UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e
Produção de kit imunodiagnóstico**

Cláudia Solimeo Meneghisse

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:
Profa. Dra. Adelaide José Vaz

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Meneghisse, Cláudia Solimeo
M541b Boas práticas de fabricação e o processo de validação no
desenvolvimento e produção de kit imunodiagnóstico / Cláudia
Solimeo Meneghisse. -- São Paulo, 2007.
159p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises da
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Vaz, Adelaide José

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Teste imunoenzimático :
ELISA : Medicina 3. Imunologia : Doenças de Chagas I. T.
II. Vaz, Adelaide José, orientador.

616.0756-9 CDD

Cláudia Solimeo Meneghisse

Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e
Produção de kit imunodiagnóstico.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Adelaide José Vaz
orientador/presidente

Antônio Walter Ferreira

Dirceu Raposo de Mello

Kioko Takei

Maria Carmen Arroyo Sanches

São Paulo, 05 de novembro de 2007.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e na REM Indústria e Comércio Ltda.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão, perder
com classe e viver com ousadia. Pois o
triunfo pertence a quem se atreve, e a vida
é muito bela para ser insignificante.*

Charles Chaplin

Ao meu marido, José Adeilson, que sempre me apoiou em minhas decisões, sendo elas certas ou erradas. Que teve paciência de me mostrar o caminho quando não conseguia encontrá-lo e ao seu grande amor a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora a quem recorri nas horas mais difíceis e à quem sempre nos esquecemos de agradecer.

Aos meus pais, que me deram a vida, me orientaram e me deram a oportunidade de estar aqui hoje.

À minha família, com quem sempre pude contar, nas horas boas e ruins.

À amiga e orientadora Profa. Dra. Adelaide José Vaz, pela valiosa orientação, incentivo e ensinamentos.

Ao querido amigo Ronaldo Milhin (*in memoriam*), que apostou em mim e sempre confiou em minha capacidade profissional, mesmo quando eu não confiava.

À REM Indústria e Comércio Ltda, em especial ao Eng. José Efromovich, pela oportunidade de me desenvolver pessoal e profissionalmente e por permitir a utilização de dados para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Kioko Takei, pela amizade, pelos ensinamentos, por suas valiosas sugestões e pela colaboração na correção deste trabalho, desde o seu primeiro rascunho.

À Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, pela grande ajuda na análise estatística deste trabalho.

À amiga Catherine A. Benoit, por compartilhar informações tão valiosas e pela correção do Abstracts.

Aos todos os funcionários e estagiários da REM Indústria e Comércio Ltda que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, em especial à equipe da Fábrica, mesmo aos que não estão mais lá (Ana Carina, Andréia, Cleiton, Daniele, Elvis, Everton, Fábio, Gilbert, Hamilton, Joelma, Julio, Karin, Larissa, Lucila, Máira, Marcelo, Marcelo, Marcos, Michel, Ronaldo). Obrigada pela dedicação ao trabalho, amizade e companheirismo.

Ao Dr. Antônio Walter Ferreira, Profa Dra. Kioko Takei, Profa. Dra. Yoshimi Yamamoto e Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, pelas valiosas sugestões no exame de transferência de mestrado para doutorado e de qualificação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Análises Clínicas, pela ajuda e amizade de professores e funcionários.

Aos companheiros e colegas da Seção de Imunologia da FCF-USP, pela amizade e colaboração, em especial ao Alberto, Andréia, Cristiane e Noeli.

Aos bibliotecários da biblioteca do conjunto das químicas, em especial à bibliotecária Leila Aparecida Bonádio, pela atenção e revisão das referências bibliográficas e Maria Luisa pela confecção da ficha catalográfica.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que mesmo não citados aqui foram muito importantes ao longo desta caminhada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico da Vigilância Sanitária	2
1.2. A doença de Chagas	7
1.2.1. Imunidade na doença de Chagas.....	10
1.2.2. Diagnóstico da doença de Chagas	11
1.2.3. O antígeno <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Análise da legislação	28
3.2. Elaboração de modelo de procedimentos.....	28
3.2.1. Concepção	28
3.2.1.1. Como foi feito o desenvolvimento do novo produto	28
3.2.1.2. Desenho do kit Proposto	30
3.2.2. Desenvolvimento do kit ELISA Chagas	32
3.2.3. Produção de três lotes piloto	40
3.2.3.1. Procedimentos para produção, validação e estabilidade	40
3.2.3.2. Elaborar e implantar os procedimentos necessários.....	40
3.2.3.3. Lotes piloto.....	41
3.2.3.4. Testes de tempos de incubação do Substrato e volume da Solução Bloqueadora no kit Chagas	41
3.2.3.5. Estudo Analítico	41
3.2.4. Validação do kit desenvolvido	43
3.2.4.1. Testes Analíticos.....	43
3.2.4.1.1. Sensibilidade e especificidade	43
3.2.4.1.2. Limite de detecção	44
3.2.4.1.3. Análise de interferentes	44
3.2.4.1.4. Reação Cruzada.....	44
3.2.4.1.5. Repetitividade.....	45
3.2.4.1.6. Reprodutibilidade.....	45
3.2.4.1.7. Avaliação de Soro x Plasma.....	45
3.2.4.1.8. Avaliação das condições de armazenamento	45

3.2.4.1.9. Concordância de Desempenho com kit Comercial.....	46
3.2.4.2. Estudos de Estabilidade.....	46
3.2.4.2.1. Estabilidade Acelerada.....	47
3.2.4.2.2. Estabilidade à Temperatura Ambiente	47
3.2.4.2.3. Estabilidade de kit Aberto.....	48
3.2.4.2.4. Estabilidade de kit em uso.....	48
3.2.4.2.5. Estabilidade a temperaturas extremas	49
3.2.4.2.6. Estabilidade de longa duração (ou em tempo real)	49
3.2.4.3. Estudos Clínicos	49
3.2.5. Registro do produto	51
3.2.6. Análise Estatística	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Análise da legislação	53
4.1.1. A Resolução RDC n° 206, de 17 de novembro de 2006	59
4.1.2. A legislação de Banco de Sangue	62
4.1.3. A legislação de validação.....	63
4.1.3.1. Objetivo	64
4.1.3.2. Procedimento	64
4.1.3.3. Requisitos da Validação	65
4.1.3.4. Validação durante o desenvolvimento do kit	66
4.1.3.5. Validação após o desenvolvimento do kit.....	67
4.2. Modelo de procedimentos	68
4.3. Desenvolvimento de um kit ELISA para Chagas	70
4.3.1. Produção	70
4.3.1.1. Painéis	71
4.3.1.2. Antígenos	75
4.3.1.3. Fase sólida.....	76
4.3.1.4. Diluente de amostra	79
4.3.1.5. Conjugado.....	81
4.3.1.6. Substrato.....	84
4.3.1.7. Solução de Lavagem	86
4.3.1.8. Solução Bloqueadora.....	86
4.3.1.9. Controles.....	88
4.3.1.9.1. Controle Negativo.....	88
4.3.1.9.2. Controle Positivo	88
4.3.1.10. Produto Final.....	88
4.3.2. Validação.....	92
4.3.2.1. Validação de kit imunodiagnóstico ELISA.....	92
4.3.2.1.1. Testes Analíticos	92
4.3.2.1.1.1. Sensibilidade e especificidade	92
4.3.2.1.1.2. Limite de detecção	94
4.3.2.1.1.3. Análise de interferentes.....	96

4.3.2.1.1.4. Reação Cruzada	96
4.3.2.1.1.5. Repetitividade.....	98
4.3.2.1.1.6. Reprodutibilidade	100
4.3.2.1.1.7. Avaliação de Soro x Plasma.....	102
4.3.2.1.1.8. Avaliação das condições de armazenamento de amostras.....	104
4.3.2.1.1.9. Estudo comparativo de Desempenho com kit Comercial	105
4.3.2.1.2. Estudos de Estabilidade	107
4.3.2.1.2.1. Estabilidade acelerada	107
4.3.2.1.2.2. Estabilidade de kit aberto	109
4.3.2.1.2.3. Estabilidade de kit em uso.....	111
4.3.2.1.2.4. Estabilidade à temperatura ambiente	113
4.3.2.1.2.5. Estabilidade em tempo real	115
4.3.2.1.2.6. Estabilidade a temperaturas extremas	117
4.3.3. Estudos Clínicos.....	120
4.3.4. Registro do produto	121
4.3.4.1. Processo de registro.	121
4.3.4.2. Análise Prévia	121
5. DISCUSSÃO	122
6. CONCLUSÃO	133
7. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	135
8. ANEXOS	137
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Antígenos expressos por <i>T. cruzi</i>	22
Tabela 2: Proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos de <i>Trypanosoma cruzi</i> com potencial uso clínico e epidemiológico	23
Tabela 3: Análise da Literatura e Legislação de Boas Práticas de Fabricação, Processo de Validação e Registro de Produto	54
Tabela 4: Comparação dos itens das principais legislações de Boas Práticas de Fabricação:	55
Tabela 5: Legislações Harmonizadas no Mercosul e suas equivalentes nos Estados-Parte.....	58
Tabela 6: Documentos necessários para o cadastramento ou registro de produtos para diagnóstico de uso in vitro no Brasil.....	60
Tabela 7: Principais características do produto que se pretendia desenvolver.....	70
Tabela 8: Resultados de Painéis Utilizados na validação do kit ELISA Chagas	72
Tabela 9: Densidades ópticas de amostras positivas e negativas em microplacas com diferentes tipos de plástico	77
Tabela 10: Densidade óptica a 630 nm e cor do diluente de amostras com diferentes concentrações de corante (A, B, C e D), com e sem adição de amostras	80
Tabela 11: Resultados de amostras positivas e negativas de painel frente a diferentes combinações de conjugado anti-IgG e anti-IgM	82
Tabela 12: Distribuição de amostras randômicas negativas e amostras positivas.....	93
Tabela 13: Resultados dos testes para análise de interferentes	96
Tabela 14: Resultados dos testes para reação cruzada	97
Tabela 15: Resumo dos Estudos de Interferentes e Reação Cruzada.....	98
Tabela 16: Coeficiente de variação de amostras positiva e negativa na repetitividade	99
Tabela 17: Coeficiente de variação dos índices de reatividade de todas as replicatas das amostras positiva e negativa na reprodutibilidade.....	102
Tabela 18: Índices de Reatividade de amostras negativas colhidas com diversos tipos de tubo.....	103
Tabela 19: Índices de Reatividade de amostras negativas colhidas com diversos tipos de tubo, acrescidas de amostras positivas	103
Tabela 20: Comparação de desempenho do novo kit ELISA Chagas e kit comercial	105
Tabela 21: Resumo dos resultados do estudo clínico do kit ELISA Chagas	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Doença de Chagas: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 2: Fluxograma para realização de testes laboratoriais para doença de Chagas na fase crônica.....	18
Figura 3: Etapas Básicas para Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Produtos....	68
Figura 4: Macro fluxo de Produção	69
Figura 5: Resultados de Immunoblot de extratos físicos e químicos de <i>T. cruzi</i> de diferentes lotes e em tempos diferentes.....	75
Figura 6: Principais etapas de sensibilização de microplacas.....	78
Figura 7: Estabilidade acelerada a 37°C para o conjugado do kit Chagas.....	83
Figura 8: Tempos de incubação do substrato no kit Chagas	85
Figura 9: Volume da Solução bloqueadora no kit Chagas	87
Figura 10: Modelo de rótulo externo de acordo com a legislação	90
Figura 11: Modelo de rótulos internos de acordo com a legislação.....	91
Figura 12: Limite de detecção: correlação entre título de imunofluorescência e ELISA para Chagas.....	95
Figura 13: Distribuição dos índices de reatividade de amostras positiva e negativa em estudo de repetitividade para uma amostra positiva e uma amostra negativa (a linha representa a média dos valores).....	99
Figura 14: Distribuição dos índices de reatividade de amostras positiva e negativa em estudo de reprodutibilidade para uma amostra positiva e uma amostra negativa (a linha representa a média dos valores).....	101
Figura 15: Índices de Reatividade de uma amostra positiva após cinco ciclos de congelamento e descongelamento.....	104
Figura 16: Estabilidade acelerada dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.....	108
Figura 17: Estabilidade de kit aberto dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.....	110
Figura 18: Estabilidade de kit em uso dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.....	112
Figura 19: Estabilidade à temperatura ambiente dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.....	114
Figura 20: Estabilidade em tempo real dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.....	116
Figura 21: Estabilidade a temperaturas extremas dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa – Grupo 1	118
Figura 22: Estabilidade a temperaturas extremas dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa – Grupo 2.....	119
Figura 23: Distribuição das frequências de amostras positivas e negativas no estudo clínico do kit ELISA Chagas	120
Figura 24: Perfil de precisão de um ensaio mostrando erro não uniforme.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CV: Coeficiente de variação

D.O.: Medida de Absorbância (em densidade óptica)

ELISA: “Enzyme Linked Immunossorbent Assay”

EDTA: ethylene diamine tetracetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FDA: “Food and Drug Administration”

GMP: “Good Manufacturing Practices”

HA: Hemaglutinação

IB: Immunoblot

IFI: Imunofluorescência indireta

Internet: Rede mundial de computadores

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IR: Índice de Reatividade

kDa: Quilodaltons

LIT: Liver Infusion Triptase

MS: Ministério da Saúde

nm: Nanômetros

NNN: meio de cultura de Nicolle, Navy e McNeal

pNPP: para-nitro-fenil-fosfato

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida)

TMB: Tetrametilbenzidina

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

MENEGHISSE, C.S. **Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e Produção de kit imunodiagnóstico.** 2007. 157p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A produção de kits para diagnóstico *in vitro* deve ser feita seguindo-se a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF). O objetivo deste trabalho foi elaborar um procedimento para desenvolvimento, produção e validação de um produto para diagnóstico *in vitro*, de acordo com a legislação vigente. Adotamos como modelo um kit imunoenzimático para Doença de Chagas. Dentro dos requisitos de BPF, a validação é uma etapa importante, pois tem por objetivos, dentre outros: auxiliar no estabelecimento de procedimentos de produção e controle de qualidade, avaliar desvios e dimensionar possíveis erros, avaliar o desempenho quanto à utilidade médica dos resultados obtidos e estabelecer condições ideais de uso. No estabelecimento dos requisitos para validação devem-se considerar as características do método utilizado, a utilidade clínica e diagnóstica dos resultados e as condições de uso do kit. Os parâmetros para validação devem ser definidos considerando a finalidade do uso do produto. Os resultados obtidos em três lotes pilotos demonstraram que o kit pode ser utilizado tanto com soro como com plasma, as amostras podem ser congeladas e descongeladas antes do uso por até 5 ciclos, o índice de concordância com kit comercial é de 0,9 (ótimo) e o kit mantém-se estável por pelo menos 7 dias à 37°C, o que neste trabalho foi equivalente a pelo menos um ano na sua condição ideal de armazenamento de 2 a 8°C. Além disso, o kit apresentou 100% de sensibilidade, $\geq 99\%$ de especificidade, com coeficiente de variação $\leq 15,2\%$ tanto na repetitividade como na reprodutibilidade de amostras positivas. Quanto à análise de interferentes, amostras hemolisadas e a presença de fator reumatóide podem interferir nos resultados e anticorpos anti-*Leishmania* na amostra podem dar reação cruzada. Conclui-se que o procedimento elaborado e o kit desenvolvido e validado atenderam aos requisitos pré-estabelecidos, de acordo com as regras de BPF vigentes.

Palavras-chave: BPF em imunodiagnóstico, validação em imunodiagnóstico, produção de imunodiagnóstico, doença de Chagas.

ABSTRACT

MENEGHISSE, C.S. **Good Manufacturing Practices and the Validation Process in the Development and Production of an Immunodiagnostic kit.** 2007. 157p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The production of an *in vitro* diagnostic kit should be done following current Good Manufacturing Practices (GMP). The objective of this work was to establish a procedure for the development, production and validation of an *in vitro* diagnostic product in accordance with current regulations governing Medical Devices. An enzyme-linked immunoassay kit for Chagas' disease was used as a model. Validation is a very important step contained within GMP requirements. Validation provides documented evidence that processes and product batches are consistent, it aids in the establishment of production and quality control procedures, evaluate deviations and identify possible mistakes, evaluate the performance and medical usefulness of the product based on the obtained results, and establish ideal conditions of use and storage. In order to establish validation requirements for product development, it is necessary to consider the characteristics of the assay method, the clinical and diagnostic usefulness of the results and the conditions of use of the kit. The parameters for validation should be defined considering the purpose of the use of the product. In the case of this Chagas assay, results obtained in three pilot lots demonstrated that the kit could be used with both serum and plasma, samples could be frozen and thawed before use for up to 5 cycles. The agreement index when compared with a commercially licensed kit is 0,9 (optimum correlation). The kit remained stable for at least 7 days at 37°C, which is equivalent to at least one year stability in its ideal storage condition of 2 to 8°C. The kit presented 100% sensitivity and ≥99% specificity, with variation coefficient of ≤15,2% for both repeatability and reproducibility of the positive samples. Interference analysis indicated that: hemolyzed samples and the presence of reumathoid factor could interfere with test results. Antibodies anti-*Leishmania* in the test sample can cross react with *T. cruzi* proteins. In conclusion: the established procedure for development and validation of chagas kit, and the actual developed and validated kit are in accordance with pre-established current GMP requirements.

Keywords: GMP in immunodiagnostic, validation in immunodiagnostic, Production of Immunodiagnostic kit, Chagas' disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da Vigilância Sanitária

No Brasil, o Ministério da Saúde, diretamente ou através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), rege a legislação sobre Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF) e Boas Práticas de Distribuição e Armazenamento. Essa legislação é publicada em Diário Oficial e pode sofrer alterações ou complementações sempre que necessário. Além desta legislação, existem também normas específicas relacionadas aos produtos para diagnóstico *in vitro*, publicadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Para uma melhor compreensão do sistema atual da área de saúde no Brasil, é preciso conhecer um pouco da história da saúde no Brasil e no mundo, que será descrita a seguir baseada nas informações obtidas no curso e na apostila de Treinamento e Avaliação de Serviços, Licenciamento Sanitário e Acreditação - TALSA Multiplicadores (GASTAL, ROESSLER e COSTA, 2004).

A criação de um órgão fiscalizador de saúde surge quando o governo percebe que muitos problemas de saúde pública eram causados por falta de higiene da população e de saneamento básico. Além disso, muitas doenças eram trazidas de fora pelos viajantes que chegavam ao Brasil de todos os lugares do mundo.

Na segunda metade do século XVIII, com a Revolução Industrial na Inglaterra, e conseqüente aumento de problemas de saúde, incluindo acidentes de trabalho, começa a surgir na Europa um movimento sanitarista, com programas de prevenção e saneamento para controle de doenças. Surge, então, na Alemanha, a Polícia Médica, que era responsável pelas normas de conduta em defesa da Saúde Pública. Inicia-se a normatização e o controle sobre o exercício da Medicina, o funcionamento de hospitais, o saneamento ambiental e o comércio de alimentos.

No Brasil, em 1782, foi criada a Junta do Protomedicato, constituída por deputados com funções médicas de atendimento aos portugueses residentes no Brasil, porém com ênfase na fiscalização.

Em 1808, com a vinda da família real de Portugal, foi criada a primeira Organização Nacional de Saúde Pública no Brasil e em 1810 o cargo de Provedor-Mor da Saúde da Corte e do Estado do Brasil, com a função de controlar o serviço de saúde dos portos. Institui-se o controle dos alimentos, drogas e medicamentos;

a inspeção de abatedouros, açougues, mercados, boticas; a fiscalização do exercício profissional na área da saúde e os exames para licenciamento da atividade.

