Ao meu filho Rodrigo Kenzo pela paciência, carinho e compreensão.

À minha mãe Anna Yurico Hashimoto e minha irmã Helena Yumi Okada, pelo carinho, apoio e incentivo recebidos.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina representa um importante problema em saúde pública no Brasil. É uma zoonose de transmissão vetorial onde o cão doméstico é a principal fonte de infecção e normalmente o aparecimento dos casos humanos é precedido pelos casos caninos. Com a necessidade de melhoria e diminuir o custo no diagnóstico de LVC, foi introduzido pelo Ministério da Saúde, para este fim, o TR DPP LVC como teste de triagem e EIE como confirmatório. Avaliou-se neste estudo o desempenho do kit de TR DPP LVC produzida por Bio-Manguinhos, através do estudo de estabilidade de longa duração nas temperaturas de 2 a 8 °C e 30 °C durante o prazo de validade do kit de 24 meses e estendeu-se por mais 6 meses, completando 30 meses de estudo nas temperaturas preconizadas. Foram utilizados três lotes nos quais foram avaliados o desempenho do kit (suporte e tampão de corrida) com amostras positiva e negativa. Realizou-se também a avaliação do controle microbiológico e do pH do tampão de corrida de cada tempo de análise de cada lote. Nos lotes analisados até a data de validade e até o 30° mês de análise, a linha teste das amostras positivas se tornaram visíveis no sétimo minuto e a linha controle se tornou visível no sexto minuto. Na avaliação do tampão de corrida quanto ao controle microbiano, foram ausentes em todos os tempos de todos os lotes. Na dosagem do pH dos tampões de corrida, foram observados valores abaixo do especificado em alguns tempos nos lotes avaliados, no entanto estas variações não interferiram no desempenho dos testes. Portanto, até o prazo de validade do kit (24 meses) e até o trigésimo mês de análise os três lotes analisados apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Leishmaniose, TR DPP LVC, Estudo de estabilidade de longa duração

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is major public health problem in Brazil. It is a vector-borne zoonosis where the domestic dog is the main source of infection and usually the appearance of human cases is preceded by canine cases. With the need to reduce the cost and improve the diagnosis of CVL, was introduced by the Ministry of Health for this purpose, the DPP TR LVC as a screening test and confirmatory EIE. In this study we evaluated the performance of the DPP TR LVC kit produced by Bio-Manguinhos through the long-term stability study at temperatures of 2 to 8 °C and 30 °C during the kit validity period of 24 months and extended for more 6 months, completing 30 months of study at the temperatures recommended. Three batches where we evaluated the performance of the kit (support and running buffer) with positive and negative samples were used. Was also conducted to evaluate the microbiological control of pH and the running time of each analysis of each batch buffer. In batches analyzed until the expiration date and until the 30th month of the test, the test line of the positive samples became visible in the seventh minute and the control line was visible in the sixth minute. In running buffer evaluating the on the microbial control, were absent in all the times of all batches. The measurement of running buffers' pH was observed values below of the specified in some time in batches reviews, however these changes did not affect the performance of the tests. Therefore, until the expiration date of the kit (24 months) and until the thirtieth month analysis of the three batches analyzed showed satisfactory results.

Key-words: Leishmaniasis, TR DPP Canine visceral leishmaniasis, Long-term stability study

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Forma amastigota da Leishmania.....	11
Figura. 2: Forma promastigota da Leishmania.....	11
Figura 3: Flebótomo da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> no momento da sucção do sangue humano.....	12
Figura 4. Ciclo Biológico da Leishmania.....	15
Figura 5: Foto do suporte do TR DPP LVC.....	17
Figura 6: Procedimento do TR DPP LVC.....	18
Figura 7: Resultado reagente.....	18
Figura 8: Resultado não reagente.....	18
Figura 9: Resultado inválido	18

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição dos kits e prazo de validade dos componentes.....	22
Quadro 2. Data de fabricação, datas de validade e datas de liberação pelo Controle da qualidade (CQ) dos lotes utilizados no EELD.....	22
Quadro 3. Matriz do estudo de estabilidade.....	23
Quadro 4. Especificação do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos 20 determinações.....	23
Quadro 5. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) - 124TV002Z.....	24
Quadro 6. Estudo de estabilidade de longa duração (30 °C) - 124TV002Z.....	25
Quadro 7. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) - 125TV005Z.....	26
Quadro 8. Estudo de estabilidade de longa duração (30 °C) - 125TV005Z.....	27
Quadro 9. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) - 128TV012Z.....	28
Quadro 10. Estudo de estabilidade de longa duração (30 °C) - 128TV012Z.....	29

LISTA DE SIGLAS

CVL	Canine Visceral Leishmaniosis
DPP	Plataforma de Duplo Percurso
EIE	Ensaio Imunoenzimático
EELD	Estudo de estabilidade de longa duração
LACORE	Laboratório de Controle de Qualidade de Reativos
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
TR	Teste Rápido
SECPI	Seção de Controle de Processos Produtos Intermediários
SECPF	Seção de Controle de Produto Final
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	AGENTE ETIOLÓGICO	11
1.2	VETOR	12
1.3	RESERVATÓRIOS	13
1.4	MODO DE TRANSMISSÃO.....	13
1.5	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	15
1.5.1	Imunocromatografia de duplo percurso (DPP)	16
1.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	19
1.7	JUSTIFICATIVA.....	20
2	OBJETIVO GERAL.....	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	TR DPP LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	22
3.1.1	Especificações	23
4	RESULTADOS.....	24
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO 1.....	36

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma zoonose de transmissão vetorial de grande importância na Saúde Pública, pois os casos humanos têm precedido dos casos caninos e está entre as doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2010). É uma doença sistêmica grave que acomete órgãos como medula óssea, baço, fígado, linfonodos e pele. (BERN *et al.*, 2008; BRASIL, 2006).