Em 1828, D. Pedro I extingue o cargo de Provedor-Mor da Saúde da Coroa e implanta um sistema de descentralização das atividades, através das Câmaras Municipais, que tinham a responsabilidade de fixar normas sanitárias, fiscalizar os hospitais, os portos e o comércio de medicamentos.

Em 1851, regulamenta-se a criação da Junta Central de Higiene Pública, subordinada ao Ministro dos Negócios do Império, que entre outras atividades, é responsável pelo controle da criação de novos estabelecimentos de saúde. Em 1881, esta Junta é substituída pela Inspetoria Geral de Saúde e Higiene Pública.

Em 1897, é criada a Diretoria Geral de Saúde Pública, subordinada ao Ministério da Justiça e Negócios Interiores, sendo substituída em 1920 pelo Departamento Nacional de Saúde Pública, que foi regulamentado pelo Decreto nº 16.300 de 31 de dezembro de 1923 (Regulamento Sanitário Federal). É neste regulamento que se incorpora a expressão Vigilância Sanitária.

Por volta de 1930 é criado o Ministério dos Negócios da Educação e Saúde Pública (MES), estruturado com dois departamentos: Departamento de Educação e Departamento de Saúde, que em 1934 passa a chamar-se Departamento Nacional de Saúde e Assistência Médico-Social.

A lei 1.920 de 25 de julho de 1953, cria o atual Ministério da Saúde, desmembrando o antigo Ministério da Educação e Saúde em dois.

Em 1954, cria-se o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos, que em 1961 amplia-se para alimentos (LCCDMA).

Em 1963, regulamenta-se o Código Nacional de Saúde. O instrumento "Credenciamento de Hospitais para Convênio com o Instituto de Previdência dos Comerciantes" é a primeira tentativa de avaliação abrangendo área física, equipamentos e organização dos estabelecimentos de saúde.

Em 1971, é criada a Central de Medicamentos (CEME) que regula a produção e distribuição de medicamentos, e estabelece a farmacovigilância.

Em 1973, a lei 5.991/73 revoga as disposições anteriores sobre drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e **correlatos**, atingindo todas as instâncias desde a produção até o consumo, criando mecanismos de controle de qualidade.

Em 1976, a lei nº 6.360/76, Lei da Vigilância Sanitária, estrutura a Vigilância como atividade permanente fundamentada no controle de qualidade dos produtos utilizados na área da saúde e higiene. Esta lei dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Ela foi regulamentada pelo decreto nº 79.094/77 (Lei 6.360, 1976).

O decreto nº 79.056/76 dá nova estrutura ao Ministério da Saúde, na qual se cria a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (Decreto 79.056, 1976).

Em 1985, O Ministério da Saúde define a Vigilância Sanitária como "conjunto de medidas que visam a elaborar, controlar a aplicação e fiscalizar o cumprimento de normas e padrões de interesse sanitário relativos a portos, aeroportos e fronteiras, medicamentos, cosméticos, alimentos, saneantes e bens, respeitada a legislação pertinente, bem como o exercício profissional relacionado à saúde". A lei nº 7.347/85, disciplina a ação civil pública de responsabilidade por danos ao meio ambiente e ao consumidor.

Em 11 de setembro de 1990, é publicada a Lei 8.078, mais conhecida como Lei de Defesa do Consumidor. O seu artigo 8º preconiza que "Os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão riscos à saúde ou segurança dos consumidores, exceto os consumidores normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a dar as informações necessárias e adequadas a seu respeito. Parágrafo único: Em se tratando de produto industrial, ao fabricante cabe prestar as informações a que se refere este artigo, através de impressos apropriados que devam acompanhar o produto".

Logo em seguida, em 19 de setembro de 1990, o Congresso Nacional aprova a Lei Orgânica da Saúde, de nº 8.080, que organiza e detalha o funcionamento do Sistema, e define a Vigilância Sanitária.

A partir da promulgação da constituição atual e a Lei Orgânica da Saúde, a Vigilância Sanitária ficou definida como uma das ações do Sistema Único de Saúde (SUS) com o seguinte texto: "um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde".

Desta forma, a Vigilância Sanitária passou a ter uma abrangência maior, mais adequada às funções de um Estado atual, com um caráter preponderantemente preventivo, não limitada apenas à circulação de mercadorias e pessoas.

Em 1994, o Ministério da Saúde lança o "Programa de Qualidade" que estabelece a Comissão Nacional de Qualidade e Produtividade em Saúde, que além das entidades envolvidas com o atendimento à saúde contavam com a participação dos consumidores.

Em 1996 é publicada a Portaria nº 8/MS/SVS que dispõe sobre o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* na Secretaria de Vigilância Sanitária. A Portaria nº 8 lista os documentos necessários para o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*. Antes de um produto para diagnóstico de uso *in vitro* ser colocado no mercado, este precisa ser registrado junto ao órgão de Saúde competente no país de fabricação (Portaria nº 8, 1996). Atualmente no Brasil este órgão é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A ANVISA foi criada em 27 de janeiro de 1999, através da lei nº 9.782 e passou a substituir a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Sua finalidade institucional é a de "promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras". A missão da ANVISA é "*Proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso*" (Lei nº 9.782, 1999).

Na 28ª Assembléia Mundial de Saúde, em 1975, foi aprovado o "Guia de Boas Práticas de Fabricação para Indústrias Farmacêuticas", mas só vinte anos mais tarde, em 1995, o mesmo foi publicado no Brasil na forma de Portaria (Portaria nº 16 de 06 de março de 1995). Três anos depois, foi publicada a Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998, que determina a todos os estabelecimentos que fabriquem produtos para diagnóstico de uso *in vitro*, o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelas "Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro*" (Portaria 686, 1998).

Em 2000, foi publicada a Resolução RDC nº 59, de 27 de junho de 2000, que determina a todos fornecedores de produtos médicos, o cumprimento dos

requisitos estabelecidos pelas "Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos" (Resolução – RDC nº 59, 2000).

Em 2006, foi publicada a resolução RDC nº 206, que estabelece o regulamento técnico de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, com suas alterações, revalidações e cancelamento. Esta resolução revoga a Portaria nº 8/MS/SVS de 1996 (RDC nº 206, 2006).

Pode-se notar que, a regulamentação brasileira sobre Boas Práticas de Fabricação e Registro de Produtos Diagnóstico é ainda muito recente. É, portanto, ainda pouco explorada e sua aplicação limitada.

1.2. A doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, e constitui-se em uma das endemias mais importantes da América Latina, afetando mais de 18 milhões de indivíduos. A doença recebeu esse nome após a descoberta do parasito por Carlos Chagas em 1909 (MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002; MANNING-CELA *et al*, 2001; RODRIGUEZ, 2001).

Baseado em estudos de campo realizados no decorrer de várias décadas, estimou-se que 30% da população humana infectada pelo *Trypanosoma cruzi* irá desenvolver a doença clínica, com letalidade estimada de 0,56% (TEIXEIRA, NASCIMENTO e STURM, 2006).

A doença pode ser transmitida por meio das fezes contaminadas com *T. cruzi* de um inseto hematófago pertencente à subfamília *Triatominae* (barbeiro). Durante a sucção de sangue, o inseto defeca no local da picada, e a inoculação do parasito ocorre quando o hospedeiro coça a pele, ou leva a mão contaminada aos olhos. Outras formas de transmissão que também podem ocorrer são: transfusões sanguíneas, infecções congênitas através de mães infectadas, aleitamento materno, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais pela manipulação de sangue contaminado e ingestão de alimentos contaminados por vetores ou fezes de vetores parasitados (MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002).

Durante o ciclo de vida, o parasito *T. cruzi* assume diferentes formas de desenvolvimento, alternando os hospedeiros para várias formas do ciclo de vida, entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. No momento da picada, as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto infectam o hospedeiro vertebrado, e invadem as suas células onde se transformam em amastigotas, que se multiplicam dentro das mesmas. As formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas quando há a ruptura da célula. As formas tripomastigotas sanguíneas liberadas podem infectar novas células, ou permanecer na corrente sanguínea, infectando o inseto no momento da picada. No

estômago do inseto, a forma tripomastigota sanguínea evolui para duas formas replicativas, epimastigotas e esferomastigotas, que proliferam, e quando alcançam o reto, se diferenciam na forma infectante tripomastigota metacíclica, completando o ciclo de vida. (LANA e TAFURI, 2005; MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002; DI NOIA *et al*, 2002; CONTRERAS *et al*, 2002; MANNING-CELA *et al*, 2001, HAYNES, RUSSELL e CROSS, 1996). As formas amastigotas intracelulares podem persistir dormentes no organismo do hospedeiro por décadas, escondidas em células de músculos, sem causar danos significativos aos tecidos (TEIXEIRA, NASCIMENTO e STURM, 2006).

Figura 1: Doença de Chagas: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*
http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Chagas_ciclo_de_doença.JPG, data de acesso 28/03/07.

Após a infecção, o período de incubação é de 1-2 semanas, e a doença é manifestada primeiramente por uma fase aguda curta caracterizada por uma elevada parasitemia (MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002). A fase aguda da doença é na maioria das vezes assintomática, exceto em crianças muito pequenas, que podem desenvolver miocardite e meningoencefalite, sendo a última fatal em 50% dos casos (CORRAL *et al*, 1996). Em casos sintomáticos e em indivíduos infectados pela picada de triatomíneos, a fase aguda pode apresentar o sinal de Romaña característico (edema unilateral dos olhos, pálpebras e glândulas lacrimais) e o chagoma de inoculação (inchaço característico no local de inoculação), que aparecem após 4 a 10 dias do contato com o vetor (LANA e TAFURI, 2005; FERREIRA e ÁVILA, 2001). O primeiro sintoma observado no paciente infectado é a febre, que pode permanecer por muitas semanas, acompanhada por taquipnéia e taquicardia. Outras manifestações clínicas tais como hepato e esplenomegalia, linfadenopatia, náuseas, vômitos, diarréias, anorexia, irritação de meninges e edema subcutâneo também estão eventualmente presentes. Também podem ocorrer: dilatação, deficiência cardíaca e várias formas de arritmia. Estudos mostraram que estes sintomas de fase aguda permanecem por cerca de dois meses (algumas vezes, 4 meses), desaparecendo mesmo na ausência de tratamento específico (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Após a fase aguda, a infecção progride para uma longa fase crônica assintomática, que pode durar décadas (10 a 30 anos) ou até mesmo toda a vida do hospedeiro. Essa fase é chamada de forma inaparente, indeterminada (latente) ou sub-clínica. É nesta fase de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito, que o sistema imunológico do paciente apresenta intensa resposta imune celular e humoral. Existe uma diminuição de parasitos na circulação do hospedeiro. O paciente não apresenta alterações patológicas significativas. O diagnóstico clínico é difícil, pois os pacientes podem ser assintomáticos, mesmo que os testes sorológicos e parasitológicos sejam geralmente positivos. (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Após a fase latente, a infecção pode progredir para um estágio crônico sintomático, no qual os parasitos são raramente encontrados, e ocorrem danos progressivos e irreversíveis de alguns órgãos, especialmente coração, esôfago e cólon, que são responsáveis pelas formas cardíaca e digestiva da doença. A forma

cardíaca é caracterizada por uma miocardite crônica, que geralmente leva a uma cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e arritmias. Na forma digestiva da doença, a dilatação do esôfago ou cólon (megaesôfago e megacolon, respectivamente) pode ser observada em estágios avançados (PERONE *et al*, 2003; MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002; FERREIRA e ÁVILA, 2001). No Brasil, a forma assintomática ou indeterminada é a mais comum (60-70%), seguida pelas formas cardíaca (20%-40%) e digestiva (7-11%). A forma cardio-digestiva é a mais rara (MACEDO, OLIVEIRA e PENA, 2002).

Após a transmissão do parasito *T. cruzi*, a doença de Chagas progride com a produção cronológica de classes específicas de anticorpos durante o desenvolvimento da infecção. Anticorpos da classe IgM aparecem primeiramente como característica da fase aguda da doença (SILVEIRA, UMEZAWA e LUQUETTI, 2001; UMEZAWA e SILVEIRA, 1999). Os anticorpos da classe IgG, presentes na fase aguda, acompanham a infecção pelo resto da vida (UMEZAWA e SILVEIRA, 1999).

1.2.1. Imunidade na doença de Chagas

A infecção por *T. cruzi* mobiliza vários mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida. Em consequência, o parasito passa a ser continuamente combatido, tendo sua multiplicação reduzida. Entretanto ele persiste indefinidamente no hospedeiro, assim como a resposta imune. Assim, lesões teciduais resultantes desta atividade imunológica prolongada acumulam-se, podendo desencadear as diversas formas clínicas da doença (LANA e TAFURI, 2005).

Aparentemente a imunidade humoral exerce um papel fundamental no controle da infecção. No primeiro estágio da doença é observada uma grande mobilização do sistema imune com o objetivo de conter o parasito e os danos da infecção. O parasito promove a ativação inespecífica de macrófagos e células *natural killer* (imunidade celular) acompanhado de ativação de linfócitos T e B, resultando numa produção de imunoglobulinas (imunidade humoral) (LANA e TAFURI, 2005).

Com relação à imunidade humoral, tem sido bem documentado em diversos modelos experimentais e em humanos, que o surgimento de IgM e IgG são precoces (sete a 15 dias após a infecção) atingindo níveis elevados a partir da quinta semana de infecção coincidindo esta elevação com o aumento da parasitemia detectável ao exame a fresco. Alguns meses após a infecção (três ou mais) e depois da queda da parasitemia, os níveis de IgM diminuem progressivamente até desaparecerem. São raros os casos de IgM positiva durante a fase crônica da infecção. Por outro lado, anticorpos IgG aumentam e mantêm-se elevados por mais alguns meses e depois decrescem lentamente estabilizando-se em níveis variáveis de hospedeiro para hospedeiro, podendo ser facilmente detectáveis pelos testes sorológicos ao longo da infecção. Alguns estudos têm encontrado correlação entre a presença de altos níveis de IgM e cardiopatia chagásica crônica, níveis elevados de IgA e forma digestiva da doença e níveis elevados de IgE anti-*T. cruzi* em pacientes chagásicos com a forma cardíaca (LANA e TAFURI, 2005).

1.2.2. Diagnóstico da doença de Chagas

Clínico e epidemiológico

A origem do paciente, a presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e/ou Chagoma de inoculação) acompanhados de febre irregular ou ausente, adenopatia-satélite ou generalizada, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema generalizado ou dos pés fazem suspeitar de fase aguda de doença de Chagas. As alterações cardíacas acompanhadas de sinais de insuficiência cardíaca confirmadas pelo eletrocardiograma e as alterações digestivas e do esôfago e do cólon (reveladas pelos raios X) fazem suspeitar de fase crônica da doença. Entretanto, em ambos os casos, há necessidade de confirmação do diagnóstico por métodos laboratoriais (LANA e TAFURI, 2005).

Laboratorial

Os métodos de diagnóstico laboratorial apresentam diferentes resultados se aplicados na fase aguda ou crônica da infecção. Na fase aguda, observam-se: alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos (IgM e IgG) que podem estar em elevação. Nesta fase, recomenda-se: pesquisa direta e, se necessário, pesquisa indireta do parasito (LANA e TAFURI, 2005).

Na fase crônica, observam-se: baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG). Nesta fase, a presença de anticorpos IgM é discutida, só sendo detectada esporadicamente em baixos títulos. Recomendam-se métodos sorológicos (imunofluorescência indireta, ELISA, hemaglutinação indireta ou fixação de complemento) ou a pesquisa do parasito por métodos indiretos (xenodiagnóstico, hemocultura ou inoculação em animais de laboratório). Estes métodos de diagnóstico parasitológicos tornam-se especialmente necessários quando a sorologia é duvidosa ou quando se deseja verificar a eficácia de tratamento. A seguir, serão exemplificadas algumas técnicas mais empregadas (LANA e TAFURI, 2005).

Fase Aguda

Exames Parasitológicos

Exame de sangue a fresco com gota de sangue colocada entre lâmina e lamínula (LANA e TAFURI, 2005).

Exame de sangue em gota espessa. Este método tem mais chances de detectar o parasito do que o método anterior, por concentrar maior quantidade de sangue em um mesmo espaço (LANA e TAFURI, 2005).

Esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. Este método oferece vantagem por permitir observar a morfologia do parasito, mas só será possível em casos de parasitemia muito elevada (LANA e TAFURI, 2005).

Quantitative Buffy Coat (QBC®-Method). Este método é uma variável do exame de sangue a fresco entre lâmina e lamínula e tem sido aplicado com sucesso

na pesquisa de tripanossomas, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo. (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Cultura de sangue, em meios próprios como LIT ou NNN (LANA e TAFURI, 2005).

Inoculação do sangue (ou creme leucocitário) em camundongos: é feito em camundongos jovens, preferencialmente de linhagens isogênicas, muito susceptíveis à infecção. O creme leucocitário consiste na camada de leucócitos que se encontra na interface entre o plasma e a camada de hemácias após centrifugação do sangue colhido com anticoagulante. Nele podem ser encontrados parasitos (LANA e TAFURI, 2005).

Métodos de concentração. Entre os métodos de concentração, o que tem dado melhores resultados, é o método de *Strout*. Consiste basicamente em deixar o sangue coagular e retraindo o coágulo. Os parasitos são liberados do coágulo à medida que este se retrai, concentrando-se no soro, que pode ser centrifugado para exame do sedimento ou inoculação em animais de laboratório (LANA e TAFURI, 2005).

O xenodiagnóstico e a hemocultura são métodos muito sensíveis e detectam o parasito tanto na fase aguda como na crônica. Na fase aguda, o xenodiagnóstico pode chegar a 100% de positividade. Estas técnicas não são normalmente indicadas, uma vez que nestes métodos os exames e obtenção dos resultados ocorrem após 30 dias. Qualquer um dos métodos citados, mas principalmente os três primeiros, são também empregados para o diagnóstico de transmissão congênita e transfusional (LANA e TAFURI, 2005).

Exames Sorológicos

Reação de precipitação ou precipitina. Das reações sorológicas esta foi, no passado, a mais indicada na fase aguda, pois apresenta cerca de 95% de sensibilidade a partir do sétimo dia de infecção. É uma reação específica, de execução simples e realizada em tubo capilar, com antígeno homólogo (polissacarídeos de formas de cultura do *T. cruzi*). Forma-se um precipitado na interface do antígeno, com o soro, conseqüente da reação antígeno-anticorpo. Esta técnica encontra-se em desuso e seu emprego não tem sido recomendado (LANA e TAFURI, 2005).

Reação de imunofluorescência indireta (IFI). Apresenta alta sensibilidade a partir do 15º dia de infecção, detectando anticorpos da classe IgM, que raramente ocorrem na fase crônica da doença, mas que são constantes na fase aguda, com títulos elevados. Desta forma, a IFI é uma reação sorológica útil para o diagnóstico da fase aguda da doença de Chagas (LANA e TAFURI, 2005).

Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Esta técnica também detecta classes específicas de anticorpos e, portanto, é indicada para o diagnóstico de fase aguda da doença, utilizando-se conjugado anti-IgM (LANA e TAFURI, 2005).

Os testes IFI e ELISA para anticorpos IgG são, atualmente considerados os mais sensíveis para a identificação de infectados. Devido à sua praticidade, possibilidade de automação e objetividade de leitura, o ELISA é teste recomendado para a doença de Chagas em doadores de sangue de acordo com a RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, da ANVISA.

Fase Crônica

Exames Parasitológicos

Xenodiagnóstico

É o método de diagnóstico indireto de escolha quando se quer detectar o parasito na fase crônica da doença. O xenodiagnóstico pode ser natural, conforme instruções detalhadas em seguida, ou artificial (LANA e TAFURI, 2005).

Em geral, realiza-se nos pacientes o xenodiagnóstico natural, colocando-se os triatomíneos para sugar o braço do paciente. O xenodiagnóstico artificial é indicado quando o paciente é sensível à picada de barbeiros ou quando se deseja fazer estudos com triatomíneos e o parasito fora do hospedeiro (LANA e TAFURI, 2005). Nesta técnica, as ninfas de barbeiro sugam o sangue do paciente, colhido e acondicionado em um tubo artificial, por meio de película de borracha.

Para que o xenodiagnóstico dê bons resultados, há necessidade de se empregar espécies de triatomíneos bem adaptados às cepas locais do *T. cruzi*. Em geral, as espécies de barbeiros que apresentam melhor susceptibilidade são: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *T. braziliensis* e *T. pseudomaculata*

(LANA e TAFURI, 2005). Vale lembrar também que a sensibilidade neste teste depende de quantas vezes o mesmo é realizado.

Hemocultura

Este método, quando realizado em paralelo com o xenodiagnóstico, pode apresentar maior sensibilidade, dependendo da técnica utilizada. Algumas mudanças desta técnica elevaram sua sensibilidade até 55% (na fase crônica), superior ao xenodiagnóstico, realizado em paralelo com ninfas de *T. infestans*. São utilizados 30 mL de sangue heparinizado de cada paciente. O plasma é desprezado após centrifugação (3.000 rpm, 30 minutos) e o sedimento lavado com meio LIT para eliminar possíveis anticorpos ainda presentes. O sedimento é distribuído em seis tubos de rosca contendo 6 mL de LIT. O material deve ser mantido a 28°C, homogeneizado a cada 48 horas e examinado quinzenalmente até 60 dias ou mais, se necessário. Pequenas modificações posteriores, como processamento do sangue imediatamente após coleta, cultivo por tempo mais prolongado (120 dias) e repetição da técnica por três vezes em um mesmo paciente, elevaram a taxa de sensibilidade para 94% (LANA e TAFURI, 2005).

A maior limitação da técnica de hemocultura é o longo tempo necessário para a obtenção do resultado e a necessidade de meio de cultura especial, feito somente em laboratórios de pesquisa especializados (LANA e TAFURI, 2005).

Exames Sorológicos

O diagnóstico sorológico evidencia a presença de anticorpos específicos no soro do paciente. O sangue pode ser colhido por punção venosa (e o soro conservado a -20°C, até processamento) ou em papel de filtro, seco à temperatura ambiente por 24 horas e depois guardado em geladeira ou em recipiente com sílica-gel. No caso de colheita em papel, o processamento da reação deve ser feito no prazo de até 30 dias para não haver queda do título de anticorpos. A seguir são descritas as técnicas mais importantes e rotineiramente utilizadas (LANA e TAFURI, 2005).

Reação de fixação de complemento (RFC) ou Guerreiro e Machado. Esta técnica sorológica é a mais antiga e durante muito tempo a mais rotineiramente

utilizada. Era feita com antígeno homólogo (extrato de cultura do parasito sob diferentes preparações). Devido a algumas dificuldades técnicas, como não-padronização do antígeno, necessidade de hemácias de carneiro frescas, ocorrência de resultados anticomplementares e discordância entre diferentes laboratórios, esta técnica caiu em desuso (LANA e TAFURI, 2005).

Reação de imunofluorescência indireta (IFI). É uma reação muito sensível e ainda utilizada. Consiste em fazer reagir sobre antígenos fixos em lâminas de microscópio, anticorpos do soro do paciente adicionados posteriormente do conjugado (anti-imunoglobulina marcada com substância fluorescente). A fluorescência pode ser visualizada por um microscópio de fluorescência, revelando a presença de anticorpos (LANA e TAFURI, 2005).

O uso de reagentes bem padronizados (conjugados e antígenos) permite uma alta confiabilidade dos resultados. Os antígenos são homólogos e preparados a partir de formas epimastigotas de cultura na fase exponencial de crescimento. A IFI, bem como a RHA e o ELISA, apresentam resultados falso-positivos em casos de leishmanioses. Nestes pacientes, as reações com antígenos homólogos de *Leishmania sp* costumam apresentar títulos mais elevados que as heterólogas com *T. cruzi*. É possível afastar estas reações cruzadas por processos simples de absorção seletiva, ou inibição de anticorpos de grupo. Por detectar classes específicas de anticorpos, a IFI é especialmente indicada para o diagnóstico de infecção aguda (natural, acidental ou transfusional) e transmissão congênita mediante a pesquisa no recém-nascido de IgM. Os anticorpos IgM não atravessam a placenta e, portanto, a sua presença no recém-nascido sugere transmissão vertical (LANA e TAFURI, 2005).

O teste de imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* tem sido considerado como **teste de referência** na sorologia da doença de Chagas. A pesquisa de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* tem valor significativo no diagnóstico da doença aguda. Em relação ao limiar de reatividade do teste, na triagem sorológica em bancos de sangue, tem sido recomendado 1:20 e 1:40. Em laboratórios clínicos normalmente o limiar de reatividade utilizado é 1:40, para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Reação de hemaglutinação indireta (RHA). É uma técnica muito simples e sensível (mais de 90%), muito utilizada para o diagnóstico de fase aguda e crônica.

O antígeno é obtido de formas de cultura do parasito por vários métodos de preparação. Consiste em fazer atuar, sobre hemácias sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi*, o soro do paciente. Na presença de anticorpos específicos, ocorre aglutinação. A reação pode ser feita em placas, com ou sem automatização, e a leitura dispensa qualquer aparelhagem (LANA e TAFURI, 2005).

Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Este é um método imunoenzimático cujo conjugado é marcado com uma enzima. A interação da enzima com o substrato adequado dá cor à reação, o que permite a leitura com espectrofotômetro adequado para leitura em placas. Por permitir a pesquisa de classes específicas de anticorpos, tem as mesmas aplicações da IFI. Esta técnica oferece vantagens em relação às demais técnicas sorológicas, por permitir a realização de um grande número de testes de uma só vez e uma completa automatização. Os resultados indicam ser esta técnica mais sensível que a IFI (LANA e TAFURI, 2005).

A técnica ELISA, utilizando como antígenos proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, poderá oferecer maior sensibilidade e especificidade com relação ao uso de antígeno homólogo total (LANA e TAFURI, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) recomenda que o diagnóstico sorológico da doença de Chagas seja realizado utilizando sempre dois testes sorológicos de princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas, em paralelo, para a obtenção de resultados mais confiáveis. No caso de resultados duvidosos, devem-se empregar outras técnicas e repetir as reações. Se dois métodos apresentarem resultados contraditórios, realizar um terceiro método de princípio diferente. Se permanecer a dúvida, realizar um quarto método de imunodiagnóstico e se ainda permanecer a dúvida realizar um método de diagnóstico não-imunológico (LANA e TAFURI, 2005).

O Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005) traz um fluxograma para realização de testes laboratoriais em fase crônica da doença de Chagas. O mesmo encontra-se na Figura 2.

Figura 2: Fluxograma para realização de testes laboratoriais para doença de Chagas na fase crônica

Fonte: Brasil, MS, SVS, Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005.

No caso de banco de sangue, alguns autores recomendam o uso de três técnicas de princípios diferentes para assegurar a detecção da maioria dos casos. Durante ou mesmo algum tempo após tratamento, o paciente pode apresentar testes sorológicos negativos, sem, contudo, significar cura da infecção (LANA e TAFURI, 2005). Entretanto, com a sensível melhora dos testes de ELISA para a determinação de IgG anti-*T. cruzi* oferecidos atualmente no mercado, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) recomenda a utilização de apenas um teste ELISA para a

triagem sorológica de doadores de sangue. Esta recomendação foi acatada no Brasil através da resolução RDC n° 153/04 – MS.

Existem ainda métodos sorológicos, denominados não-convencionais, só utilizados em laboratórios de pesquisa especializados. Entre eles podemos citar:

Lise mediada por complemento (LMCo). Esta técnica detecta anticorpos líticos capazes de agir sobre tripomastigotas vivos reconhecendo uma molécula de 360 kDa na membrana do parasito, lisando-os na presença de complemento humano. Há algumas evidências de que estes anticorpos seriam indicativos de infecção ativa no paciente, podendo ser esta técnica utilizada na avaliação de eficácia terapêutica (LANA e TAFURI, 2005).

Pesquisa de anticorpos anti-tripomastigotas vivos (AATV). Mais recentemente, uma nova técnica de imunofluorescência, alternativa à lise mediada por complemento, realizada em microplacas e empregando-se uma suspensão de tripomastigotas vivos foi padronizada com o objetivo de detectar os anticorpos líticos para monitorar a cura da infecção. Para a leitura dos resultados utiliza-se um aparelho de citometria de fluxo, onde se permite quantificar a presença de anticorpos presentes no soro do paciente capazes de se ligar a epítopos presentes na superfície de tripomastigotas vivos. Por esta razão estes anticorpos são também denominados anticorpos anti-tripomastigotas vivos (AATV) e são aparentemente associados à proteção. Esta técnica é de alta sensibilidade. Os testes tornam-se negativos após o tratamento, mais precocemente que a LMCo, antecipando assim a determinação da cura da infecção. Um dos fatores que dificultam a execução destas duas técnicas é a necessidade de uso de tripomastigotas vivos (LANA e TAFURI, 2005).

Foi descrito também um teste de Western Blot empregando antígenos excretados e secretados por formas tripomastigotas (TESA blot) coletados de sobrenadante de cultura de células contendo o *T. cruzi* nesta forma, obtendo alta especificidade e sensibilidade com soros de pacientes com infecção crônica, aguda e congênita, permitindo, desta forma, o diagnóstico diferencial entre a fase aguda e crônica (UMEZAWA *et al*, 1996b; ZARATE-BLADES *et al*, 2007).

Método Parasitológico Molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR). Consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de kDNA de *T. cruzi* presentes em amostras de sangue, soro ou tecidos do paciente infectado. Esta técnica é de alta sensibilidade, pois é capaz de detectar quantidades de DNA de uma única célula do parasito (LANA e TAFURI, 2005).

A partir do material obtido do paciente é feita uma extração do DNA. Este DNA é submetido então a PCR utilizando iniciadores (*primers*) complementares à sequência de interesse no kDNA alvo na presença da enzima *Taq* DNA polimerase e dNTPs. A amplificação do segmento de DNA ocorre em um aparelho termociclador. As cópias de DNA aumentam exponencialmente a cada ciclo da reação e podem posteriormente ser visualizadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (revelados por coloração com nitrato de prata) ou em gel de agarose, corados pelo brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta (LANA e TAFURI, 2005).

1.2.3. O antígeno *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* tem uma complexa superfície celular composta principalmente de glicoproteínas e glicolipídeos, e essa complexidade estrutural reflete em uma variedade de funções realizadas pela membrana do parasito, incluindo desde ataque e penetração da célula hospedeira até a resistência aos mecanismos de defesa tanto no intestino médio dos insetos quanto nas células do hospedeiro vertebrado (TAKLE, SNARY, 1992; apud FRADE, 2005).

O *T. cruzi* precisa sintetizar o ácido siálico (um monossacarídeo) derivado do hospedeiro e incorporá-lo. Para realizar essa internalização, o *T. cruzi* expressa a super família de glicoproteínas conhecidas como transialidase, enzimas capazes de catalizar a transferência do ácido siálico de glicoconjugados a moléculas “like” mucinas localizadas na membrana de superfície dos parasitos, podendo agir também como ligantes de superfície celular. A importância desse processo é indicada pelo fato do *T. cruzi* ter centenas de genes codificando as transialidases, transialidases “like” mucinas e mucinas como proteínas (FRASCH, 2000; apud FRADE, 2005).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* secretam e/ou excretam uma variedade de moléculas de membrana espontaneamente no meio em que vivem durante o curso da infecção, através de um mecanismo conhecido como “shedding”, funcionando como escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro (SCHMUNIS *et al*, 1998). Muitas dessas moléculas excretadas e/ou secretadas apresentam grande atividade antigênica, (revisões de Colli e Alves, 1999; Acosta-Serrano, 2001; Schenckman *et al*, 1994; e Frasc, 2000; apud FRADE, 2005). O resumo dos antígenos expressos em diferentes fases evolutivas do parasito e suas funções está apresentado na Tabela 1 (FRADE, 2005).

Tabela 1: Antígenos expressos por *T. cruzi*

Fonte: adaptada de FRADE, 2005

Família	Antígeno	Tamanho (kDa)	Função identificada	Forma	Referência (apud FRADE, AF, 2005)
Transialidase	TS	120-200	Atividade transialidase	Ts/Tm	Schenckman et al, 1994; Cazzulo, 1992
	Tsi	120-200	Ligação à β -galactose	Ts/Tm	Cremona et al, 1995; 1999
	gp82	82	Ligante de superfície celular	Ts/Tm	Yoshida et al, 1997
	gp85	85	Catalisa transferência do ácido siálico	Ts/Tm	Schenckman et al, 1991; Pollewick et al, 1991.
	Tse	85	Atividade transialidase	Epimastigota	Briones et al, 1995
Transialidase "like"	Tc-85	85	Adesão celular, invasão celular, ligante à laminina	Ts/Tm Amastigota	Wizel et al, 1997; Millar et al, 1999; Giordano et al, 1999; Magdesian et al, 2001
	FI/CEA/CRP	160	Regulação do complemento	Ts/Tm	Jazin et al, 1995; Noris, 1997; Weston et al, 1999.
	Tc-13	85	Domínio n-terminal não repetitivo/ domínio C-terminal repetitivo de 5 aa	Ts/Tm	Camaptella et al 1992
Mucin "like"	Tc-Muc	35-50	Interação célula-célula, proteção sup. Cel	Epimastigota Tm	Kelm; Schauer, 1997; Varki, 1997.
	Tc-Muc	80-200	Invasão celular, Produção de NO e citocinas	Ts	Almeida et al, 1994; Schenckman, 1991; Yoshida et al, 1997
Exoantígenos	T-DAF	87-93	Resistência das tripomastigotas ao complemento	TS	Joiner et al, 1998.
	FL-160	160	Teoria auto imune	Flagelo / Ts	Voorhis, Eisen, 1989
	CEA	160	... Fase crônica	Ts	Jazin et al, 1991.
	SAPA	130-200	... Fase aguda e crônica	Sobrenadante de cultura	Affranchino et al, 1989
	TESA	150-160	... Fase aguda e crônica	Sobrenadante de cultura	Umezawa et al, 1996.

Abreviaturas: Ts – Tripomastigota sanguínea, Tm – Tripomastigota metacíclica, TS – Transialidase, Tsi – Transialidase inativa, Tse – epimastigota, FL – proteína associada ao flagelo, CEA – exoantígeno da fase crônica, CRP – proteína regulatória do complemento, gp – Glicoproteína, Tc muc – mucina associada ao *T. cruzi*, SAPA – antígeno secretado da fase aguda, TESA – antígeno secretado e excretado do *Trypanosoma*.

Vários antígenos recombinantes relevantes para o sorodiagnóstico da doença de Chagas têm sido isolados por diversos laboratórios (SILVEIRA, UMEZAWA e LUQUETTI, 2001). A Tabela 2 traz um resumo de alguns destes antígenos.

Tabela 2: Proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos de *Trypanosoma cruzi* com potencial uso clínico e epidemiológico

Fonte: adaptada de SILVEIRA UMEZAWA e LUQUETTI, 2001

Antígeno ^a	Proteína nativa ^b (kDa)	Observações	Diagnóstico/uso
CRA	225	Antígeno citoplasmático	Infecções crônicas
Ag30	180-225		
JL8	>170		
TCR27	150-200		
FRA	>300	Proteína associada ao citoesqueleto	Infecções crônicas
Ag1	205		
JL7	>170		
H49	>300		
B13	116-140	Proteína de superfície de tripomastigota	Infecções crônicas
Ag2	85		
TCR39	82		
PEP-2	...		
Ag36	85	Proteína associada ao microtubo	Infecções agudas e crônicas
JL9	110		
MAP	...		
SAPA	105-205		
TCNA	...	Trans-sialidases (família TS)	Infecções agudas e congênitas
TS	...		
Ag13	85		
TcD	260		Infecções agudas e crônicas
B12	200-230		
TcE	35	Proteína ribossomal	Infecções crônicas
JL5	38	Proteína ribossomal	Formas clínicas cardíacas
A13	230		Infecções agudas e crônicas
FCaBP	24	Proteína flagelar de ligação do Ca ²⁺	Infecções crônicas monitorando a cura
1F8	24		
Tc-24	24		
Tc-28	28		
Tc-40	38-100		Infecções crônicas
cy-hsp70	70	Proteínas de heat shock	Infecções crônicas monitorando a cura
Mt-hsp70	70		
grp-hsp78	78		
FL-160	160	Proteína de superfície associada ao flagelo (família TS-like)	Infecções crônicas monitorando a cura
CEA	...		
CRP	...		
SA85-1.1	85	Proteína de superfície de tripomastigota (família TS-like)	Infecções crônicas
Ubiquitina	...		

Abreviaturas: **CEA**: exoantígeno crônico de 160 kDa, **CRA**: antígeno repetitivo citoplasmático, **CRP**: proteína regulatória complementar de 160 kDa, **cy-hsp70**: proteína heat shock citoplasmática de 70 kDa, **FCaBP**: proteína flagelar de ligação do Ca²⁺, **FL-160**: proteína de superfície flagelar de 160 kDa, **FRA**: antígeno flagelar repetitivo, **grp-hsp78**: proteína heat shock do retículo endoplasmático de 78 kDa, **MAP**: proteína associada ao microtúbulo, **mt-hsp70**: proteína heat shock mitocondrial de 70 kDa, **SAPA**: antígeno shed de fase aguda, **SA-85-1.1**: proteína de superfície de 85 kDa, **TCNA**: neuraminidase de *Trypanosoma cruzi*, **TS**: trans-sialidase.

^a Vários nomes diferentes foram dados para peptídeos idênticos ou semelhantes e eles foram agrupados aqui.

^b Os tamanhos de algumas proteínas nativas podem diferir entre diferentes cepas ou isolados de *T. cruzi*.

A importância da doença de Chagas no meio urbano está vinculada à transmissão transfusional. A detecção de anticorpos na seleção de doadores está bem estabelecida. Embora a literatura mostre que o Brasil está entre os países que mais pesquisam a doença de Chagas, ainda são as empresas multinacionais estrangeiras as principais responsáveis pela produção de kits diagnósticos.

A tecnologia ELISA está bastante divulgada, mas as Boas Práticas de Fabricação na área diagnóstica ainda são pouco usuais no Brasil. Por outro lado, a legislação estabelece requisitos, mas nem sempre torna claro o “modus faciendi”.

Portanto, é de extrema importância o empenho para o desenvolvimento de kits de produção nacional para atender as necessidades de mercado e estabelecer os protocolos para todas as etapas necessárias: desenvolvimento, produção, validação, registro e controle de qualidade prospectivo.

A área de medicamentos traz amplos estudos e legislação específica tanto na parte de validação do processo produtivo, quanto boas práticas de fabricação. Os kits para diagnóstico *in vitro* são considerados correlatos e por se tratar de uma área mais nova que a área de medicamentos ainda temos falta de literatura pertinente específica a esta área. Além disso, a pouca legislação existente é nova e deve ser estudada e interpretada, especialmente para kits diagnósticos. Isto traz dificuldades às empresas brasileiras e às universidades que tem interesse em atuar na produção de kits para diagnóstico *in vitro*.