Esta zoonose, que possui um amplo espectro epidemiológico com distribuição mundial, foi descrita inicialmente em 1835 na Grécia e posteriormente em 1882 na Índia. Nesta ocasião, chamou-se a atenção para um aspecto típico da doença na região que era o escurecimento da pele. Deste fato derivou-se o primeiro nome da patologia, ou seja, febre negra ou Calazar (BRASIL, 1994). As leishmanioses viscerais estão presentes em quatro continentes e são consideradas endêmicas em 88 países. Cerca de 90% de todos os casos de LV ocorre em cinco países - Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão - e estão associados a 70.000 mortes por ano em todo o mundo (MURRAY *et al.*, 2005; WHO, 2010). Na América Latina, ela está presente em 12 países e 90% dos casos ocorrem no Brasil. No Brasil, caracterizava-se por apresentar-se em regiões tipicamente rurais, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Nas últimas décadas, com o processo de urbanização, a LV vem se expandindo para as áreas urbanas, bem como para outras regiões do país, tornando-se endêmica em cidades como o Rio de Janeiro (RJ), Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG), Palmas (TO), Fortaleza (CE), Mossoró (RN), Salvador (BA), Araçatuba (SP), Bauru (SP), Teresina (PI), entre outras (BRASIL 2006; WHO, 2010). Considerando-se que em poucos países a notificação é compulsória, acredita-se que a incidência das leishmanioses seja subestimada. De acordo com a OMS, estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram anualmente (FARIA e ANDRADE, 2012).

Nos países onde a LV é zoonótica - o Brasil, por exemplo - os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia, sendo considerados os principais reservatórios para a doença humana. A detecção precoce de cães infectados é fundamental para impedir a expansão da doença e é uma prerrogativa essencial para o controle da mesma. Como medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LV, além da eutanásia de cães infectados, são indicados também o controle de vetores, o diagnóstico e o tratamento de casos humanos. Entretanto, o processo de eliminação de reservatórios infectados requer a utilização

de métodos de diagnóstico confiáveis e de preferência de baixo custo e alta confiabilidade para a triagem e confirmação desses reservatórios. Com a intenção de se evitar o uso de métodos invasivos e considerando que a resposta humoral na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é geralmente muito intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos. Assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante utilizados para o diagnóstico canino. (FARIA e ANDRADE, 2012).

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. Estes organismos são responsáveis por causar doenças infecto-parasitárias, denominadas Leishmanioses ou Leishmaníasis (GRIMALDI e TESH, 1993; GRIMALDI *et al.*, 2012). Nas Américas a espécie transmissora é a *Leishmania chagasi* (*sin. Leishmania infantum*) (MOREIRA *et al.*, 2007), a qual é adaptada para viver em temperaturas em torno de 37 °C, fato que lhe permite invadir órgãos profundos após terem colonizado áreas cutâneas (REY, 2008).

As leishmanias apresentam duas formas distintas durante o seu ciclo de vida: a forma amastigota e a promastigota. As formas amastigotas são arredondadas, aflageladas e caracterizam-se por serem altamente infectantes e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro vertebrado. São parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados no interior das células fagocíticas, como os macrófagos. (Figura 1). As formas promastigotas são alongadas e possuem flagelos longos (Figura 2). São menos infectantes em relação às formas amastigotas e são encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (insetos flebotomíneos) (REY, 2008).

Figura 1: Forma amastigota da Leishmania

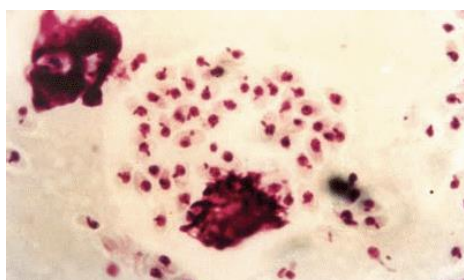


Figura 2: Forma promastigota da Leishmania



1.2 VETOR

Os vetores da LV são dípteros denominados *Lutzomyia*, um gênero que abrange espécies de mosquitos classificados conforme categorias taxonômicas atuais de flebótomos (*Phlebotominae*) pertencentes à classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae (KILLICK-KENDRICK, R, 1991; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1977). São popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (BRASIL, 2006).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas à transmissão da doença até o momento: *Lutzomyia longipalpis*, (Figura 3) considerada a principal espécie transmissora da Leishmaniose, e a *Lutzomyia cruzi* (GONÇALVES *et al.*, 1986; FEITOSA *et al.*, 2000). Os flebótomos colonizam pés de serra, boqueirões, matas virgens, domicílios (habitações humanas) e peridomicílios (abrigo de animais), o que facilita o contato do vetor com os hospedeiros da doença. Refugiam-se durante o dia em esconderijos úmidos e escuros como reentrâncias de rochas, frestas de paredes ou de troncos de árvores. Há indícios de que o período de maior transmissão ocorra durante e logo após as estações chuvosas, quando há um aumento da densidade populacional do inseto. A atividade dos flebótomos é crepuscular e noturna, durante o dia esses insetos ficam em repouso em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais (MARZOCHI, 1992; BRASIL, 2009; BRASIL, 2006).

Figura 3: Flebótomo da espécie *Lutzomyia longipalpis* no momento do repasto em humano



Fonte: Centro de controle de doenças [Wikipedia commons](#). Foto de James Gathany.

1.3. RESERVATÓRIOS

Na área urbana o cão é o principal reservatório. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. No ambiente silvestre os reservatórios são, principalmente, as raposas e os marsupiais. O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. É importante salientar que no Brasil, até o momento, os medicamentos utilizados para o tratamento de casos humanos não são autorizados para tratamento de LV em cães, devido a sua comprovada ineficácia em promover a cura. A forma de controle preconizada pelo MS é a eutanásia do cão soro reagente para leishmaniose. Tal medida, embora pareça drástica, deve ser orientada e esclarecida à população, tendo em vista o risco de transmissão de uma doença grave para os humanos da área, caso o cão infectado permaneça vivo. Além disso, deve-se orientar também que evite deslocar o cão soro reagente da área de transmissão na tentativa de protegê-lo da eutanásia, pelo risco de disseminar a doença (DIVE, 2010; BRASIL, 2006; GONTIJO, 2004).