Um guia ou um protocolo prático que resume, dentro da legislação vigente, os parágrafos tocantes ao propósito de fabricação e validação não está disponível nas várias buscas realizadas para o desenvolvimento desse trabalho. O esclarecimento de parágrafos pouco precisos é, às vezes, obtido nas legislações estrangeiras.

Por isto, há a necessidade de analisar toda legislação pertinente, tanto nacional, como internacional, e estabelecer procedimentos e protocolos para elaborar um trabalho que irá servir como modelo para os interessados na fabricação de imunoreagentes. Neste aspecto, esta tese é inédita, pois obras completas sobre desenvolvimento e validação de imunoensaios são inexistentes no Brasil e pode servir de modelo à produção de outros imunoensaios.

2. OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um produto de fabricação nacional para o diagnóstico sorológico, adotando como modelo um kit ELISA para doença de Chagas, obedecendo-se as Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos de Validação em todas as etapas de desenvolvimento, produção, validação e registro do produto, para uso em triagem sorológica e diagnóstico laboratorial.

Específicos

a – Interpretar a legislação brasileira existente de Boas Práticas de Fabricação, Validação e Registro de produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e compará-la à legislação internacional.

b – Elaborar um modelo de procedimento para descrever desde a concepção da idéia de um novo produto, passando pelas etapas de desenvolvimento, produção de lotes piloto, validação e registro junto à ANVISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Devido à quantidade de resultados apresentados o item material e métodos irá apenas citar o procedimento feito, sem detalhes. Parte do material e métodos está apresentada em conjunto com os resultados, para facilitar o raciocínio e interpretação dos resultados.

A parte experimental do trabalho foi desenvolvida na REM Indústria e Comércio Ltda, que tem todas as licenças e autorizações de Vigilância Sanitária, ANVISA, Conselho Regional de Farmácia, Certificação de Boas Práticas de Fabricação e Certificação ISO 9000.

3.1. Análise da legislação

A busca de literatura e legislação sobre boas práticas de fabricação, registro e validação de produtos para diagnóstico *in vitro* foi feita utilizando-se os sites de busca disponíveis na Internet (rede mundial de computadores). Foram utilizados também livros, revistas científicas e informações de cursos e treinamentos na área, além de consulta a pessoas e órgãos de saúde.

3.2. Elaboração de modelo de procedimentos

Os procedimentos foram elaborados com base na legislação brasileira existente atualmente para boas práticas de fabricação, a saber, Portaria 686/98 e Resolução 59/00. Além disso, foram utilizadas também as normas da ABNT e ISO 9001.

3.2.1. Concepção

3.2.1.1. Como foi feito o desenvolvimento do novo produto

O desenvolvimento de reagentes imunodiagnósticos se inicia com um projeto, onde são definidas todas as características que se deseja para o novo reagente e as etapas necessárias para o seu desenvolvimento. A seguir, em uma etapa de pesquisa científica, estudou-se a metodologia, os antígenos e/ou anticorpos a serem utilizados e seu suporte (microplacas) e os parâmetros mínimos necessários para aquele reagente (sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, etc.). O

desenvolvimento foi feito pensando-se na produção em grande escala e no cumprimento das Boas Práticas de Fabricação. Durante o desenvolvimento foi feita a validação do produto e do processo (MENEGHISSE, 2007).

No desenvolvimento do produto testamos na prática, as etapas definidas no projeto. Aqui foram definidas as quantidades a serem acrescentadas de cada matéria prima, a ordem de adição das mesmas, os tempos de agitação ou incubação, aquecimentos, resfriamentos, os equipamentos utilizados, etc. Iniciou-se o desenvolvimento fazendo-se pequenas quantidades de cada solução envolvida na produção e, depois dos ajustes necessários, partiu-se para maiores escalas, para verificar se as características do produto se mantinham. Durante a validação foi avaliado se as etapas acima definidas eram reprodutíveis e se atendiam as especificações do produto (MENEGHISSE, 2007).

As produções foram acompanhadas por Protocolos de Produção, onde foram registrados os lotes e quantidades das matérias primas utilizadas. Os controles de qualidade realizados durante a produção e/ou no produto final, também foram registrados. Além disso, os protocolos de produção e controle de qualidade foram conferidos e revisados por pessoa autorizada. Tudo isto faz parte do Registro Histórico do Produto, ou seja, arquivos que mantêm os registros e resultados das produções e controles de qualidade de cada lote produzido.

Foram também definidos os equipamentos (agitadores, pHmetro, centrífuga, etc.), os Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como luvas, avental, máscara, etc. e os Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC), como capelas, exaustores, etc. a serem utilizados na produção.

3.2.1.2. Desenho do kit Proposto

O primeiro passo para este desenvolvimento foi definir as características do kit e seus componentes. O formato do kit é um ELISA indireto. Foi levado em consideração que o kit seria usado para triagem sorológica de doadores de sangue, portanto, deveria ter 100% de sensibilidade, e pelo menos 99% de especificidade.

Decidiu-se utilizar uma mistura de lisado do parasito e antígeno recombinante na fase sólida, pois, de acordo com a literatura, os kits apenas com antígenos recombinantes não apresentam 100% de sensibilidade. Foi escolhida a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* por ser a de maior prevalência na América Latina. Foi decidido também cultivar a cepa na própria REM, assim como extrair e purificar os antígenos lisados. A produção local do antígeno cria uma independência para a empresa fabricante do kit que não depende de terceiros para preparação da fase sólida. O antígeno recombinante foi adquirido pronto para uso.

Ainda para aumentar a sensibilidade do kit de modo que fosse detectada também a fase aguda da doença, decidiu-se utilizar um conjugado para detecção de anticorpos IgG e IgM humana. A enzima escolhida para marcação do conjugado foi a peroxidase, por permitir a possibilidade de uso de substrato/cromógeno pronto para uso. Usando a peroxidase como enzima pudemos usar a tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno, que é fornecido pronto para uso, na forma líquida. O comprimento de onda de leitura do TMB é 450 nm, filtro presente na maioria das leitoras de microplacas existentes no mercado.

Todos os componentes do kit são fornecidos prontos para uso, exceto a solução de lavagem (20X concentrada), o que facilita a execução do teste e a automação do ensaio.

O diluente de amostra tem um indicador de cor, para confirmar a pipetagem das amostras. Após a adição das amostras o diluente, inicialmente verde, muda de cor para azul. A diluição das amostras pode ser feita na própria microplaca sensibilizada, evitando assim uma etapa de pré-diluição, em tubos, antes da adição da amostra na fase sólida.

Os controles negativo e positivo do kit são coloridos, cada um de uma cor diferente e são acondicionados em microtubos com tampas da cor do respectivo

controle. Estas medidas facilitam a identificação dos controles pelo usuário final e evitam enganos na pipetagem dos mesmos.

O ensaio tem 3 incubações, duas de 30 minutos e uma de 15 minutos, tornando o teste relativamente rápido.

As características acima foram desenvolvidas em etapas, desde a escolha das matérias primas que foram utilizadas no desenvolvimento e a qualificação dos fornecedores de cada uma delas, até a produção de um kit protótipo.

3.2.2. Desenvolvimento do kit ELISA Chagas

O desenvolvimento foi feito em etapas, desde o cultivo e extração do antígeno até o produto final.

Por se tratar de teste imunoenzimático, a metodologia do seu desenvolvimento e controle de qualidade já está estabelecida em literatura (VOLLER, BIDWELL e BARTLETT, 1979; CROWTHER, 2001; VAZ, 2007).

1ª etapa: Busca e qualificação de fornecedores

Durante o desenvolvimento do produto foi feita a identificação de fornecedores, ou seja, buscou-se no mercado fornecedores de reagentes químicos e biológicos.

Segundo as Boas Práticas de Fabricação, os fornecedores de matérias primas para produção de reagentes para diagnóstico *in vitro* devem ser qualificados. Além disso, precisamos verificar a homogeneidade lote a lote destes produtos. Se um fabricante de um sal, cloreto de sódio, por exemplo, não mantém as características principais de pureza a cada lote fabricado, o nosso produto para diagnóstico também não irá manter estas características. Portanto, este não é um bom fornecedor.

Para escolha dos fornecedores foram levadas em consideração as seguintes características das empresas:

- cumprir a legislação pertinente ao seu tipo de negócio,
- qualidade do produto,
- produção constante do produto que se quer comprar,
- fornecimento de certificado de análise do lote produzido,
- reprodutibilidade lote a lote,
- facilidade de relacionamento comercial,
- custo

Após a escolha dos fornecedores, foi feita a Qualificação dos mesmos para cumprir com os requisitos da legislação de Boas Práticas de Fabricação.

Infelizmente não conseguimos achar fornecedores nacionais para toda matéria prima necessária para a produção do kit ELISA Chagas. Os fornecedores

internacionais também foram avaliados levando-se em consideração as mesmas características e qualificados.

Depois da avaliação acima, solicitaram-se amostras das matérias primas escolhidas, ou comprou-se uma pequena quantidade das mesmas, com as quais foram feitos os primeiros lotes do desenvolvimento.

Foram definidas quais são as matérias primas críticas, ou seja, aquelas que podem interferir diretamente na qualidade do produto. Para estas matérias primas críticas, foram testados 2 ou 3 lotes diferentes e também misturas de lotes para demonstrar que há reprodutibilidade entre os diferentes lotes da matéria prima e que se pode trabalhar com mais de um lote de determinada matéria prima em um mesmo lote do produto final.

Os nomes das matérias primas, a lista de matérias primas críticas e os fornecedores utilizados é informação confidencial da REM Indústria e Comércio Ltda.

2ª etapa: Painéis de amostras / Métodos de referência

Para o desenvolvimento do kit e também para avaliação dos antígenos, é necessário utilizar-se amostras sabidamente positivas e negativas.

Como descrito em literatura, o teste sorológico de referência para doença de Chagas é a imunofluorescência indireta. E foi este teste que adotamos como referência.

Para facilitar a organização do trabalho durante o desenvolvimento do produto, foram montados alguns painéis compostos por amostras positivas e negativas.

Cada painel é um conjunto de soros ou plasmas, composto por amostras positivas e negativas. Sua produção compreende uma série de procedimentos que vão da matéria prima (bolsas de plasma de doadores de sangue ou amostras de soro ou plasma doadas por laboratórios ou bancos de sangue) até a triagem e escolha das amostras que irão constituir-los (OTANI, 2003).

Além dos resultados enviados pelo fornecedor da amostra, as amostras dos painéis foram também testadas em pelo menos um teste ELISA comercial e pela Imunofluorescência Indireta. Em alguns painéis, as amostras positivas foram diluídas em amostras negativas para simular amostras positivas fracas. Além disso, algumas

amostras dos painéis foram diluídas no limite de detecção do teste para garantir a homogeneidade lote a lote.

Para cada painel foi feito um *data sheet*, ou seja, uma folha de resultados contendo as especificações do painel, tipo de amostra utilizada (soro ou plasma; amostra pura ou diluída, etc.), volume e resultados obtidos nos testes realizados (ELISA e/ou imunofluorescência e/ou hemaglutinação); caracterizando a amostra como positiva, negativa ou inconclusiva.

Após montagem e teste, os painéis foram aliquotados e congelados a -20°C, sendo descongelados na hora do uso e mantidos em geladeira por até 7 dias. Após este período, as alíquotas dos painéis não utilizadas foram re-congeladas ou descartadas. Cada painel só sofreu no máximo 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

3ª etapa: Antígeno

A terceira etapa do desenvolvimento foi a definição do antígeno utilizado. Decidiu-se utilizar uma combinação de antígenos recombinante e lisados purificados obtidos da forma epimastigota do parasito *T.cruzi*.

Os lisados foram obtidos de cepas Y, cultivadas na REM. As cepas Y são mantidas em meio de cultura Ducrey, comercialmente disponível. Para obtenção dos antígenos, realizou-se a expansão das cepas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tripase) (CASTELLANI *et al*, 1967).

Posteriormente foram utilizados dois métodos de extração para obtenção do lisado: extrato total sonicado (por nós chamado de extrato físico) e extrato total alcalino (por nós chamado de extrato químico), descritos na literatura (HOSHINO-SHIMIZU, CAMARGO e NAGASSE, 1978; UMEZAWA *et al*, 1996a).

Para definir como deveria ser feito o controle de qualidade dos antígenos produzidos e para determinar a validade dos diferentes antígenos utilizados, após a obtenção do antígeno, realizamos a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY *et al*, 1951) e a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SILVA JÚNIOR, 2001). Foi feita, então, a transferência para membrana de nitrocelulose e posterior immunoblotting (IB) *in house* com um *pool* de três amostras sabidamente positivas (confirmadas por IFI) e *pool* de amostras negativas. Isto permitiu definir a concentração de proteínas de cada lote produzido e a comparação do perfil

eletroforético e imunogênico de cada banda do antígeno, para verificar a homogeneidade e reatividade dos lotes produzidos.

O IB realizado utiliza como conjugado anticorpos de cabra anti-IgG humana marcados com peroxidase. Como revelador utilizamos 4-cloro-1-naftol, que precipita no local da reação.

Para efeito de validação e para determinar a validade de diferentes lotes dos diferentes antígenos utilizados, a eletroforese e IB foram feitos a intervalos de tempo pré-definidos e foram repetidos periodicamente. Foram consideradas antigênicas as bandas de massa molecular na faixa de 20 a 94 kDa, com predomínio de reatividade na região de 30 a 65 kDa. Não foi observada reatividade com o *pool* de amostras negativas (MENEGHISSE *et al*, 2005).

4ª etapa: Microplaca sensibilizada

O primeiro passo no desenvolvimento das microplacas foi a escolha do tipo de plástico, ou seja, tipo e marca da placa. Testaram-se diferentes marcas e tipos de plástico das microplacas, como alta, média ou baixa afinidade de ligação.

Para cada tipo e marca de microplaca testada foram aplicadas 4 concentrações de antígenos individuais, sendo que todas passaram pelo mesmo processo de sensibilização. Estas placas foram testadas com os painéis de amostras positivas e amostras de soro negativas frescas obtidas de laboratórios/bancos de sangue. Após análise dos resultados, escolheu-se as melhores concentrações de cada antígeno e tipos de microplaca. O critério de seleção baseou-se na escolha da menor concentração de antígeno que apresentasse máxima reatividade para soro ou plasma positivo e mínima reatividade para soro ou plasma negativo, através de titulação em bloco.

Foi feita, então, uma segunda sensibilização com o tipo de plástico escolhido para as microplacas, utilizando-se combinações dos antígenos nas concentrações definidas na primeira sensibilização. As mesmas foram novamente testadas com o painel de amostras positivas e amostras negativas frescas. Novamente escolhemos as melhores concentrações, utilizando o mesmo critério de titulação em bloco e estas foram usadas para uma nova sensibilização.

A cada sensibilização e teste das placas sensibilizadas, selecionava-se aquelas placas cujos resultados estavam mais coerentes com o *data sheet* do painel e as outras eram eliminadas. Na etapa seguinte, eram repetidas as mesmas

concentrações de antígenos e acrescentadas novas concentrações, conforme necessário. Por exemplo, se foi testado determinado antígeno na concentração 0,250 µg/mL e 0,500 µg/mL e analisando-se os resultados concluiu-se que 0,250 µg/mL era uma concentração baixa de antígeno, mas 0,500 µg/mL era muito alta, na sensibilização seguinte faziam-se concentrações intermediárias, entre estes dois valores (0,300 µg/mL e 0,400 µg/mL, por exemplo).

Foram feitas várias sensibilizações, até obter-se a concentração ideal de cada antígeno na microplaca. Depois de obtida esta concentração, esta última sensibilização foi repetida, apenas para verificar se os resultados obtidos eram reprodutíveis.

Foram ensaiadas ainda, diferentes formulações das soluções de sensibilização, lavagem e pós sensibilização, diferentes pHs para a solução de sensibilização e diferentes tempos e temperaturas de incubação durante a sensibilização.

As microplacas foram sensibilizadas por um período pré-definido, a uma determinada temperatura, depois se fez a lavagem das mesmas e pós sensibilização (bloqueio dos sítios de ligação não preenchidos pelos antígenos). Por último as mesmas foram aspiradas e passaram por um ciclo de secagem e embalagem final.

Foi definido o tipo de embalagem e de dessecante a ser usado com as microplacas. Não só o tipo de embalagem é importante, mas também a forma de selar as microplacas na embalagem. Estas características ajudam a manter a estabilidade das placas e elas foram definidas durante o processo de desenvolvimento.

Para se testar as microplacas sensibilizadas durante o desenvolvimento, todos os outros componentes necessários para a realização do ELISA vieram de um kit comercialmente aprovado pela ANVISA.

5ª etapa: Conjugado

Como a intenção de uso do kit de Chagas que está sendo desenvolvido é triagem sorológica em bancos de sangue e levando-se em consideração os surtos que tivemos recentemente desta doença, decidiu-se utilizar um conjugado composto por anticorpos anti-IgG e anti-IgM humana. A enzima escolhida para marcação destes anticorpos foi a peroxidase, por sua estabilidade e facilidade de interação com substrato/cromógenos de fácil obtenção.

A primeira etapa do desenvolvimento do conjugado foi selecionar os anticorpos marcados. Testaram-se vários tipos de anticorpos, de marcas diferentes para escolha daquele que apresentasse um melhor desempenho e correlação de sensibilidade e especificidade. Os testes foram realizados utilizando-se as microplacas já desenvolvidas e os painéis de amostras positivas e negativas montados para esta finalidade. Alguns dos anticorpos testados mostraram muita inespecificidade e reações de fundo.

Para testar o conjugado, foi preciso fazer uma titulação de cada conjugado. Esta titulação foi feita fazendo-se diluições do conjugado comercialmente adquirido e testando as mesmas frente às microplacas sensibilizadas e painéis. Como no desenvolvimento da microplaca, o critério de seleção baseou-se na escolha da menor concentração de cada conjugado que apresentasse máxima reatividade para soro ou plasma positivo e mínima reatividade para soro ou plasma negativo. Foram, assim, escolhidos os melhores títulos e feitas novas diluições intermediárias, até obter-se a diluição ótima para aquele conjugado. Uma vez obtida a diluição ótima, o conjugado foi diluído em maior volume para realização de testes adicionais.

Como o produto final será um produto comercial e não para uso em pesquisa, devemos levar em consideração as necessidades dos usuários finais. Então, precisávamos de um conjugado pronto para uso e que se mantivesse estável por pelo menos seis meses na temperatura de armazenamento dos demais componentes do kit, ou seja, de 2 a 8°C. Este foi outro ponto testado, além da sensibilidade e especificidade do conjugado, se ele se mantinha estável. Para isso, lançamos mão da estabilidade acelerada, ou seja, uma alíquota do conjugado foi colocada à temperatura de 37°C e foi testada nos dias 0, 3, 7, 10, 13 e 17. Antes de iniciar o estudo de estabilidade acelerada para o conjugado, armazenamos o mesmo a temperatura de 2 a 8°C.

O conjugado escolhido mostrou-se estável por mais de 7 dias à temperatura de 37°C, o que, por experiência anterior, nos indica que o mesmo se manterá estável por cerca de um ano à temperatura de 2 a 8°C. Para confirmação desta informação, foi realizada a estabilidade em tempo real do kit final mantido de 2 a 8°C.

6ª etapa: Reagentes líquidos

Dentre os reagentes líquidos do kit de ELISA temos: diluente de amostra, solução de lavagem, substrato/cromógeno e solução bloqueadora. Para cada um destes reagentes também foram definidas características desejadas e matérias primas críticas. Foram feitos vários testes até a formulação final de cada um deles.

Diluente de amostra: a característica principal do diluente de amostra é a necessidade do mesmo mudar de cor após adição da amostra, sem interferir na reação. Isto dá segurança ao usuário na etapa de pipetagem. É um controle que pode ser feito para verificar se todas as amostras foram adicionadas à microplaca antes de incubar a mesma. A alteração de cor é feita com a ajuda de um corante indicador que muda de cor com a mudança do pH da solução, após adição da amostra. Foram feitos vários testes para se achar a concentração ideal de corante a ser adicionado ao diluente para ocorrer esta mudança de cor.

Solução de lavagem: a característica principal da solução de lavagem é ter a capacidade de remover das microcavidades todo material não ligado às mesmas, mantendo-se a integridade do material ligado e sem deixar resíduo. A solução de lavagem é uma solução isotônica, tamponada, 20X concentrada e deve ser diluída antes do uso. Por ser uma solução muito concentrada, os sais podem precipitar quando a mesma é armazenada de 2 a 8°C. Portanto, a solução de lavagem concentrada deve ser deixada à temperatura ambiente ou ligeiramente aquecida para solubilização dos cristais antes da diluição da mesma.

Aqui foram testados, não só a formulação da solução de lavagem, mas o número de ciclos de lavagem da microplaca.

Substrato/cromógeno: o substrato da peroxidase é o peróxido de hidrogênio. Podíamos ter escolhido dois cromógenos para a enzima que está sendo usada: orto-fenileno diamina (OPD) e tetrametilbenzidina (TMB). O cromógeno escolhido foi o TMB, por não ser carcinogênico como o OPD e por ser estável como reagente líquido, o que não ocorre com o OPD. A solução substrato/cromógena é pronta para uso e testou-se vários tempos de incubação das microplacas com esta solução até encontrar-se o ideal.

Solução bloqueadora: a solução bloqueadora é uma solução ácida que bloqueia a reação do substrato com sua enzima e estabiliza a cor da solução obtida na microcavidade por um tempo determinado. Durante o desenvolvimento desta

solução foram testados dois tipos de ácido diferentes em diversas concentrações. Foram testados também volumes diversos de cada ácido em cada concentração.

7ª etapa: Amostras Controles

Decidiu-se desenvolver dois controles para este kit, um positivo e um negativo. Os controles foram fabricados a partir do soro humano e contém um corante para diferenciá-los e um conservante, para manter sua estabilidade por pelo menos um ano de 2 a 8°C.

Junto com esta etapa decidiu-se que o *cut-off* do kit seria baseado no controle negativo, ou seja, seria o valor do controle negativo adicionado de um fator fixo. Portanto, foi necessário testar várias amostras negativas e *pool* de amostras negativas para se obter o valor médio do controle negativo. Além disso, foi testado também a adição de diversas concentrações de corante aos controles negativo e positivo para verificar se os mesmos não interferiam com as densidades ópticas dos controles.

Para uma melhor reprodução da realidade, foi testado e ficou estabelecido que tanto o controle negativo como positivo seria um *pool* de amostras negativas ou positivas. Foi feita uma titulação do controle positivo para que sua densidade óptica ficasse mais próxima do *cut-off* e pudesse ser indicativa de problemas na realização das reações.

As fórmulas das soluções acima, assim como as procedências de suas matérias primas são informações confidenciais da REM Indústria e Comércio Ltda.

8ª. etapa: Cálculo do *Cut-off*

Esta etapa foi feita junto com a 7ª etapa. Baseado nos valores de absorbância obtidos até o momento para as amostras sabidamente positivas e negativas, estipulou-se o *cut-off* do kit. O *cut-off* do kit foi baseado no controle negativo, ou seja, a fórmula contém o valor do controle negativo adicionado de um fator fixo. Para isso foi necessário testar várias amostras negativas e *pool* de amostras negativas para se obter o valor médio do controle negativo. A fórmula final obtida para o cálculo do *cut-off* foi:

$$\text{Cut-off} = \text{NCx} + 0,180$$

onde: NCx = média dos controles negativos

0,180 = fator fixo

9ª etapa: Produto final

No desenvolvimento do produto final são definidas as apresentações do kit (neste caso 96 e 480 testes), o tipo de frascos utilizados para o fracionamento de cada reagente, os volumes de cada reagente e a embalagem final.

Como o kit tem mais de uma apresentação, algumas etapas da validação serão realizadas nas duas apresentações, para verificar se não há diferenças entre as mesmas.

Nesta etapa desenvolvemos também os rótulos que serão utilizados nos frascos e na caixa do kit. Os mesmos têm cola e tipo de papel especial para suportar o armazenamento à temperatura de 2 a 8 °C.

Os rótulos e instruções de uso definitivos só foram feitos após toda etapa de validação, onde tivemos dados suficientes para comprovar as validades e desempenho do kit.

3.2.3. Produção de três lotes piloto

3.2.3.1. Procedimentos para produção, validação e estabilidade

Depois das etapas de desenvolvimento, foram revisados os procedimentos escritos contendo todos os detalhes sobre a produção, desde a fórmula padrão de cada reagente, etapas da produção, equipamentos aprovados para uso nesta produção, tempos de agitação e incubação, até os controles de qualidade que devem ser feitos para cada reagente que demonstrem que os mesmos encontram-se dentro das especificações.

Foram também revisados os procedimentos já existentes de validação e estudo de estabilidade para implementar melhorias e acrescentar as etapas necessárias para um produto desenvolvido aqui.

3.2.3.2. Elaborar e implantar os procedimentos necessários

Com os procedimentos escritos e implantados, foi feita a produção do terceiro lote piloto, que juntamente com os outros dois lotes piloto, foram usados para a validação e estudos de estabilidade do produto final.

3.2.3.3. Lotes piloto

Os três lotes piloto foram fabricados e utilizados para validação, estudos de estabilidade, testes analíticos e ensaios clínicos.

Os dois primeiros lotes foram fabricados em menor escala, para realização de estudos internos preliminares.

O terceiro lote piloto foi fabricado na capacidade produtiva máxima da planta de produção, ou seja, reagentes suficientes para 1.200 placas sensibilizadas. Este terceiro lote simula, em todos os aspectos, uma produção em escala real do kit de Chagas. Além das validações, estabilidades e testes analíticos internos, este lote foi utilizado também para o estudo clínico descrito a seguir.

Durante a produção dos lotes piloto, os procedimentos escritos foram revisados para correção de eventuais falhas que fossem percebidas durante a produção e para complementação de informações.

3.2.3.4. Testes de tempos de incubação do Substrato e volume da Solução Bloqueadora no kit Chagas

Para estes testes foram testadas, em condições padrão, dez replicatas do controle negativo, dez replicatas do controle positivo e dez replicatas da amostra positiva baixa em 3 placas diferentes. Foi calculado o índice de reatividade (IR) de cada replicata, dividindo-se a densidade óptica obtida pelo valor de cut-off de cada reação. Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores de IR de cada amostra. Com isto, construiu-se um gráfico, onde no eixo “x” colocaram-se os valores de índice de reatividade e no eixo “y” os ensaios. A média dos índices de reatividade é representada pela linha contínua e as linhas pontilhadas representam a média ± 2 e 3 desvios padrão. Os valores de IR obtidos com os diferentes tempos de incubação do substrato foram plotados no gráfico e definiram-se os limites mínimo e máximo de variação no tempo de incubação, com base nos valores mais próximos da média. O mesmo foi feito com os volumes da solução bloqueadora.

3.2.3.5. Estudo Analítico

Como parte da fabricação foram feitos alguns controles de qualidade, entre eles a avaliação de amostras positivas e negativas para verificação das

características de cada componente que está sendo fabricado e do kit final. Estes testes foram feitos com painéis ou amostras caracterizadas.

Para o primeiro lote piloto, foram testadas algumas amostras que permitiram obter uma idéia da sensibilidade e especificidade do kit e indicar que não havia problemas que impedissem a produção dos outros lotes piloto.

3.2.4. Validação do kit desenvolvido

Com base na legislação analisada e experiência adquirida durante o desenvolvimento e produção do kit, foi escrito um procedimento para validação de kits para diagnóstico. Com base neste procedimento foram feitos os testes para validação do kit desenvolvido.

3.2.4.1. Testes Analíticos

Os testes analíticos foram realizados utilizando os lotes piloto do kit ELISA Chagas e amostras específicas para cada teste (descritas em cada item). O método utilizado foi o ELISA indireto.

3.2.4.1.1. Sensibilidade e especificidade

O estudo da sensibilidade e especificidade do kit desenvolvido (ELISA Chagas) foi realizado utilizando-se amostras de diferentes procedências sabidamente positivas ou negativas para a doença de Chagas. Em todos os lotes piloto foram ensaiadas pelo menos 100 amostras positivas e 764 amostras negativas. Sempre que possível, os testes foram realizados nas duas apresentações de cada lote piloto. Nem todas as amostras foram testadas nos três lotes pilotos. Isso se deve, ou ao volume insuficiente de amostra para a realização de todos os ensaios, ou porque os ensaios foram realizados simulando situações do kit em campo, e nesse caso, apenas uma apresentação de um dos lotes pilotos foi escolhida para a realização dos testes.

As amostras foram caracterizadas como positivas no kit ELISA Chagas quando o Índice de Reatividade (IR), ou seja, valor da densidade óptica da amostra dividido pelo valor do cut-off, foi superior a 1,0. Além disso, amostras com valores de IR inferiores a 1,1 ou que mostraram comportamento diferente do resultado esperado, tiveram seus testes repetidos, quando possuíam volume suficiente para isso, com a finalidade de comprovar a confiabilidade do teste.

As amostras foram caracterizadas como negativas no kit ELISA Chagas quando o Índice de Reatividade (IR) da amostra foi inferior a 1,0. Além disso, amostras com valores de IR iguais ou superiores a 0,9 ou que mostraram comportamento diferente do resultado esperado, tiveram seus testes repetidos,

quando possuíam volume suficiente para isso, com a finalidade de comprovar a confiabilidade do teste. Nesses casos os cálculos foram refeitos levando em consideração os valores após as repetições dos ensaios.

As fórmulas utilizadas para cálculo da sensibilidade e especificidade foram:

Sensibilidade = Verdadeiros positivos ÷ (Falso negativo + Verdadeiro positivo)

Especificidade = Verdadeiros negativos ÷ (Falso positivo + Verdadeiro negativo)
(FERREIRA, MORAES e BECK, 2007).

3.2.4.1.2. Limite de detecção

De acordo com a norma NBR 14.864:2002, limite de detecção é a capacidade de identificar a presença de um analito em determinadas condições ou de determinar quantitativamente a sua quantidade dentro de limites definidos de precisão (NBR 14.864, 2002).

Por se tratar de pesquisa de anticorpos, em teste semi-quantitativo, analisamos apenas a presença do analito (neste caso, anticorpo). Para tanto, em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas 10 amostras caracterizadas como positivas para a doença de Chagas pelo método de referência Imunofluorescência Indireta (IFI). Essas amostras apresentaram títulos variados no teste de IFI.

3.2.4.1.3. Análise de interferentes

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas 9 amostras com alterações bioquímicas, porém caracterizadas como negativas para a doença de Chagas em teste ELISA, sendo três amostras de soro lipêmicas, três amostras de soro hemolisadas e três amostras de soro fator reumatóide positivo.

3.2.4.1.4. Reação Cruzada

Foram testadas amostras de soro de indivíduos com sorologia positiva para outras doenças, com o objetivo de avaliar possíveis reações cruzadas com Chagas. São elas: CMV, Rubéola, HIV, HBV, Sífilis, HTLV, HCV, EBV, Leishmania, FAN.

3.2.4.1.5. Repetitividade

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas. Para cada ensaio realizado utilizou-se o mesmo conjunto de pipetas e o mesmo operador durante todo o teste.

3.2.4.1.6. Reprodutibilidade

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas, por dia em uma mesma microplaca, 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas. Esse ensaio foi repetido em 5 dias diferentes, variando os operadores e as pipetas das reações.

3.2.4.1.7. Avaliação de Soro x Plasma

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas amostras de três indivíduos classificados como não doentes para a doença de Chagas, coletados nas seguintes condições:

- Soro coletado em tubo seco;
- Soro coletado em tubo com gel separador;
- Plasma coletado com EDTA como anticoagulante;
- Plasma coletado com citrato como anticoagulante;
- Plasma coletado com heparina como anticoagulante.

Além disso, também foram ensaiadas estas mesmas amostras acrescidas de amostra positiva. O fator de diluição utilizado para a adição da amostra positiva foi 1:2 para todas as amostras negativas.

3.2.4.1.8. Avaliação das condições de armazenamento

As amostras utilizadas para a Avaliação de Soro versus Plasma foram congeladas a -20°C por sete dias, depois foram descongeladas e testadas novamente. Os testes foram repetidos por mais 5 ciclos de congelamento/descongelamento, com intervalo de pelo menos 2 dias entre cada ciclo.

3.2.4.1.9. Concordância de Desempenho com kit Comercial

Como durante os outros testes de validação todos os lotes piloto mostraram resultados semelhantes, essa análise de Concordância de Desempenho foi realizada apenas com o lote C.

Para verificar a concordância com teste comercial, no lote C do novo kit ELISA Chagas, foram ensaiadas 3.183 amostras, entre positivas e negativas para a doença de Chagas, em paralelo com um kit comercial aprovado pela ANVISA (Gold ELISA T. cruzi IgG).

3.2.4.2. Estudos de Estabilidade

Foram realizados os estudos de estabilidade acelerada, estabilidade à temperatura ambiente (resistência), estabilidade de kit aberto, estabilidade de kit em uso, estabilidade a temperaturas extremas e estabilidade de longa duração (ou em tempo real).

Os testes foram realizados para os lotes piloto do kit ELISA Chagas. Em cada um dos ensaios foi realizada uma condição controle (kit armazenado de 2 a 8°C) para demonstrar que as amostras utilizadas permanecem com seus títulos de anticorpos constantes e que a possível perda da reatividade dos kits em testes está relacionada apenas com a perda da estabilidade dos seus componentes.

Nos testes foram ensaiados: controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, um painel de estabilidade em duplicata e amostras negativas em duplicata. O painel de estabilidade e as amostras negativas foram mantidos congelados a -20°C, em freezer com temperatura controlada, e descongelados apenas no momento do uso.

A caracterização das amostras do painel consiste na média do índice de reatividade de cada amostra testada em duplicata ou triplicata, em condições normais, durante no mínimo três dias. Cada painel deverá ser caracterizado frente ao lote do kit ao qual será testado.

O painel de estabilidade é composto por amostras reativas, indeterminadas e não reativas no ELISA. Para fins de estabilidade considera-se como amostras

reativas no ELISA aquelas que no teste de caracterização do painel apresentaram média menos três desvio-padrões com índice de reatividade acima de 1,1. As amostras indeterminadas no ELISA são aquelas cujo limite inferior de três desvios-padrões ficam com índice de reatividade abaixo de 1,1, apesar de sua média de IR estar acima de 1,1. Essas amostras indeterminadas não serão consideradas para definir a perda de estabilidade de um kit. Considera-se como amostras não reativas no ELISA aquelas cujo limite superior de três desvios-padrões ficam com índice de reatividade abaixo de 1,0.

A perda da estabilidade de um kit é observada quando um dos critérios de aceitação da Instrução de Uso do kit não for atendido e/ou quando amostras caracterizadas como reagentes para o teste de estabilidade, apresentarem IR inferiores a 1 em dois dias diferentes, sendo eles consecutivos ou não.

Os ensaios foram realizados de acordo com as Instruções de Uso do kit de ELISA Chagas. Permitiu-se que os componentes do kit atingissem a temperatura ambiente antes do ensaio. Foram anotados na ficha de teste de estabilidade os equipamentos utilizados para a realização do ensaio.

3.2.4.2.1. Estabilidade Acelerada

Os kits em teste foram incubados no dia zero a 37°C em uma incubadora com temperatura controlada. Os testes foram realizados nos dias 0, 3, 7, 10 dias e depois a intervalos de três em três dias ou com menor frequência, dependendo do nível de decaimento, até que o kit perdesse validação. Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de estabilidade em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas em duplicata. A taxa de decaimento de reatividade foi comparada com um kit Controle (armazenado de 2 a 8°C) através da inclinação da reta (p).

3.2.4.2.2. Estabilidade à Temperatura Ambiente

No primeiro dia do ensaio (dia 0), os kits foram removidos do armazenamento de 2 a 8°C e atingiram a temperatura ambiente. Durante este estudo os kits foram

mantidos à temperatura ambiente (19 a 27°C), na sala de temperatura controlada. Os testes foram realizados a cada 15 dias até observar decaimento e depois a intervalos menores, dependendo do nível de decaimento observado, até que o kit perdesse validação. Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de diluição em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas em duplicata.

3.2.4.2.3. Estabilidade de kit Aberto

No primeiro dia do ensaio (dia 0), os kits foram removidos do armazenamento de 2 a 8°C e atingiram a temperatura ambiente. Os frascos de todos os reagentes líquidos e a embalagem de todas as microplacas foram abertas e fechadas novamente. Após o ensaio, os kits retornaram à temperatura normal de armazenamento (2 a 8°C).

Os testes foram realizados durante 5 dias consecutivos e depois uma vez por semana por mais 11 semanas. Foram, então, testados semanalmente ou a intervalos menores, dependendo do nível de decaimento observado, até que o kit perdesse sua validação. Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

3.2.4.2.4. Estabilidade de kit em uso

No primeiro dia do ensaio (dia 0), os kits foram removidos do armazenamento de 2 a 8°C e atingiram a temperatura ambiente. Neste teste os componentes só foram abertos e utilizados conforme o número de testes realizados e fechadas novamente após o uso. Os testes foram realizados semanalmente, no mesmo kit já utilizado anteriormente, até perda da estabilidade e após cada ensaio o kit voltou a ser armazenado conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C). Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

3.2.4.2.5. Estabilidade a temperaturas extremas

Esse estudo é realizado para avaliar se o transporte de um kit pode promover alterações no desempenho ou na durabilidade do mesmo.

Para isso foram realizadas duas simulações de transporte de um kit. A primeira consistiu na simulação de um envio normal de kit (grupo 1). Os kits foram embalados pelo almoxarifado da REM como se fossem ser enviados para um cliente (embalagens de isopor com gelo) e depois foram mantidos à temperatura ambiente (19-27°C) durante 36 horas. Em seguida, retornaram à câmara fria (2-8°C) por mais 24 horas, para depois serem testados.

O grupo 2 referiu-se à simulação de desvio no envio de kit. Os kits permaneceram à temperatura ambiente (19-27°C) durante 6 horas, foram colocados a 37°C durante 2 horas e depois a 40°C durante mais 1 hora. Em seguida ficaram à temperatura ambiente por 21 horas e retornaram para a câmara fria (2-8°C) por mais 24 horas, para depois serem testados.

Os testes foram realizados mensalmente até perda de sua estabilidade ou por no máximo 20 meses e após cada ensaio o kit voltava a ser armazenado conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C). Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

3.2.4.2.6. Estabilidade de longa duração (ou em tempo real)

No primeiro dia do ensaio (dia 0), os kits foram removidos do armazenamento de 2 a 8°C, atingiram a temperatura ambiente e foram testados. Os testes foram realizados mensalmente até perda da estabilidade ou durante 16-25 meses e após cada ensaio o kit voltava a ser armazenado conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C). Foi considerado que o kit perdeu validação quando houve perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.

3.2.4.3. Estudos Clínicos

Foi feito um estudo clínico, com amostras de bancos de sangue de diversas regiões do Brasil, sul, sudeste e centro-oeste, para demonstrar a representatividade da população. Foram testadas 6.158 amostras randômicas negativas e 285 amostras positivas de painéis ou soroteca dos bancos de sangue.

As amostras da rotina do banco de sangue ou laboratório foram coletadas, centrifugadas e mantidas de 2 a 8°C, por no máximo 7 dias, caso o teste não fosse feito no mesmo dia da coleta. Para períodos maiores de armazenamento, as mesmas foram congeladas a -20°C.