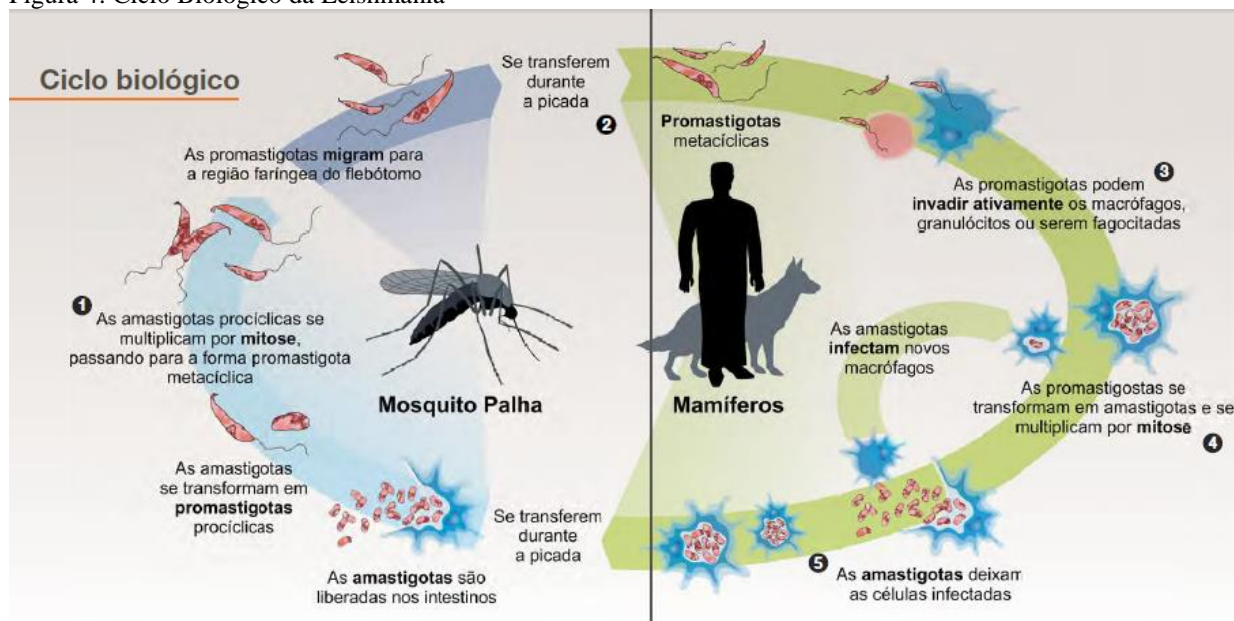
1.4 MODO DE TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

O protozoário necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo: o hospedeiro vertebrado (canídeo, marsupial ou homem) e o invertebrado (inseto). A doença é transmitida ao hospedeiro vertebrado através da picada da fêmea do inseto flebotomíneo infectado, quando inoculam o protozoário (na forma promastigota metacíclica) na vítima saudável. A infecção do vetor ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo da *Leishmania* spp na forma amastigota, as quais se multiplicam no interior dos macrófagos que são células do sistema mononuclear fagocitário, presentes na pele do hospedeiro infectado. Na porção média do tubo digestivo do inseto, as amastigotas transformam-se em promastigotas, e se multiplicam até originarem as promastigotas metacíclicas infectantes para os mamíferos (SACKS e SILVA, 1987; KAMHAWI, 2006). A partir da inoculação destas formas na pele, inicia-se uma interação entre o parasita e a resposta imunológica do hospedeiro que determinará a expressão clínica da leishmaniose. Diversos fatores do sistema imunológico são ativados, mas a resposta imune celular, específica para *Leishmania*, tem papel determinante

no controle da infecção. As alterações no organismo, sequenciais a presença do parasito, dependem da infectividade e antigenicidade da *Leishmania* e da imunidade e resistência já existentes ou desenvolvidas pelo hospedeiro após a infecção (SILVEIRA, LAINSON e CORBERTT, 2004). Os macrófagos, repletos de formas amastigotas, ficam desvitalizados e rompem-se liberando essas formas que serão num processo contínuo, fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitários (SMF), principalmente no baço, medula óssea e placas de Peyer (CIARAMELLA e CORONA, 2003).

O ciclo (Figura 4) se inicia quando, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o inseto ingere as formas amastigotas de *L. chagasi*. No trato digestivo do vetor, as amastigotas transformam-se em promastigotas, se multiplicam intensamente e se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (1). O ciclo se completa quando o flebótomo (*L. longipalpis*) infectado pica um hospedeiro vertebrado, inoculando as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) na pele (2). As formas infectantes são fagocitadas pelas células do SMF (3). No interior dessas células o protozoário transforma-se em amastigota (4) e, por sua vez, estas se multiplicam intensamente, rompendo o macrófago, infectando novas células e pela via linfática ou sanguínea atingindo outros tecidos (medula óssea, baço, fígado, linfonodos) ricos em células do SMF (5). As amastigotas ingeridas pelos insetos transmissores levam, em média, oito a 20 dias para se transformar em promastigotas e se multiplicar no intestino, migrando depois para as probóscides, até evoluírem para as formas infectantes, ou seja, promastigotas metacíclicas. Portanto, um flebotomíneo infectado demora em média, de oito a 20 dias para poder transmitir a *L. chagasi* para outro hospedeiro vertebrado. Durante um novo repasto sanguíneo, as promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro susceptível completando o ciclo biológico (BRASIL, 2011).