As amostras foram testadas com o kit utilizado na rotina do banco de sangue ou laboratório, em paralelo com o kit protótipo para Chagas.

Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso de cada kit utilizado. As amostras foram pipetadas em unicata.

Todas as amostras com resultados discrepantes entre os kits testados e aquelas que se apresentaram na zona cinza de 30% (região da DO compreendida entre +30% e -30% em torno do *cut-off*) no kit protótipo foram separadas e repetidas em triplicata em todos os kits que estavam sendo usados para a doença de Chagas. Para aquelas que continuaram discrepantes ou na zona cinza de 30% foi feito teste confirmatório (imunofluorescência indireta) e testes adicionais, como hemaglutinação.

As amostras positivas de sorotecas e painéis dos bancos de sangue ou laboratórios foram testadas em duplicata no kit protótipo (ELISA Chagas), sempre que havia volume de amostra suficiente para isto. Para efeito deste estudo foram consideradas como confirmadamente positivas as amostras que foram concordantes nos testes previamente realizados, sendo positivas no ELISA, Hemaglutinação ($\geq 1/40$) e Imunofluorescência indireta ($\geq 1/40$). Quando só tiverem sido realizados os testes de ELISA e IFI, estes dois parâmetros devem atender aos critérios descritos anteriormente. Todas as amostras com resultados discrepantes entre os kits testados e/ou entre os kits testados e o resultado que o banco de sangue ou laboratório tinha para aquela amostra foram repetidas em triplicata em todos os kits em uso para a doença de Chagas. Para aquelas que continuaram discrepantes foram feitos testes adicionais para confirmação de seu resultado.

3.2.5. Registro do produto

Foi montado um dossiê técnico para encaminhamento à ANVISA, seguindo a legislação em vigor na época, que era a Portaria nº 8/MS/SVS de 23 de janeiro de 1996, atualmente revogada e substituída pela Resolução RDC nº 206 de 2006.

Como parte do registro do produto foi solicitada pela ANVISA a realização de Análise Prévia. Esta análise é feita por laboratório credenciado pela ANVISA, hoje o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), situado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro. Para a Análise Prévia foi necessário enviar ao INCQS:

- comprovante de pagamento de taxa específica para esta análise,
- cópia das Instruções de Uso, Rótulos e Relatório Técnico enviados à ANVISA,
- cópia dos protocolos de produção de três lotes consecutivos do produto,
- kit em quantidade suficiente para realização de aproximadamente 1.000 testes
- Certificado de Análise do lote enviado para teste
- painel comercial para o analito em estudo

3.2.6. Análise Estatística

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade foram calculados de acordo com Ferreira e Ávila (2001) e Ferreira, Moraes e Beck (2007).

Os resultados foram analisados e tratados utilizando os programas Sigma STAT, Prisma, WinEpiscope e Microsoft Office Excel.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da legislação

A análise da legislação foi feita com base em consultas nos sites das agências de saúde do Brasil, Mercosul, Canadá, Estados Unidos e Europa e está resumida e comentada nas Tabela 3, 4 e 5.

Tabela 3: Análise da Literatura e Legislação de Boas Práticas de Fabricação, Processo de Validação e Registro de Produto

	Brasil	União Européia	Estados Unidos da América	Canadá	Mercosul
Órgão Regulador	ANVISA	Comissão	FDA	Health Canada	Comissão
BPF	Portaria nº 686/98	ISO 13.485	CFR 21 partes 808, 812, 820	CAN/CSA-ISO 13.485:03	GMC Resolução nº 65/96
Registro	Resolução RDC nº 206/06	Diretiva 98/79/CE e decisão da Comissão de 07/05/02	CFR 21 várias partes	SOR/98-282 com alterações incorporadas	GMC Resolução nº 79/96
Validação	Norma NBR 14.864	ISO DIN 15.197	Subparte G das partes 808, 812, 820 do CFR 21	...	...
Comentários	<ul style="list-style-type: none"> - demora na atualização das leis, normas - Incompetência técnica (ou despreparo) do setor regulador (governo) - “achismo” ou subjetivismo na interpretação da lei. - setor regulado é sempre tido como “culpado” 	<ul style="list-style-type: none"> - Divisão de responsabilidade com setor regulado - Rigor de acordo com o risco - Parâmetros pré-definidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Agilidade na atualização de leis (revisão anual) - Descentralização - Permite inspeção de estabelecimentos por terceiros certificados 	<ul style="list-style-type: none"> - Misto entre Europa e EUA - Talvez modelo ideal ?? - Disponível no site: “guidance documents” que são guias de “como fazer” diversas atividades - Esclarecimentos de dúvidas sobre legislação publicada em diário oficial - Legislação geral, como nos EUA: Food and Drug Act 	<ul style="list-style-type: none"> - Ainda em amadurecimento - Leis só passam a vigorar quando Estado-Parte internaliza as mesmas - Não há prazo para esta internalização

Tabela 4: Comparação dos itens das principais legislações de Boas Práticas de Fabricação:

Requisito	Brasil	União Européia/Canadá	Estados Unidos
	Portaria 686/98	ISO 13.485	CFR 21 partes 808, 812, 820
Introdução	Introdução	Introdução	Subparte A: Instruções gerais: escopo, definições e sistema da qualidade.
Considerações gerais	Capítulo 1 – Considerações gerais		Subparte A: Instruções gerais: escopo, definições e sistema da qualidade.
Responsabilidade da direção	Capítulos 1 – considerações gerais Capítulo 2 – Pessoal Capítulo 3 – Plantas e edificações Capítulo 11 - Auto inspeção e auditoria de qualidade	5 Responsabilidade da direção 5.1 Comprometimento da direção 5.2 Foco no cliente Planejamento 5.5 Responsabilidade, autoridade e comunicação 5.5.1 Responsabilidade e autoridade 5.5.1 Representante da direção 5.5.3 Comunicação interna 5.5 Análise crítica pela direção 5.6.1 Generalidades 5.5.2 Entradas para a análise crítica 5.6.3 Saídas da análise crítica	Subparte B: Requisitos do Sistema da Qualidade: responsabilidade gerencial, auditoria da qualidade e pessoal.
Pessoal	Capítulo 2 - Pessoal	6 Gestão de Recursos	Subparte B: Requisitos do Sistema da Qualidade: responsabilidade gerencial, auditoria da qualidade e pessoal.
Plantas e edificações	Capítulo 3 – Plantas e edificações	6.3 Infra-estrutura 6.4 Ambiente de Trabalho	
Equipamentos	Capítulo 4 - Equipamentos	7.5 Produção e fornecimento de Serviço	Subparte G: controle de produção e processos; equipamentos de medição, testes e inspeções, processo de validação Subparte N: Serviços.
Higiene	Capítulo 5 - Higiene	7.5 Produção e fornecimento de Serviço	
Documentação	Capítulo 6 - Documentação	4.2 Requisitos de documentação	Subparte D: controle de documentos

(cont...)

(cont...)

Requisito	Brasil	União Européia/Canadá	Estados Unidos
	Portaria 686/98	ISO 13.485	CFR 21 partes 808, 812, 820
Arquivo de registros e amostras	Capítulo 7 - Arquivo de registros e amostras	4.2.4 controle de registros	Subparte M: registros e subparte F: identificação e rastreabilidade Subparte F: Identificação e Rastreabilidade. Subparte M: Registros: requisitos gerais, registro principal, registro histórico, registros do sistema de qualidade, arquivos de reclamações.
Produção	Capítulo 8 - Produção	7 Realização do produto 7.1 Planejamento da realização do produto 7.4 Aquisição 7.5 Produção e fornecimento de serviço 8.2.4 Medição e monitoramento de processos	Subparte E: Controle de Compras. Subparte F: Identificação e Rastreabilidade. Subparte G: Controle de Produção e Processos; Equipamentos de medida, testes e Inspeções; Processo de validação. Subparte K: Controle de Embalagem e Etiquetagem.
Controle e/ou garantia da qualidade	Capítulo 9 - Controle e/ou garantia da qualidade	4 Sistema de gestão da qualidade 4.1. Requisitos Gerais 4.2 Requisitos de documentação 4.2.2 Manual da qualidade 4.2.3 Controle de documentos 4.2.4 Controle de registros 7.5 Produção e fornecimento de serviço 7.6 Controle de dispositivos de medição e monitoramento 8.2.4 Medição e monitoramento do produto	Subparte G: Controle de Produção e Processos; Equipamentos de medida, testes e Inspeções; Processo de validação. Subparte H: Atividade de Aceitação: aceitação no recebimento, em processo e final.
Estudos de Estabilidade	Capítulo 10 - Estudos de Estabilidade	Não menciona	

(cont...)

(cont...)

Requisito	Brasil	União Européia/Canadá	Estados Unidos
	Portaria 686/98	ISO 13.485	CFR 21 partes 808, 812, 820
Medição e monitoramento de processos	Não menciona	8.2.3 Medição e monitoramento de processos	
Auto inspeção e auditoria de qualidade	Capítulo 11 - Auto inspeção e auditoria de qualidade	7.4.3 Verificação do produto adquirido 8.2 Medição e monitoramento 8.5 Melhorias	Subparte B: Requisitos do Sistema da Qualidade: responsabilidade gerencial, auditoria da qualidade e pessoal. Subparte J: Ação Preventiva e Corretiva.
Armazenamento e distribuição	Capítulo 12 - Armazenamento e distribuição	7.5.5 Preservação do produto	Subparte L; manuseio, armazenamento, distribuição e instalação
Reclamações e desvios da qualidade	Capítulo 13 - Reclamações e desvios da qualidade	8.3 Controle de produto não-conforme	Subparte I: produtos não conformes
Retirada do produto do mercado	Capítulo 14 - Retirada do produto do mercado	8.3 Controle de produto não-conforme	Subparte I: produtos não conformes
Materiais rejeitados	Capítulo 15 - Materiais rejeitados	8.3 Controle de produto não-conforme	Subparte I: produtos não conformes
Devoluções	Capítulo 16 - Devoluções	8.3 Controle de produto não-conforme	Subparte I: produtos não conformes
Projeto	Só menciona, mas não há item específico	7.2 Projeto e desenvolvimento	Subparte C: Controle de Projeto.
Validação	Só menciona, mas não há item específico		Subparte G: Controle de Produção e Processos; Equipamentos de medida, testes e Inspeções; Processo de validação.
Análise de dados	Não menciona	8.4 análise de Dados	
Realimentação de cliente	Não menciona	8.2.1 Realimentação de cliente	
Medição, análise e melhoria		8 Medição, análise e melhoria	
Técnicas Estatísticas	Não menciona	Não menciona	Subparte O: Técnicas Estatísticas.

Tabela 5: Legislações Harmonizadas no Mercosul e suas equivalentes nos Estados-Parte

Assunto	Regulamento Mercosul nº	Incorporado no Estado Parte sob nº				
		Argentina	Brasil	Paraguai	Uruguai	Venezuela
Registro de produtos para diagnóstico <i>in vitro</i>	GMC Res 79/96	Disposición ANMAT nº 2674/99 e 2675/06	RDC nº 206/06	...	Decreto nº 188/98	...
Normas de Boas Práticas de Fabricação para produtos para diagnóstico <i>in vitro</i>	GMC Res 65/96	Disposición ANMAT nº 3623/97	Portaria 686/98	...	...	...
Normas de Boas Práticas de Fabricação para produtos médicos	GMC Res 04/95	Disposición ANMAT nº 191/99	RDC nº 59/00	...	Ainda não incorporada	...

Fontes:

www.msp.gub.uy/noticia_180_1.html - data de acesso 10/05/07

www.anmat.gov.ar/normativa/Normativa/productosmedicos.htm - data de acesso 11/06/07

www.anvisa.gov.br/e-legis - data de acesso 12/06/07

http://www.mercosur.int/msweb/SM/Actas%20TEMPORARIAS/GMC/ACTA01_07/ANEXO_XII_DI_04-04-Rev11RTIN%20%20Normas%20Restan%20Incorporar%20por%20un%20EP.pdf – data de acesso 11/06/07

4.1.1. A Resolução RDC n° 206, de 17 de novembro de 2006

A resolução RDC n° 206, de 17 de novembro de 2006, estabelece o regulamento técnico de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, com suas alterações, revalidações e cancelamento.

Esta resolução define produtos para diagnóstico de uso *in vitro* como: “reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, junto com as instruções para seu uso, que contribuem para realizar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa de uma amostra proveniente do corpo humano e que não estejam destinados a cumprir alguma função anatômica, física ou terapêutica, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para prover informação sobre amostras obtidas do organismo humano” (Resolução RDC n° 206/06). Esta definição é bem próxima da utilizada pela Portaria 686/98, mostrando assim que há uma padronização entre as legislações existentes.

Antes de um produto fabricado seguindo as normas de boas práticas de fabricação determinadas pela portaria 686/98 poder ser colocado no mercado, este precisa ser registrado junto ao órgão de Saúde competente no país de fabricação. Atualmente no Brasil este órgão é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A resolução RDC nº 206/06 lista os documentos necessários para o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*. A Tabela 6 a seguir traz a relação de documentos necessários para cada tipo de empresa (fabricante ou importador) e o embasamento legal de cada um deles. Dependendo do tipo de empresa e da classe de risco do produto as exigências de documentação para registro são maiores ou menores.

Tabela 6: Documentos necessários para o cadastramento ou registro de produtos para diagnóstico de uso in vitro no Brasil

Documentos	Dispositivo legal	Tipo de Fornecedor /Classe de risco							
		Fabricante				Importador			
		I	II	III	IIIa	I	II	III	IIIa
1. Folha de rosto	RDC 124 de 13/05/04								
2. Formulário disponibilizado no peticionamento eletrônico devidamente preenchido	RDC nº 206/2006	x	x	x	x	x	x	x	x
3. Via original do comprovante de pagamento da Taxa de Fiscalização de Vigilância Sanitária	RDC nº 206/2006	x	x	x	x	x	x	x	x
4. Cópia de licença de funcionamento do estabelecimento	RDC nº 206/2006	x	x	x	x	x	x	x	x
5. Modelo de rótulos	RDC nº 206/2006 Item 5.3.5 do Anexo				x				x
6. Modelo de instruções de uso	RDC nº 206/2006 Item 5.3.6 do Anexo				x				x
7. Relatório Técnico Simplificado	RDC nº 206/2006 Itens 5.2.4 e 4.1 do Anexo		x				x		
8. Relatório Técnico	RDC nº 206/2006 Itens 5.2.4; 5.3.4 e 4.2 do Anexo			x	x			x	x
9. Cópia do documento legal, no qual o fabricante do produto autoriza o solicitante a representar e comercializar seu produto no País, acompanhado de tradução juramentada em língua portuguesa.	RDC nº 206/2006 Itens 5.1.4.1; 5.2.5.1 e 5.3.7.1 do Anexo					x	x	x	x
10. Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle	Decreto 79049/77 Art. 17 Decreto 3961/2001		x	x	x		x	x	x
11. Relatório de Certificação de BPFeC ou Certificado de Livre Comércio do país de origem (cópia do original consularizado, acompanhada de tradução juramentada)	RDC nº 206/2006 Itens 5.2.5.2 e 5.3.7.2 do Anexo		x	x	x		x	x	x

Fonte: adaptada de <http://www.anvisa.gov.br/produtosaudefreg/cadastramento.htm> - acesso 25/04/07

Para fins de registro e cadastramento na ANVISA a resolução RDC n° 206/06 enquadra os produtos para diagnóstico de uso *in vitro* em classes, de acordo com o grau de risco. As classes são:

Classe I - são produtos (reagentes, controles e calibradores) que apresentam mínimo risco ao usuário, ao paciente e à saúde pública. Os produtos Classe I estão sujeitos a cadastramento.

Classe II - são produtos (reagentes, controles e calibradores) que apresentam médio risco ao usuário ou ao paciente e baixo risco à saúde pública. Os produtos Classe II estão sujeitos a registro.

Classe III - são produtos (reagentes, controles e calibradores) que apresentam alto risco ao usuário, ao paciente e/ou à saúde pública. Os produtos Classe III estão sujeitos a registro.

Classe IIIa - Produtos para Autoteste, sujeitos a registro.

O solicitante do registro enquadra seu produto de acordo com as classes acima, mas a autoridade sanitária pode não concordar com o enquadramento estabelecido pela empresa (fabricante/importador) e alterar a classe de risco, solicitando documentos adicionais, se necessário. Para evitar isto, há publicado no site da ANVISA uma listagem com as classes de enquadramento definidas pela ANVISA. Se o produto a ser registrado não estiver nesta listagem, a ANVISA, mediante consulta da empresa, informa o enquadramento e inclui na lista publicada no site.

Depois de analisado pela ANVISA e pelo INCQS, se for submetido à análise prévia, o produto pode ser aprovado, reprovado ou cair em exigência. Se o dossiê montado para registro do produto estiver incompleto, ou as informações enviadas não forem suficientes para sua análise, o processo cai em exigência e a empresa recebe um prazo para cumprimento dos itens solicitados. Caso a empresa não cumpra esta exigência o registro é indeferido. Tanto o indeferimento do registro como a aprovação do mesmo é publicado em diário oficial da união e a partir da data da publicação os produtos aprovados poderão ser comercializados.

4.1.2. A legislação de Banco de Sangue

A Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 24 de junho de 2004, determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.

Em seu item B.5.2.6.4 sobre a Doença de Chagas, determina que os candidatos com história de terem sido picados por Triatomíneo ou com diagnóstico clínico ou laboratorial de doença de Chagas, devem ser excluídos de forma permanente.

Já em seu item E.2.1 especifica a obrigatoriedade de realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade em todas as doações, para identificação das doenças transmissíveis pelo sangue.

Estes exames devem ser feitos em amostra colhida da doação do dia e ser testada com conjuntos diagnósticos (kits) registrados na ANVISA, em laboratórios específicos para tal fim.

Fica vedada a realização de exames em “pool” de amostras de sangue. Caso surjam novas tecnologias que tenham aplicação comprovada pela ANVISA para utilização em “pool” essa proibição será reconsiderada.

O sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais não reagentes, nos testes de detecção para:

- Hepatite B
- Hepatite C
- HIV-1/2
- Doença de Chagas
- Sífilis
- HTLV-I/II

O anexo VIII da Resolução RDC nº 153/04 apresenta os algoritmos para testagem de cada uma das doenças acima. Neste algoritmo, fica especificado, entre outros: “Doença de Chagas - Deverá ser realizado um teste imunoenzimático de alta sensibilidade” (Resolução RDC nº 153, 2004).

4.1.3. A legislação de validação

A portaria 686, em seu capítulo 6 pede que os produtos para diagnóstico *in vitro* sejam validados, mas não traz detalhes de como esta validação deve ser feita. Entretanto, existe uma norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) que traz procedimentos para validação de reagentes ou sistemas de diagnóstico. Esta norma, a NBR 14.864 de 2000, foi elaborada pelo CB-36 – Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico *in vitro*, CE-36:003.03 – Comissão de Estudo de Produto para Diagnóstico *in vitro* e foi baseada na ISO DIN 15.197:1998.

Este item foi elaborado com base na norma NBR 14.864 de 2000, porém detalhado e interpretado com base na experiência anterior sobre produção de reagentes e trabalho profissional de dez anos nessa área.

Poderíamos citar aqui diversas definições de validação, mas escolhemos as mais importantes e aplicáveis ao objetivo desta dissertação.