Figura 4: Ciclo Biológico da Leishmania



Fonte: Manual para o clínico veterinário. <http://www.wspabrazil.org/Images/Manual-Leishmaniose-WSPA-Brasil-2011>

1.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Em 2011, o diagnóstico imunológico da LVC passou por grandes modificações, anunciadas pelo MS em nota técnica. Estas modificações foram baseadas em um estudo multicêntrico realizado sob a coordenação do MS, onde foram avaliadas as metodologias de Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e o teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso (TR DPP[®]) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos (FUNED, 2013).

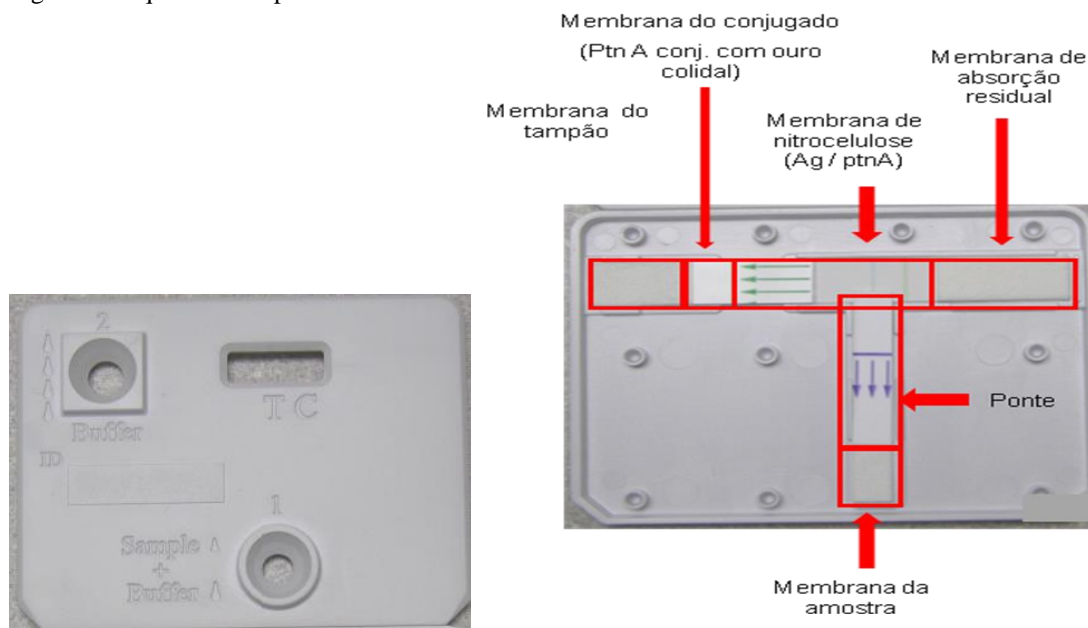
O MS com o intuito de solucionar ou minimizar alguns problemas, tais como a redução do número de animais falso positivo e falso negativo, agilizar a retirada dos animais infectados e diminuir a sobrecarga dos laboratórios da Saúde Pública, altera o cenário anterior cujo diagnóstico era realizado utilizando o método de EIE como triagem e a IFI como confirmatório, adotando o TR DPP[®] como triagem e o EIE como confirmatório no diagnóstico da LVC. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

1.5.1 Imunocromatografia de duplo percurso (DPP)

O TR DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* em cães, utilizando amostras de sangue, soro ou plasma. Este teste foi desenvolvido pela empresa *Chembio Diagnostic Systems* e transferido para Bio-Manguinhos. Atualmente, os suportes são produzidos pela *Chembio* e somente o tampão de corrida é produzido por Bio-Manguinhos. Inicialmente os suportes são analisados pela Seção de Controle de Processos Produtos Intermediários (SECPI), avaliando o seu desempenho frente a um tampão de corrida aprovado previamente. O desempenho do tampão de corrida também é avaliado frente a um suporte previamente aprovado. Após a aprovação pelo SECPI, o kit é montado e embalado em Bio-Manguinhos e enviado para a seção de Controle de Produto Final (SECPF), que analisa o kit (suporte e tampão de corrida) frente a um painel de amostras positivas e negativas caracterizadas.

O TR DPP[®] LVC é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando uma plataforma de duplo percurso composta por uma membrana de nitrocelulose impregnada com uma combinação única de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes para *Leishmania* K28 (fragmentos K26, K39 e K9). Conforme a Fig. 5, a plataforma apresenta dois poços: Poço 1, ligado pela membrana da amostra e o poço 2, ligado a membrana de revelação. A membrana de revelação é composta pela membrana do tampão, a membrana do conjugado, a membrana de nitrocelulose sensibilizadas com antígenos de *Leishmania* (ag e Ptn A) e a membrana de absorção residual (BIO-MANGUINHOS, 2013).

Figura 5: Esquema do suporte do TR DPP LVC.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

O teste é realizado com a adição de cinco microlitros ($5 \mu\text{L}$) da amostra e duas gotas do tampão de corrida no poço 1, afim de que o anticorpo presente na amostra migre ao encontro do antígeno impregnado na membrana de revelação do teste. Após cinco minutos, adiciona-se quatro gotas do tampão de corrida no poço 2, para que ocorra a migração do conjugado para a área TESTE (T), conforme Fig. 6. Após 10 minutos, se os anticorpos contra a *Leishmania* estiverem presentes na amostra, eles se ligam ao antígeno específico imobilizado na área de TESTE (T). As partículas conjugadas com o ouro migram sobre a membrana de nitrocelulose e são capturadas pelo complexo anticorpo-antígeno na área de TESTE (T) produzindo uma linha rosa/roxo conforme a Fig. 7. Na ausência de anticorpos contra *Leishmania* não há o aparecimento da linha rosa/roxo na área de TESTE (T). Partículas de ouro coloidal do conjugado, não ligadas, continuam a migrar ao longo da membrana e produzem uma linha rosa/roxa na área do Controle (C) contendo proteína A conforme a Fig. 8. O aparecimento da linha controle comprova que a amostra e os reagentes foram aplicados devidamente e a comprovação de que a reação ocorreu corretamente. A leitura e interpretação das linhas teste e controle devem ser realizadas após 15 minutos da adição do tampão de corrida no poço 1. Caso a controle linha seja ausente, o teste será inválido, conforme a Fig. 9 (BIO-MANGUINHOS, 2013). Os resultados são registrados com a intensidade das bandas da linha teste e linha controle, conforme a escala de intensidade (anexo 1). As especificações para interpretação dos resultados seguem conforme o monógrafo da transferência de

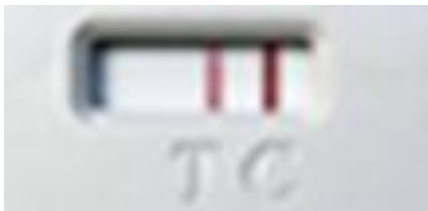
tecnologia da empresa *Chembio Diagnostic Systems Inc* (CHEMBIO, 2008), conforme o quadro 4.

Figura 6: Procedimento do TR DPP LVC.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

Figura 7: Resultado reagente



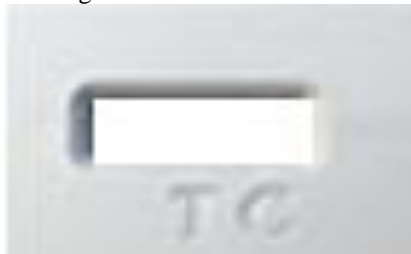
Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

Figura 8: Resultado não reagente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

Figura 9: Resultado inválido



Fonte: Elaborado pelo autor, 2014

1.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Estabilidade é a capacidade do produto de manter as propriedades físicas, químicas, biológicas e microbiológicas dentro do limite especificado durante o seu prazo de validade. Portanto, a avaliação da estabilidade é um ponto chave para garantir a qualidade e a eficácia de todos os produtos (BRASIL, 2012).

Os estudos de estabilidade são realizados com a finalidade de fornecer evidências de como a qualidade do produto em questão varia com o tempo (ICH, 2003). Atualmente, a influência de outros fatores ambientais como a umidade e a luz, também podem ser avaliadas. Além disso, os fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem também devem ser considerados na avaliação final (ICH, 2003; BRASIL, 2005). Com base nos dados obtidos, pode-se prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade dos produtos, além das condições ideais de armazenamento (ICH 2003; BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade de longa duração (EELD) é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante, e opcionalmente, depois do prazo de validade proposto. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. Devem ser realizados os testes pertinentes à especificação do produto e a frequência comumente utilizada para os testes considerados mais críticos é de 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses enquanto que para aqueles considerados menos críticos, só é necessário apresentar o estudo no prazo de validade requerido comparativo ao momento zero. Outras frequências também podem ser utilizadas, devendo-se avaliar caso a caso (BRASIL, 2005).

1.7 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento dos casos de leishmaniose no Brasil, onde o aparecimento de casos humanos normalmente é precedido de casos caninos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem, houve, nos últimos anos, uma melhora significativa na qualidade dos testes sorológicos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) na rede pública. Este fato se dá pela preocupação do Ministério da Saúde (MS) em aprimorar as ferramentas utilizadas. Além disso, com o intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o MS, a partir da Nota Técnica Conjunta nº 01 /2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS (MINISTERIO DA SAÚDE, 2011) determinou o TR DPP como método de triagem.

O kit de TR DPP LVC, por se tratar de um produto proveniente da transferência de tecnologia com a empresa Chembio Diagnostic Sytems Inc, para fins de registro, avaliou-se inicialmente utilizando dados dos testes realizados pela Chembio e pelos três lotes pilotos. Contudo, é de extrema importância a avaliação do produto após registro através do EELD, armazenados na temperatura preconizada de 2 a 30 °C e pelo prazo de validade estabelecido de 24 meses, para verificar de acordo com a legislação vigente.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho do kit de diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelo método de imunocromatografia de duplo percurso (DPP), através do estudo de estabilidade em longa duração, dos lotes produzidos pós-registro, composto com os suportes produzidos pela empresa Chembio e tampão de corrida por Bio-Manguinhos os quais foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Reativos (LACORE), em Bio-Manguinhos / Fiocruz, no Rio de Janeiro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o ensaio de estabilidade dos três lotes dos suportes produzidos pela empresa *Chembio Diagnostic Systems Inc* e os tampões de corrida produzidos por Bio-Manguinhos que compõem o kit de TR DPP® LVC, quando submetido a temperaturas entre 2 a 8 °C e 30 °C durante o prazo de validade do kit.
- Realizar o ensaio de três lotes e avaliar a estabilidade pós-validade, com o objetivo de ampliar do prazo de validade dos componentes de 24 para 30 meses.

3 METODOLOGIA

3.1 TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Conforme o quadro 1, foram testados 3 lotes do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos 20 determinações é composto por materiais que devem ser armazenados entre 2 e 30 °C.

Quadro 1. Composição dos kits e prazo de validade dos componentes.

Descrição dos componentes	Temperatura	LOTES					
		124TV002Z		125TV005Z		128TV012Z	
		Lote	Prazo de validade	Lote	Prazo de validade	Lote	Prazo de validade
Suportes de teste	2 a 30 °C	118SL005Z	Jul-2013	119SL007Z	Jul-2013	110SL011Z	Ago-2013
Tampão de corrida	2 a 30 °C	124TD001Z	Abr-2014	125TD002Z	Mai-2014	127TD005Z	Jul-2014
Alças coletoras descartáveis	2 a 30 °C	124AD001B	Jul-2013	125AD004B	Jul-2013	128AD009Z	Ago-2013
Lancetas estéreis descartáveis	2 a 30 °C	124LE001G	Out-2015	125LE001J	Out-2015	128LE003A	Ago-2016
Manual de instrução de uso	2 a 30 °C	---	--	---	--	---	---

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

Visando avaliar o desempenho do kit nas condições adequadas de armazenamento indicadas na instrução de uso, ou seja, para cumprir os requisitos do EELD, os kits foram armazenados entre 2 a 8 °C e a 30 °C por 30 meses.