- a) **Validação:** Ação documentada para provar que um procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, realmente conduzem aos resultados esperados (Portaria 686, 1998).
- b) **Validação** com relação a um produto significa estabelecer e documentar evidência de que o produto está pronto para o uso pretendido. Com relação a um processo, significa estabelecer e documentar evidência de que o processo produzirá consistentemente um resultado que satisfaça as especificações predeterminadas e os atributos de qualidade (Resolução – RDC n° 59, 2000).
- c) **Validação** é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (Norma NBR 14.864, 2002).
- d) Consiste em estabelecer evidências documentadas, que proporcionem com alto grau de segurança, de que determinado procedimento quando executado sob condições pré-estruturadas e definidas seja capaz de reproduzir um serviço ou bem dentro das especificações e atributos de qualidade desejáveis. É parte integrante do Sistema de Qualidade e tem por escopo a confiabilidade dos processos (PINTO *et al*, 2000).

4.1.3.1. Objetivo

O processo de validação tem por objetivos: assegurar que as condições adequadas de exame e as instruções de uso estejam bem definidas; monitorar o desempenho do kit; avaliar a dimensão dos erros aleatório e sistemático, decidir sobre a aceitabilidade do kit; avaliar seu desempenho quanto à utilidade médica dos resultados obtidos, estabelecer condições ideais de uso, incluindo o controle de qualidade e desenvolver um plano de controle da qualidade para validar sua eficiência prospectivamente.

4.1.3.2. Procedimento

As atividades necessárias à validação, e os resultados obtidos em cada etapa, acompanhados de relatório de decisão, devem ser registrados em documentos controlados e arquivados, que comporão o relatório de validação.

Os modelos e resultados obtidos durante a validação serão repassados aos usuários na forma de informações de desempenho constantes das instruções de uso do produto.

A análise crítica dos resultados obtidos deve ser considerada na elaboração das condições de uso e de um plano de controle de qualidade, incluindo recomendações específicas ao usuário para obter o desempenho desejado do kit.

No procedimento de validação devem ser consideradas as seguintes características de desempenho: condições ideais de padronização, calibração do teste através do estabelecimento do *cut-off*, avaliação dos índices de sensibilidade e especificidade clínica, comparação de métodos avaliando índices de sensibilidade e especificidade relativas, repetitividade e reprodutibilidade, estabilidade dos componentes do kit e critérios de aceitabilidade dos resultados do ensaio.

Durante o processo de validação deve ser feita a etapa de elaboração ou revisão das instruções de uso, contemplando os aspectos importantes para garantir a eficiência do kit, bem como instruções específicas, se houver, para a assessoria técnico-científica. A instrução de uso, além das informações técnicas e metodológicas e de características de desempenho, deve dar destaque ao detalhamento do procedimento de execução do teste, permitindo que o operador execute a medição sem informações adicionais.

A análise crítica do controle de qualidade prospectivo e do acompanhamento de informações dos usuários deve contemplar a possibilidade de implementação da instrução de uso e ajustes na produção, se necessário.

4.1.3.3. Requisitos da Validação

Os requisitos da validação podem variar de acordo com a metodologia utilizada e tipo de reagentes que estão sendo empregados, sendo que alguns requisitos não se aplicam a determinados parâmetros. Devido à grande diversidade de metodologias utilizadas para diagnóstico *in vitro*, na elaboração deste trabalho sobre validação, adotamos como modelo um kit imunoenzimático para pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas).

Neste caso, devemos considerar as características do método imunoenzimático do exame, a utilidade médica dos resultados na seleção de doadores de sangue e órgãos e as condições de uso manual e automatizado do kit.

4.1.3.4. Validação durante o desenvolvimento do kit

Na fase de desenvolvimento de um produto novo, serão testadas diversas formulações, tempo de agitação, ordem de adição dos reagentes, temperatura, etc., até se chegar à formulação considerada “ideal” para aquele produto. Uma vez obtida esta formulação “ideal”, através do processo de validação, devemos simular situações de desvio e definir os limites máximos e mínimos permitidos para cada situação. Para realizar esta primeira etapa da validação, devemos definir quais são as etapas críticas do processo, ou seja, aquelas que interferem com a qualidade do produto. Uma vez definidas as etapas críticas do processo, temos que simular situações adversas às condições ideais e testar o produto em cada situação. Dentre as etapas críticas de um processo de produção de um kit imunoenzimático podemos citar as seguintes:

- água a ser utilizada na produção de seus componentes
- temperatura do ambiente onde está sendo realizada a produção
- ordem de adição das matérias primas para produção de cada componente
- quantidade de cada componente adicionado à formulação
- tempo de agitação
- tempo e temperatura de incubação

Exemplo: chegou-se à conclusão que um determinado componente de um kit imunoenzimático, conjugado, por exemplo, deveria permanecer sob agitação durante 1 hora após a adição de toda matéria prima. E se agitarmos por 50 minutos ou por 1 hora e 10 minutos, ao invés de 1 hora, há alguma interferência no resultado final? Para validar esta situação, devemos fazer simulações, ou seja, fabricar um lote deste conjugado e deixar agitando por apenas 30 minutos e testá-lo, deixar agitando por mais 10 minutos (40 no total) e testá-lo novamente, mais 10 minutos (50 minutos no total) e testá-lo novamente e assim por diante até ultrapassar o tempo de agitação dito ideal. Com isso podemos descobrir que uma variação de 10 minutos no tempo de agitação não interfere no processo, mas uma agitação inferior a 50 minutos, por exemplo, é insuficiente, enquanto que uma agitação superior a 1 hora e 10 minutos não interfere em nada no processo.

Esta etapa da validação nos ajuda a definir parâmetros e otimizar a produção. Se tivermos pressa em fazer o conjugado do exemplo acima e soubermos que uma agitação de 50 minutos é suficiente, não precisamos esperar 1 hora. Por outro lado, se o mesmo conjugado ficou pronto próximo ao horário de almoço, podemos tranquilamente deixá-lo agitando durante o almoço, pois sabemos que se passar de 1 hora de agitação não teremos problemas.

Depois disso, passamos para a validação do produto acabado, aonde vamos apenas confirmar que os limites impostos atendem aos requisitos pré-definidos. Para isso, fabricamos um lote do kit seguindo as orientações estabelecidas durante o desenvolvimento do mesmo e realizamos uma série de ensaios para verificar se este kit, fabricado nestas condições, cumpre com as especificações desejadas. Esta será a validação após o desenvolvimento do kit.

4.1.3.5. Validação após o desenvolvimento do kit

Após o desenvolvimento do kit e definição dos limites de variação para as etapas críticas do processo, o ideal é que a validação seja feita em três lotes do kit, já produzidos pela equipe que irá realmente fabricá-los.

4.2. Modelo de procedimentos

A Figura 3 mostra as principais etapas a serem consideradas no desenvolvimento de produtos para diagnóstico *in vitro* até registro do produto.

Figura 3: Etapas Básicas para Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Produtos

A Figura 4 mostra as principais etapas a serem consideradas na produção de produtos para diagnóstico *in vitro*.

Figura 4: Macro fluxo de Produção

O Anexo 1 traz um modelo de procedimento para a validação de produtos para uso diagnóstico *in vitro*. Este modelo pode ser adaptado a cada tipo de kit diagnóstico, de acordo com as exigências dos mesmos.

4.3. Desenvolvimento de um kit ELISA para Chagas

4.3.1. Produção

Para servir como modelo de desenvolvimento, produção, validação e registro de produto para diagnóstico de uso *in vitro*, optou-se pelo desenvolvimento de um kit ELISA para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas e triagem da infecção em doadores de sangue, tecidos e órgãos, pois se sentiu a necessidade de disponibilizar no mercado brasileiro um kit nacional que usasse o máximo de matérias-primas nacionais e que tivesse bom preço e atendesse às necessidades e exigências do mercado brasileiro.

Dessa forma, a primeira etapa no desenvolvimento deste produto foi definir as principais características do mesmo. O resultado encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7: Principais características do produto que se pretendia desenvolver.

	Chagas
Sensibilidade	100%
Especificidade	$\geq 99\%$
Reprodutibilidade	$CV < 20\%$
Apresentações	96 e 480 testes
Formato	ELISA Indireto ou sanduíche
Ag/Ac (placa)	Lisado do parasito enriquecido com antígeno recombinante
Conjugado	Anticorpo marcado com peroxidase, pronto para uso
Cromógeno	OPD ou TMB
Volume de amostra	$\leq 50 \mu\text{L}$
Tempos de Incubação	Total $\leq 3 \text{ hs}$
Alteração de cor do diluente ao acrescentar amostra	desejável
Controles coloridos	desejável

Com base nos dados da Tabela 7, cada um dos componentes do kit foi desenvolvido.

4.3.1.1. Painéis

Foram montados alguns painéis com soros positivos e negativos para serem utilizados na padronização e validação do kit em desenvolvimento. Devido à dificuldade em obter-se amostras positivas com títulos diferentes, algumas amostras positivas altas foram diluídas para simular amostras de menor reatividade.

A Tabela 8 abaixo traz os resultados de alguns dos painéis utilizados: painel de estabilidade, painel de desempenho e painel de titulação do conjugado.

Tabela 8: Resultados de Painéis Utilizados na validação do kit ELISA Chagas

Painel de Estabilidade									
Identificação da Amostra	Diluição	Alíquotas (quantidade x volume)	ELISA			ELISA			IF
			Gold ELISA T. cruzi IgG			CHAGATEK - BioMerieux			Título
			DO	CO	IR	DO	CO	IR	
CHAPE001-01	Pura	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	1,675	0,46	3,64	1,113	0,19	5,86	1/80
CHAPE001-02	1:20	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,731	0,46	1,59	0,461	0,19	2,43	...
CHAPE001-03	1:40	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,524	0,46	1,14	0,221	0,19	1,16	...
CHAPE001-04	Pura	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	1,807	0,46	3,93	1,200	0,19	6,32	1/80
CHAPE001-05	1:10	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,952	0,46	2,07	0,497	0,19	2,62	...
CHAPE001-06	1:20	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,651	0,46	1,41	0,276	0,19	1,45	...
CHAPE001-07	1:40	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,470	0,46	1,02	0,199	0,19	1,05	...
CHAPE001-08	Pura	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	1,779	0,46	3,87	1,173	0,19	6,17	1/80
CHAPE001-09	1:20	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,867	0,46	1,88	0,302	0,19	1,59	...
CHAPE001-10	1:40	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,527	0,46	1,15	0,229	0,19	1,21	...
CHAPE001-11	Pura	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,078	0,46	0,17	0,068	0,19	0,36	NR
CHAPE001-12	pool	50 x 0,1 mL + 50 x 0,2 mL + 5 x 1 mL	0,083	0,46	0,18	0,058	0,19	0,31	NR

(cont...)

(cont...)

Painel de Desempenho										
Identificação da Amostra	Diluição	Alíquotas (quantidade x volume)	ELISA Gold ELISA T. cruzi IgG			ELISA CHAGATEK - Biomerieux			HA	IFI
			DO	CO	IR	DO	CO	IR		
CHAPP-001-01	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	1,839	0,56	3,28	1,325	0,156	8,49	R	R
CHAPP-001-02	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	1,324	0,56	2,36	0,233	0,156	1,49	R	R
CHAPP-001-03	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	1,639	0,56	2,93	1,283	0,156	8,22	R	R
CHAPP-001-04	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	0,835	0,56	1,49	0,154	0,156	0,99	R	Inc
CHAPP-001-05	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	0,503	0,56	0,90	0,077	0,156	0,49	R	NR
CHAPP-001-06	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	0,234	0,56	0,42	0,482	0,156	3,09	R	NR
CHAPP-001-07	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	0,998	0,56	1,78	0,432	0,156	2,77	R	R
CHAPP-001-08	Pura	2 X 0,5 mL + 4 x 1,0 mL	1,192	0,56	2,13	0,468	0,156	3,00	R	R

(cont...)

(cont...)

Painel de Titulação do Conjugado										
Identificação da Amostra	Diluição	Alíquotas (quantidade x volume)	ELISA Gold ELISA T. cruzi IgG			ELISA CHAGATEK - Biomerieux			HA	IFI
			DO	CO	IR	DO	CO	IR		
CHATC001-01	1:2	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	1,949	0,434	4,49	...	...	...	...	1/160
CHATC001-02	1:40	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,894	0,434	2,06	...	...	...	...	...
CHATC001-03	1:40	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,742	0,434	1,71	...	...	...	...	...
CHATC001-04	1:60	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,681	0,434	1,57	...	...	...	...	...
CHATC001-05	1:20	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,912	0,434	2,10	...	...	...	...	...
CHATC001-06	1:40	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,680	0,434	1,57	...	...	...	...	...
CHATC001-07	1:60	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,522	0,434	1,20	...	...	...	...	...
CHATC001-08	Pura	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	1,650	0,434	3,80	...	...	...	...	1/40
CHATC001-09	1:20	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,626	0,434	1,44	...	...	...	...	...
CHATC001-10	1:40	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,362	0,434	0,83	...	...	...	...	...
CHATC001-11	Pura	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,066	0,434	0,15	...	...	...	...	NR
CHATC001-12	Pool	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,093	0,434	0,22	...	...	...	...	NR
CHATC001-13	Pool	10 x 0,5 mL + 2 x 2,5 mL	0,077	0,434	0,18	...	...	...	...	NR

Legenda: NR = não reagente / DO = densidade óptica; CO = cut-off; IR = índice de reatividade / Diluição = é a diluição da amostra em soro negativo, para simular uma amostra positiva baixa; Resultados ELISA = são os resultados obtidos para estas amostras em kits comerciais (IR $\geq$ 1,1 positivo, IR $\leq$ 0,9 negativo e IR entre 0,9 e 1,1 inconclusivo) e esperados no kit novo durante sua padronização e/ou produção.

4.3.1.2. Antígenos

O lisado parasitário foi obtido de cepas Y do *Trypanosoma cruzi* por extração física e química. Após extração dos antígenos foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida e Immunoblot *in house* para evidencição dos antígenos.

A Figura 5 mostra os resultados de Immunoblot realizado em alguns lotes de antígeno próximo de sua extração e após seis meses.

Figura 5: Resultados de Immunoblot de extratos físicos e químicos de *T. cruzi* de diferentes lotes e em tempos diferentes

Para efeito de validação e para determinar a validade de diferentes lotes dos diferentes antígenos utilizados, a eletroforese e o immunoblot foram feitos a intervalos de tempo pré-definidos e estão sendo repetidos periodicamente. Foram consideradas antigênicas as bandas de peso molecular na faixa de 20 a 94 kDa, com predomínio de reatividade na região de 30 a 65 kDa.

Podemos observar que não houve diferença significativa entre os diversos lotes de antígeno produzidos e nem nos intervalos de tempo testados por pelo menos 6 meses, demonstrando que a metodologia utilizada tanto na extração, como na purificação dos antígenos é eficiente e reprodutível.

Como pelo teste de immunoblot pode-se observar a presença de bandas de diferentes pesos moleculares entre as membranas preparadas com extratos físicos e químicos, optou-se por utilizar uma combinação dos dois extratos na sensibilização de microplacas.

4.3.1.3. Fase sólida

A fase sólida escolhida para este sistema ELISA foi microplacas plásticas, por permitirem a realização de múltiplos ensaios e automação.

Dos plásticos disponíveis para essa finalidade, o poliestireno é um plástico com pequena capacidade de ligação não covalente e mais adequado para proteínas. Há placas de poliestireno com alta, média e baixa capacidade de ligação de proteínas. Portanto, o primeiro teste a ser realizado foi a escolha do tipo de plástico.

Para tanto, foram utilizados três tipos de microplacas frente ao kit de referência Gold ELISA *T. cruzi* IgG: Costar Medium Binding (MB), Costar High Binding (HB) e Nunc Maxisorb (Max.). As mesmas foram igualmente sensibilizadas com os extratos físico e químico das Cepas Y *T. cruzi* e com o antígeno recombinante, na mesma concentração. Foi utilizado um protocolo padrão de sensibilização e bloqueio das microplacas.

Após a sensibilização das microplacas, essas foram testadas em uma reação de ELISA com todos os componentes do kit de referência. A Tabela 9 traz alguns

dos resultados, em densidade óptica, dos três tipos de placa, comparando-se à placa de referência.

Tabela 9: Densidades ópticas de amostras positivas e negativas em microplacas com diferentes tipos de plástico

Amostra n ^o	Resultado esperado	Densidade óptica			
		Tipo de placa			
		Referência	HB	MB	Max
Branco		0,160	0,132	0,124	0,130
CN	N	0,062	0,092	0,016	0,086
CN	N	0,057	0,085	0,019	0,066
SR	Inc	0,517	0,519	0,176	0,556
SR	Inc	0,466	0,454	0,132	0,464
SR	Inc	0,455	0,446	0,125	0,533
CP	P	1,769	2,099	1,675	2,040
CP	P	1,810	2,163	1,773	2,022
MCPS002	P	1,777	2,056	1,401	1,889
BM106905	P	1,855	1,941	1,414	1,777
B300104040911	Inc	0,440	0,159	0,048	0,130
Pool1	N	0,046	0,098	0,026	0,074
Pool2	N	0,027	0,089	0,026	0,084
61642	N	0,227	0,263	0,067	0,229
Pool 3	N	0,065	0,103	0,016	0,104
Pool 4	N	0,021	0,098	0,022	0,084
Média SR		0,479	0,473	0,144	0,518

Legenda: CN = controle negativo; SR = soro de referência; CP = controle positivo / N = negativo; Inc = inconclusivo; P = positivo / HB = placa tipo high binding (alta capacidade de ligação); MB = placa tipo medium binding (média capacidade de ligação); Max = placa tipo max sorb (máxima capacidade de ligação);

A partir da análise dos resultados verificou-se que as microplacas MB aparentemente não são adequadas para este teste, pois mostraram menor reatividade para as amostras positivas. Portanto, as microplacas MB foram descartadas como opção de uso para este ELISA. Tanto as microplacas HB e Max poderiam ser utilizadas. Optou-se por microplacas HB pela facilidade de aquisição e custo ligeiramente inferior.

Uma vez escolhido o tipo de plástico das microplacas, partiu-se para a padronização do processo de sensibilização e concentração de cada antígeno nas microplacas.

A Figura 6 resume as principais etapas de sensibilização.

Figura 6: Principais etapas de sensibilização de microplacas

Para definir a concentração dos antígenos a serem colocadas nas microplacas foram feitos diversos experimentos, inicialmente sensibilizando-se placas com cada antígeno individualmente e depois em combinação, com diversas concentrações diferentes. Sempre se comparando os resultados obtidos com aqueles da placa de referência, chegou-se à concentração ideal de antígenos.

4.3.1.4. Diluente de amostra

A partir de uma fórmula padrão produziu-se o Diluente de Amostras. Este diluente foi separado em alíquotas às quais foram adicionadas diferentes concentrações de um corante indicador, para verificar alteração de cor frente a diversas amostras.

A Tabela 10 mostra a leitura em densidade óptica (630 nm) de cada alíquota frente a amostras de soro ou plasma, em um dos ensaios, usando tiras de microplacas HB não sensibilizadas e a verificação visual de cor antes e após pipetagem das amostras.

A escolha da concentração de corante a ser utilizado baseou-se na visualização da mudança de cor (critério visual), pois para todas as concentrações testadas houve alteração significativa nas leituras de densidade óptica.