Os três lotes de TR DPP LVC produzidos em Bio-Manguinhos, contendo suportes e tampão de corrida de lotes diferentes, foram organizados por datas de fabricação, validade, liberação e controle de qualidade, como caracterizado no quadro 2.

Quadro 2. Datas de fabricação, validade e liberação pelo controle de Qualidade (CQ) dos lotes utilizados no EELD.

Lotes	Data da fabricação	Validade	Lib. Produto Acabado	Amostragem para CQ.
124TV002Z	ABR/12	JUL/13	MAI/12	JUN/12
125TV005Z	MAI/12	JUL/13	MAI/12	JUN/12
128TV012Z	AGO/12	AGO/13	AGO/12	SET/12

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.


Para cada lote, foram realizados o controle microbiológico (avaliação da carga microbiana viável associada) e controle físico-químico (dosagem de pH) do tampão de corrida. As amostras foram enviadas aos respectivos setores responsáveis nos prazos estipulados no cronograma (Quadro 3). Para o referido estudo utilizou-se a amostragem de quatro suportes por tempo/lote.

Quadro 3. Matriz do estudo de estabilidade.

Estudo de estabilidade longa duração - DPP LVC 2 a 8°C e 30°C												
Lotes	Tempo (meses)											
	T0	T1	T2	T3	T6	T9	T12	T15	T18	T21	T24	T30
124TV002Z	MAI/12						JUL/12	OUT/12	JAN/13	ABR/13	JUL/13	JAN/14
125TV005Z	MAI/12						JUL/12	OUT/12	JAN/13	ABR/13	JUL/13	JAN/14
128TV012Z	AGO/12							NOV/12	FEV/13	MAI/13	AGO/13	FEV/14

T0: data de liberação do lote

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

 Não realizado

3.1.1. Especificações

Para as análises dos kits de diagnóstico do TR DPP Leishmaniose visceral canina, os critérios de especificações do controle de pH, controle microbiológico do tampão de corrida e para as análises com sangue negativo e soro positivo foram determinados pela empresa *Chembio Diagnostic Systems Inc* em acordo com Bio-Manguinhos, conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4. Especificação do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos 20 determinações

COMPONENTES	ESPECIFICAÇÕES
Controle de pH	Variação de 9,3 a 9,7.
Controle microbiológico	≤ 10 colônias de crescimento microbiológico.
Sangue negativo para LVC	<ol style="list-style-type: none"> 1. A linha teste deve apresentar intensidade N1 ou N2 (conforme a escala de avaliação de intensidade) em até 15 minutos. 2. A linha controle deve ser visível em até 15 minutos com intensidade ≥ 2.
Soro positivo para LVC	<ol style="list-style-type: none"> 1. A linha teste deve ser positiva com intensidade ≥ 1, realizar a leitura em 15 minutos. 2. A linha controle deve ser visível em até 15 minutos com intensidade ≥ 2.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

4. RESULTADOS

Para realização deste EELD, foram selecionados três lotes: 124TV002Z, 125TV005Z e 128TV012Z que foram armazenados nas temperaturas de 2 a 8 °C e 30 °C.

Lote 1: 124TV002Z

O lote 124TV002Z, foi liberado pelo controle de qualidade no mês de maio de 2012 e amostrado para análise para o EELD em junho de 2012 (Quadro 2). Por este motivo, o estudo só teve início em julho de 2012, referente ao tempo 12 deste estudo, conforme resultados dos quadros 5 e 6.

► Temperatura de armazenamento: 2 a 8 °C

Quadro 5. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) – 124TV002Z

Testes	Especificação	Tempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP						3	3	3	3	3	3
		NP						3	3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
		N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	7'28' , /3						6'59''/ 3	6'57''/ 3	7'33''/ 3	7'33''/ 3	7'40''/ 3	8'01''/ 3
		7'36' , /3						7'12''/ 3	6'59''/ 3	7'42''/ 3	7'38''/ 3	7'20''/ 3	8'05''/ 3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	7'01' , /2						6'34''/ 3	7'03''/ 3	7'27''/ 3	7'13''/ 3	7'10''/ 3	7'45''/ 2
		7'03' , /2						6'49''/ 3	7'08''/ 3	7'21''/ 3	7'14''/ 3	6'49''/ 3	7'40''/ 2
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5					9,4	9,4	9,5	9,2	9,5	9,5	
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A					A	A	A	A	A	A	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

■ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T9)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

Lote 1: 124TV002Z**➤ Temperatura de armazenamento: 30 °C**

Quadro 6. Estudo de estabilidade de longa duração (30°C) – 124TV002Z

Testes	Especificação	Tempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP						3	3	3	3	3	3
		NP						3	3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
		N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	7'28''/3						7'15''/3	8'35''/3	7'11''/3	7'54''/3	7'34''/3	8'19''/3
		7'36''/3						7'00''/3	8'39''/3	7'17''/3	8'01''/3	7'35''/3	7'59''/3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	7'01''/2						6'48''/3	8'43''/3	7'08''/3	7'25''/3	7'02''/3	7'33''/3
		7'03''/2						6'53''/3	8'44''/3	6'42''/3	7'24''/3	7'00''/3	7'29''/3
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5						9,4	9,5	9,4	9,2	9,4	9,4
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A						A	A	A	A	A	A

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

☐ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T9)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

Lote 2: 125TV005Z

O lote 125TV005Z, foi liberado pelo controle de qualidade no mês de maio de 2012 e amostrado para análise para o EELD em junho de 2012 (Tabela 2), por este motivo, o estudo só teve início em julho de 2012, referente ao tempo 12 deste estudo, conforme resultados das tabelas 7 e 8.

➤ Temperatura de armazenamento: 2 a 8 °C

Quadro 7. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) - 125TV005Z

Testes	Especificação	Tempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP						3	3	3	3	3	3
		NP						3	3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
		N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	6'57''/3						6'40''/3	6'52''/3	7'09''/3	7'39''/3	7'13''/3	7'50''/3
		7'00''/3						6'55''/3	6'57''/3	7'07''/3	7'48''/3	7'38''/3	7'56''/3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	6'56''/2						6'20''/3	6'38''/3	6'54''/3	7'07''/3	6'55''/3	7'37''/2
		6'37''/2						6'34''/3	6'45''/3	6'57''/3	7'12''/3	7'21''/3	7'40''/2
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5						9,5	9,4	9,5	9,2	9,5	9,5
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A						A	A	A	A	A	A

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

☐ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T9)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

Lote 2: 125TV005Z

➤ Temperatura de armazenamento: 30 °C

Tabela 8. Estudo de estabilidade de longa duração (30°C) - 125TV005Z

Testes	Especificação	Tempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP						3	3	3	3	3	3
		NP						3	3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
		N1						N1	N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	6'57''/3						7'10''/3	6'58''/3	6'49''/3	7'27''/3	7'24''/3	8'11''/3
		7'00''/3						7'02''/3	6'59''/3	7'03''/3	7'34''/3	7'03''/3	8'46''/3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	6'56''/2						6'51''/3	6'32''/3	6'33''/3	7'16''/3	7'05''/3	7'39''/3
		6'37''/2						6'46''/3	6'30''/3	6'42''/3	7'25''/3	7'00''/3	8'02''/2
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5					9,4	9,4	9,4	9,2	9,5	9,4	
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A					A	A	A	A	A	A	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

☐ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T9)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

Lote 3: 128TV012Z

O lote 128TV012Z, foi liberado pelo controle de qualidade no mês de agosto de 2012 e amostrado para análise para o EELD em setembro de 2012 (Quadro 2), por este motivo, o estudo só teve início em novembro de 2012, referente ao tempo 15 deste estudo, conforme resultados das tabelas 9 e 10.

➤ **Temperatura de armazenamento: 2-8 °C**

Quadro 9. Estudo de estabilidade de longa duração (2-8 °C) - 128TV012Z

Testes	Especificação	Tempo (meses)												
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30	
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP								3	3	3	3	3
		NP								3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1								N1	N1	N1	N1	N1
		N1								N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	6'27''/3								6'54''/3	6'55''/3	7'24''/3	6'55''/3	7'07''/3
		6'32''/3								6'51''/3	6'46''/3	6'53''/3	7'03''/3	7'05''/3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	6'18''/3								6'40''/3	6'25''/3	6'31''/3	6'49''/2	6'53''/2
		6'23''/3								6'43''/3	6'29''/3	6'30''/3	6'50''/2	6'59''/2
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5							9,2	9,2	9,1	9,2	9,2	
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A								A	A	A	A	A

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

☐ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T12)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

Lote 3: 128TV012Z➤ **Temperatura de armazenamento: 30 °C**

Quadro 10. Estudo de estabilidade de longa duração (30°C) - 128TV012Z.

Testes	Especificação	Tempo (meses)											
		0	1	2	3	6	9	12	15	18	21	24	30
01. Amostra negativa	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	NP							3	3	3	3	3
		NP							3	3	3	3	3
	Linha teste deve ser N1 ou N2.	N1							N1	N1	N1	N1	N1
		N1							N1	N1	N1	N1	N1
02. Soro positivo (Dil. 1/16)	Linha controle deve ser maior ou igual a 2.	6'27''/3							6'57''/3	6'40''/3	7'08''/3	7'02''/3	7'20''/3
		6'32''/3							6'48''/3	6'45''/2	7'04''/3	6'54''/3	7'24''/3
	Linha teste deve ser maior ou igual a 1.	6'18''/3							6'33''/3	6'23''/3	6'55''/3	7'00''/2	7'15''/2
		6'23''/3							6'48''/3	6'28''/3	6'59''/3	6'39''/2	7'11''/2
03. pH	Entre 9,3 e 9,7.	9,5						9,2	9,3	9,2	9,3	9,2	
04. Controle microbiológico	Menor ou igual a 10 colônias.	A						A	A	A	A	A	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2014.

0: Dados da liberação do lote

NP: Não programado

A: Ausente

☐ : Não realizado. Período de produção e análise do CQ (T1 a T12)

N1/N2: Negativo

Intensidades 1 a 3: Positivo

5. DISCUSSÃO

Os estudos de estabilidade permitem indicar o prazo de validade de um produto, além das condições ideais de armazenamento e de uso e são imprescindíveis para garantir a eficácia e segurança. Além disso, segundo a RDC 315/2005 (BRASIL, 2005) e a RDC 55/2010 (BRASIL, 2010), o relatório de estudos de estabilidade é um dos documentos indispensáveis que compõem o processo de registro do produto junto à ANVISA (REISDÖRFER, 2011).

A *Chembio Diagnostic Systems*, realizou o EELD na temperatura ambiente e a 2 a 8 °C por 6 meses. A temperatura ambiente, a linha teste das amostras positivas se tornou visível no sexto e sétimo minuto com intensidade de 2 a 3. A amostra negativa apresentou resultado negativo em todos os tempos em todos os lotes avaliados e o pH variou de 9,3 a 9,7.

Conforme EELD dos lotes piloto, armazenados entre 2 a 8 °C e 30 °C por 24 meses, as amostras positivas tornaram-se visíveis por volta do sétimo minuto em todos os tempos (variando do sexto ao nono minuto) com intensidade entre 1 e 3, para ambas as temperaturas. Já a linha controle positivo tornou-se visível por volta do sexto minuto (variando do quinto ao sétimo minuto) com intensidade igual a 3, para ambas as temperaturas, em todos os tempos testados. A amostra negativa apresentou resultado negativo em todos os tempos em todos os lotes avaliados. O pH apresentou valores entre 9,3 e 9,5 e o controle microbiológico foi satisfatório, para todos os tempos dos testes.

Este estudo foi concluído após 30 meses, ou seja, até o prazo de validade deste produto, e mais 6 meses após a validade em ambas as temperaturas de armazenamento.

Conforme as tabelas 05 a 10, a linha teste das amostras positivas se tornaram visíveis por volta do sexto e sétimo minuto em todos os tempos (variando até oitavo minuto) com intensidade entre 2 e 3, para ambas as temperaturas. Já a linha controle se tornou visível por volta entre sexto e oitavo minuto com intensidade igual a 3, para ambas as temperaturas, em todos os tempos testados. A amostra negativa apresentou resultado negativo em todos os tempos em todos os lotes avaliados. Todos os resultados com amostras positivas e negativas obtidas estão de acordo com as respectivas especificações (Tabela 4), tanto para as amostras armazenadas entre 2 a 8 °C, como para aquelas armazenadas a 30 °C.

O pH do tampão de corrida, apresentou valores de 9,1 a 9,5. observou-se uma queda no valor do pH (9,1 e 9,2) em alguns tempos de análise em relação a especificação (Tabela 4), porém não interferiu no desempenho dos testes.

Nas análises do controle microbiológico dos tampões de corrida, os resultados foram idênticos do início ao fim do estudo em todos os tempos e temperaturas analisadas em todos os lotes avaliados em ambas as temperaturas.

Os resultados se mantiveram dentro dos padrões esperados, confirmando o prazo de validade estabelecido e confirma a possibilidade da extensão do prazo de validade dos componentes de 24 para 30 meses.

6. CONCLUSÃO

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os três lotes pós registro analisados comparando-os com os dados do EELD da Chembio Diagnostic e do EELD dos lotes piloto.

De acordo com os resultados obtidos o produto apresentou resultados satisfatórios conforme as especificações até o prazo de validade estabelecido e até 6 meses pós-validade, completando 30 meses de análise tanto nas amostras armazenadas entre 2 a 8 °C quanto naquelas armazenadas à 30 °C.

REFERÊNCIAS

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BIO-MANGUINHOS, **Manual de Instrução de uso do kit TR DPP Leishmaniose visceral canina**. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2012.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral Canina, Um Manual para o clínico veterinário**, WSPA, 2011. http://www.wspabrasil.org/Images/Manual-Leishmaniose-WSPA-Brasil-2011_tcm28-24593.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica - 7ª edição** - Brasília-DF: Ministério da Saúde; Caderno 11, p.29-30, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília-DF: 1ª edição, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n.º 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do guia para a realização de estudos de estabilidade**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 1º ago.; Seção 1, n.146, p.119. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle, Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Visceral (CALAZAR) - Normas Técnicas. 1º ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 17 dez. 2010c; Seção 1, n.241, p.110.

CHEMBIO. QC Monograph for Masterlot Testing of the DPP Leishmania Product Format. Doc #: 5002. 15-Dec-08

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Warrenton, v.25, n.5,p.358-368, 2003.

DIVE. Diretoria de Vigilância Epidemiológica – DIVE/SES/SC, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, CIEVS/Unidade de Resposta Rápida – URR, Gerência de Vigilância de Zoonoses – GEZOO, **Protocolo de Vigilância Epidemiológica, manejo clínico e aspectos laboratoriais para Leishmaniose visceral**. Santa Catarina, Setembro de 2010.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba. **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Héliida Monteiro de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 3, n. 2, jun. 2012. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176232012000200007&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 04 abr. 2014. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED), **Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. Serviço de Doenças Parasitárias - Referência Nacional para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral -Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças -Instituto Octávio Magalhães – Lacen – MG, 2013.

GONÇALVES, A. J. R. *et al.* Calazar: relato de três pacientes adultos internados no HSE/INAMPS (RJ). Considerações sobre esta endemia de grande importância no nosso território. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v.60, n.5, p.369-376, 1986.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, Jr. G. *et al.* The Effect of Removing Potentially infectious Dog on the Numbers of Canine Leishmania infantum Infections in an Endemic Area with High Transmission Rates. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86 (6), p. 966-971, 2012.

GRIMALDI, Jr. G; TESH, R.B. Leishmaniasis of the new World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology**, rev, 6: 230-50, 1993.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). **Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products**. v. 4; 2003.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, 2006.

KILLICK -KENDRICK, R.,. **Leishmania: intravectorial cycle of leishmania in sandflies**. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 66 (suppl-1):71-74;1991.

KILLICK-KENDRICK, R., LEANEY, A. J., READY, P. D., MOLYNEUX, D. H.,. **Leishmania in phlebotomid sandflies. IV**. The transmission of Leishmania mexicana amazonensis to hamsters by the bite of experimentally infected Lutzomyia longipalpis. Proc. R. Soc. Lond. B., 196, 105–115;1977

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.63, n.5/6, p.82-104. 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 01/2011**. Brasília (DF), 2011.

MOREIRA, M.; LUVIZOTTO, M.; GARCIA, J.; CORBETT, C.; LAURENTI, M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245–252, 2007.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. v. 366, p. 1561-77. 2005.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REISDÖRFER, Francis Carazzai. Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses. Dissertação (mestrado) – **Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos**, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.

SACKS, DL, da SILVA RP. A geração de fase infecciosa *Leishmania major* promastigotes está associada com a expressão de superfície celular e a liberação de um glicolípido desenvolvendo regulada. **Journal of Immunology**, 1987; 139. :3099 - 3106 [[PubMed](#)].

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in the Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.9, n.3. p. 239-251, maio. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, p. 22-26, 2010

ANEXO 1.

Escala de avaliação, intensidade das bandas

Visual**3****2****1****N2****N1**