Tabela 10: Densidade óptica a 630 nm e cor do diluente de amostras com diferentes concentrações de corante (A, B, C e D), com e sem adição de amostras

	Concentração de corante: A			Concentração de corante: B			Concentração de corante: C			Concentração de corante: D		
Amostra nº	Diluente (X)	Diluente + amostra (Y)	Diferença (Y-X)	Diluente (X)	Diluente + amostra (Y)	Diferença (Y-X)	Diluente (X)	Diluente + amostra (Y)	Diferença (Y-X)	Diluente (X)	Diluente + amostra (Y)	Diferença (Y-X)
1	0,057	0,341	0,284	0,196	1,161	0,965	0,830	1,822	0,992	0,366	1,151	0,785
2	0,055	0,338	0,283	0,192	1,264	1,072	0,830	1,974	1,144	0,361	1,270	0,909
3	0,060	0,342	0,282	0,200	1,246	1,046	0,843	1,989	1,146	0,369	1,222	0,853
4	0,059	0,344	0,285	0,198	1,259	1,061	0,844	1,989	1,145	0,365	1,213	0,848
5	0,057	0,348	0,291	0,197	1,279	1,082	0,839	1,968	1,129	0,366	1,252	0,886
Albumina 20%	0,060	0,213	0,153	0,198	0,958	0,760	0,841	1,928	1,087	0,368	1,070	0,702
Albumina 20%	0,060	0,212	0,152	0,197	0,958	0,761	0,853	1,928	1,075	0,373	1,516	1,143
Leitura visual	verde claro	azul claro		alaranja do	marrom azulado		vinho	vinho		castanho	castanho	

Comparando as alterações de cor e leituras das diversas soluções, concluiu-se que a concentração ideal de corante estaria entre a concentração A e B. Portanto, prepararam-se mais algumas concentrações intermediárias entre A e B chegou-se à concentração ideal de corante indicador e à formulação final do Diluente de Amostras.

4.3.1.5. Conjugado

Para produzir um conjugado que atendesse as características do kit em desenvolvimento, foram adquiridos anticorpos monoclonais anti-IgG humana e anti-IgM humana marcados com peroxidase.

Para titular os conjugados, inicialmente foram feitas diluições de cada conjugado individualmente em diluente do conjugado. Posteriormente foram feitas misturas de ambos os conjugados.

Devido à dificuldade de obter amostras Chagas IgM positivas, nas alíquotas dos conjugados anti-IgM, verificou-se que não houve inespecificidade em amostras negativas, e uma amostra IgM positiva deu resultado positivo.

Para as alíquotas dos conjugados anti-IgG, foram encontrados títulos que produziram bons resultados.

Foram então feitas misturas desses dois conjugados, IgG e IgM, para obter o que fornecesse resultados mais satisfatórios (melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas).

Para cada novo lote de componentes esta titulação é refeita, pois pode haver variações nas concentrações dos anticorpos marcados, antígenos nas microplacas, etc.

A Tabela 11 traz exemplos de leituras em densidade óptica e índice de reatividade de amostras positivas e negativas frente a duas combinações de conjugado anti-IgG e anti-IgM em títulos diferentes.

Tabela 11: Resultados de amostras positivas e negativas de painel frente a diferentes combinações de conjugado anti-IgG e anti-IgM

	Combinação A		Combinação B	
Amostra nº	OD	IR	OD	IR
Cut-off (NCx + 0,200)		0,245		0,294
Branco	0,066		0,076	
CN	0,048	0,20	0,093	0,32
CN	0,047	0,19	0,093	0,32
CN	0,041	0,17	0,096	0,33
CP	0,762	3,11	1,364	4,64
CP	0,815	3,33	1,333	4,53
CHATC001-01	0,782	3,19	1,330	4,52
CHATC001-02	0,368	1,50	0,630	2,14
CHATC001-03	0,269	1,10	0,438	1,49
CHATC001-04	0,195	0,80	0,355	1,21
CHATC001-05	0,489	2,00	0,813	2,77
CHATC001-06	0,341	1,39	0,611	2,08
CHATC001-07	0,307	1,25	0,491	1,67
CHATC001-08	0,615	2,51	1,068	3,63
CHATC001-09	0,154	0,63	0,292	0,99
CHATC001-10	0,099	0,40	0,174	0,59
CHATC001-11	0,033	0,13	0,059	0,20
CHATC001-12	0,062	0,25	0,114	0,39
CHATC001-13	0,040	0,16	0,078	0,27
Neg 1	0,230	0,94	0,107	0,36
Neg 2	0,036	0,15	0,061	0,21
Neg 3	0,041	0,17	0,077	0,26
Neg 4	0,066	0,27	0,121	0,41

Legenda: CN = controle negativo; CP = controle positivo / DO = densidade óptica; IR = índice de reatividade / CHATC001-01 a 13 = amostras do painel de titulação do conjugado da Tabela 8 / As Combinações A-e B são misturas e têm a mesma concentração de anticorpos anti-IgM, variando as concentrações de anticorpos anti-IgG.

Foram feitos também estudos de estabilidade para verificar se este conjugado se manteria estável por pelo menos 6 meses quando armazenado de 2 a 8°C.

A Figura 7 mostra alguns dos resultados de estabilidade acelerada realizada para o conjugado mantido por 17 dias a 37°C. O conjugado não perdeu reatividade neste período, mas o estudo foi interrompido, pois não havia mais volume do mesmo.

Controle Negativo

Controle Positivo

Amostra Positiva Baixa

Figura 7: Estabilidade acelerada a 37°C para o conjugado do kit Chagas.

4.3.1.6. Substrato

A Figura 8 mostra, a título de exemplo, alguns dos resultados dos testes realizados com vários tempos de incubação do substrato no kit ELISA para Chagas. Conclui-se que o tempo de incubação ideal é de 15 minutos.

Controle Negativo

Controle Positivo

Amostra Positiva Baixa

Figura 8: Tempos de incubação do substrato no kit Chagas

(Ensaio 1 = 5 min; 2 = 10 min, 3 = 12 min, 4 = 13 min, 5 = 14 min, 6 = 15 min, 7 = 16 min, 8 = 17 min, 9 = 20 min, 10 = 25 min, 11 = 30 min)

4.3.1.7. Solução de Lavagem

Os testes realizados com diferentes ciclos de lavagem mostraram que para esta formulação da solução de lavagem o número de ciclos de lavagem ideal é cinco, podendo variar de 4 a 7 ciclos, com tempo de molho de 25 segundos.

4.3.1.8. Solução Bloqueadora

Durante o desenvolvimento desta solução foram testados dois tipos de ácido diferentes em diversas concentrações. Decidiu-se utilizar o ácido clorídrico 1M devido ao seu melhor desempenho na reação. Foram testados também volumes diversos deste ácido. Percebeu-se que diversos destes volumes davam resultados semelhantes entre si e compatíveis com o esperado. Decidiu-se então, que o melhor volume para bloqueio da reação seria 100 μL , pois é um valor de fácil pipetagem, e volume de pipeta que a maioria dos laboratórios possui.

A Figura 9 mostra alguns dos resultados dos testes realizados com volumes diferentes de solução bloqueadora.

Controle Negativo

Controle Positivo

Amostra Positiva Baixa

Figura 9: Volume da Solução bloqueadora no kit Chagas

(Ensaio: 1 = 25 μ L, 2 = 50 μ L, 3 = 75 μ L, 4 = 80 μ L, 5 = 90 μ L, 6 = 100 μ L, 7 = 110 μ L, 8 = 125 μ L, 9 = 150 μ L, 10 = 175 μ L)

4.3.1.9. Controles

4.3.1.9.1. Controle Negativo

O Controle Negativo é utilizado como um dos critérios de aceitação de um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA.

Considerando que a densidade óptica média obtida com o kit em desenvolvimento em população normal de doadores de sangue foi cerca de 0,100 e que o Controle Negativo do kit deve simular uma amostra negativa, estipulou-se que a densidade óptica do mesmo deveria ser inferior a 0,200 e superior a -0,005 (valores de DO inferiores a -0,005 para as amostras podem ser indicativos de ausência de pipetagem da mesma).

O Controle Negativo entrou na composição do cálculo do cut-off do kit ELISA para Chagas.

4.3.1.9.2. Controle Positivo

O Controle Positivo é utilizado como um dos critérios de aceitação de um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA.

Considerando que a densidade óptica média obtida com o kit em desenvolvimento em amostras caracterizadas como positivas para a doença de Chagas foi superior a 0,500 e que o Controle Positivo do kit deve simular uma amostra positiva, estipulou-se que a densidade óptica do mesmo deveria ser superior a 0,500.

4.3.1.10. Produto Final

Assim que ficou definida a fórmula padrão de cada componente do kit ELISA para Chagas, os procedimentos e protocolos utilizados durante o período de pesquisa e desenvolvimento foram reformulados e aprovados pela Farmacêutica Responsável e pela Garantia da Qualidade da REM Indústria e Comércio Ltda., com a finalidade de atender todos os requisitos de qualidade definidos pelo Ministério da Saúde / ANVISA / INCQS.

Foram feitos os modelos de rótulos de cada componente e rótulo externo do kit. As Figura 10 e 11 mostram o modelo de rótulo externo do kit ELISA para Chagas e o modelo do rótulo interno de 2 componentes do kit.

ELISA CHAGAS

Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*T.cruzi* em soro ou plasma humano. / Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to IgG and IgM *anti T. cruzi* in human serum or plasma. / Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*T.cruzi* en suero o plasma humanos.

Conteúdo do kit/ Kit Contents/ Contenido del Kit:	
Descrição dos componentes/ Components description/ Descripción de los componentes	480
Microplaca sensibilizada com antígeno <i>T.cruzi</i> / <i>T. cruzi</i> antigen Coated Microplate/ Microplaca recubierta con antígeno <i>T. cruzi</i>	5 Microplacas/ 5 Microplates/ 5 Microplacas
Diluyente de Amostra/ Specimen Diluent/ Diluyente de la Muestra	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (125 mL)
Controle Positivo/ Positive Control / Control Positivo	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (1,2 mL)
Controle Negativo / Negative Control / Control Negativo	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (1,8 mL)
Solução de Lavagem Concentrada 20x / 20x Wash Buffer Concentrate / Tampón de Lavado Concentrado 20X	3 frascos / 3 vials/ 3 frascos (100 mL)
Conjugado Enzimático / Enzyme Conjugate/ Conjugado Enzimático	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (125 mL)
Tampão Substrato-Cromógeno / Chromogen-Substrate Buffer/ Tampón Sustrato-Cromogeno	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (125 mL)
Solução bloqueadora/ Stopping Reagent / Reactivo Bloqueante	1 frasco / 1 vial/ 1 frasco (75 mL)
Selos adesivos, descartáveis /Plate sealers, disposable / Adhesivos, desechables	20 unidades/ 20 units / 20 unidades
Instrução de uso / Instructions for Use / Instrucciones para uso	1 unidade/ 1 unit / 1 unidad
<div> </div> <div> </div> <div> </div>	

Lote:

Validade:

Registro ANVISA MS n°:

Responsável Técnico:

Fabricado por:

Distribuído por:

Figura 10: Modelo de rótulo externo de acordo com a legislação

Figura 11: Modelo de rótulos internos de acordo com a legislação

Legenda dos símbolos:

Para uso diagnóstico in vitro.

Potencialmente Infectante.

Corrosivo e Irritante para os órgãos respiratórios.

480

Suficiente para 480 testes.

Nº de Lote.

Data de Validade.

Armazenar de 2-8°C

Atenção: Consultar as Instruções de Uso

4.3.2. Validação

4.3.2.1. Validação de kit imunodiagnóstico ELISA

Fazem parte da validação do produto final os estudos de estabilidade, os testes analíticos para avaliação de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, reações cruzadas, etc. e os testes clínicos realizados em campo. Alguns testes da validação foram realizados já durante a produção dos lotes piloto do kit.

4.3.2.1.1. Testes Analíticos

4.3.2.1.1.1. Sensibilidade e especificidade

A Tabela 12 a seguir mostra a distribuição das amostras positivas e negativas testadas para três lotes piloto do novo kit de Chagas e os respectivos índices de sensibilidade e especificidade obtidos para cada um deles.

Tabela 12: Distribuição de amostras randômicas negativas e amostras positivas

Resultados Kit protótipo –lote piloto A	Grupo			Total
	Amostras Positivas	Amostras randômicas negativas		
		Congeladas	Frescas	
Reagente	208 (100%)	5 (0,4%)	5 (0,5%)	224
Não reagente	-	1.533 (99,6%)	967 (99,5%)	2.494
Total	208	1.538	972	2.718

Resultados Kit protótipo –lote piloto B	Grupo			Total
	Amostras Positivas	Amostras randômicas negativas		
		Congeladas	Frescas	
Reagente	103 (100%)	2 (0,6%)	-	105
Não reagente	-	350 (99,4%)	823 (100%)	1.173
Total	103	352	823	1.278

Resultados Kit protótipo –lote piloto C	Grupo			Total
	Amostras Positivas	Amostras randômicas negativas		
		Congeladas	Frescas	
Reagente (IR ≥ 0,9)	216 (100%)	0 (0%)	6 (0,2%)	222
Não reagente (IR < 0,9)	-	52 (100%)	3.943 (99,8%)	3.995
Total	216	52	3.949	4.217

4.3.2.1.1.2. Limite de detecção

Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas 10 amostras caracterizadas como positivas para a doença de Chagas pelo método de referência Imunofluorescência Indireta (IFI). Essas amostras apresentaram títulos variados no teste de IFI. Observou-se uma tendência de quanto maior o título de IFI, maior a absorbância no ELISA, embora sem correlação importante. A Figura 12 traz os resultados destes testes.

Figura 12: Limite de detecção: correlação entre título de imunofluorescência e ELISA para Chagas

4.3.2.1.1.3. Análise de interferentes

Em todas as apresentações dos lotes piloto foram ensaiadas 3 amostras caracterizadas como negativas para a doença de Chagas e lipêmicas e/ou hemolisadas. A Tabela 13 traz alguns resultados destes testes.

Tabela 13: Resultados dos testes para análise de interferentes

Identificação da amostra	Característica da amostra	LOTE A		LOTE B*		LOTE C	
		DO	IR	DO	IR	DO	IR
727117 / 75800*	lipêmica	0,076	0,29	0,037	0,17	0,129	0,44
73174 / 75819*	lipêmica	0,073	0,28	0,030	0,14	0,130	0,44
73274 / 75903*	lipêmica	0,032	0,12	0,074	0,33	0,078	0,27
73100 / 75553*	hemolisada	0,020	0,08	0,085	0,38	0,079	0,27
73242 / 75841*	hemolisada e lipêmica	0,033	0,13	0,033	0,15	0,118	0,40
72203 / 75566*	hemolisada	0,057	0,22	0,050	0,23	0,104	0,35

* Estas amostras foram utilizadas no lote B, pois não havia volume suficiente das outras amostras para realização destes testes.

Legenda: DO = densidade óptica; IR = índice de reatividade

A análise desses resultados permite afirmar que os três lotes piloto demonstraram comportamento similar, sendo que as amostras caracterizadas como negativas para a doença de Chagas, lipêmicas e/ou hemolisadas, apresentaram resultados negativos no kit ELISA para Chagas.

4.3.2.1.1.4. Reação Cruzada

Inicialmente foram testadas, em todos os lotes piloto, amostras caracterizadas como negativas para a doença de Chagas, porém positivas para outras patologias ou com fator reumatóide positivo. A Tabela 14 traz alguns dos resultados destes testes.

Tabela 14: Resultados dos testes para reação cruzada

Identificação da amostra	Característica da amostra	LOTE A		LOTE B		LOTE C	
		DO	IR	DO	IR	DO	IR
PHG201-15	HBc	0,078	0,30	0,059	0,26	0,147	0,50
PHG201-16	HBc	0,057	0,22	0,046	0,20	0,127	0,43
PHV205-23	HCV	0,086	0,33	0,067	0,29	0,134	0,46
PHV205-24	HCV	0,030	0,12	0,037	0,16	0,091	0,31
PRP206-01	HTLV I/II	0,020	0,08	0,013	0,06	0,055	0,19
PRP206-02	HTLV I/II	0,084	0,32	0,065	0,28	0,136	0,46
PRZ204-12	HIV 1/2	0,068	0,26	0,087	0,38	0,104	0,35
PRZ204-14	HIV 1/2	0,137	0,53	0,110	0,48	0,187	0,64
PHA204M-10	HBsAg	0,052	0,20	0,055	0,24	0,114	0,39
PHA204M-14	HBsAg	0,098	0,38	0,080	0,35	0,139	0,47
725486	Fator reumatóide	0,263	1,01	0,130	0,59	0,250	0,85
725694	Fator reumatóide	0,121	0,47	0,098	0,44	0,169	0,58
143	Fator reumatóide	0,402	1,55	0,205	0,93	0,271	0,92

Legenda: HBc = amostra com presença de anticorpos anti-antígeno core da hepatite B; HCV = presença de anticorpos anti-hepatite C; HTLV I/II = presença de anticorpos anti-HTLV I e/ou II; HIV 1/2 = presença de anticorpos anti-HIV 1 e/ou 2; HbsAg = presença de antígeno de superfície da hepatite B / DO = densidade óptica; IR = índice de reatividade

A análise desses resultados permite afirmar que todas as apresentações dos lotes piloto apresentaram um comportamento similar e que o kit ELISA para Chagas apresentou reação cruzada apenas para as amostras positivas para fator reumatóide, pois essas amostras apresentaram leituras de D.Os mais altas no kit ELISA para Chagas, sendo caracterizadas como zona cinza ou positivas para a doença de Chagas. Essa informação constará na Instrução de Uso do kit comercial, como alerta aos usuários.

Após o estudo inicial de Reação Cruzada decidiu-se partir para uma nova fase, a qual teve a finalidade de complementar e reforçar a confiabilidade do teste. O lote escolhido para a realização desses novos ensaios foi o LOTE C, uma vez que os diferentes lotes apresentaram comportamento similar e que se tratava do lote com maior disponibilidade na ocasião.

Nessa etapa, amostras de indivíduos não chagásicos e sabidamente doentes para outras infecções, que eventualmente podem apresentar reações cruzadas, foram testadas no kit protótipo e no kit de referência.

Devido à dificuldade de encontrar amostras positivas apenas para uma doença específica, o número de amostras da rotina testadas para alguns tipos de doença foi inferior ao inicialmente planejado.

Foram testadas também amostras positivas para *Leishmania* e os resultados demonstraram que estas amostras, podem interferir nos resultados do kit ELISA para Chagas, podendo gerar resultados falso-positivos.

A Tabela 15 traz um resumo destes resultados.

Tabela 15: Resumo dos Estudos de Interferentes e Reação Cruzada

	Tipo de Amostra	n	Resultado Falso Positivo
Interferentes	Lipêmica	9	0
	Ictérica	9	0
	Hemolisada	32	1
Reação cruzada	Fator Reumatóide	8	2
	Fator anti-núcleo (FAN)	16	0
	HCV	17	0
	HTLV	10	0
	HIV	10	0
	HBV	21	0
	CMV	2	0
	Rubéola	1	0
	Sífilis	10	0
	EBV	8	0
	Leishmaniose	16	7

Essa informação constará na Instrução de Uso do kit comercial, como alerta aos usuários.

4.3.2.1.1.5. Repetitividade

Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas. Para cada ensaio realizado utilizou-se o mesmo conjunto de pipetas e o mesmo operador durante todo o teste. A Figura 13 mostra a distribuição dos índices de reatividade da amostra positiva baixa e da amostra negativa. Vale ressaltar que as amostras utilizadas não foram as mesmas para os três lotes.

Figura 13: Distribuição dos índices de reatividade de amostras positiva e negativa em estudo de repetitividade para uma amostra positiva e uma amostra negativa (a linha representa a média dos valores)

A Tabela 16 traz os coeficientes de variação para a amostra positiva e negativa nos três lotes pilotos.

Tabela 16: Coeficiente de variação de amostras positiva e negativa na repetitividade

	LOTE A	LOTE B	LOTE C
Amostra positiva	14,2%	7,3%	14,2%
Amostra negativa	12,9%	23,3%	16,6%

A amostra positiva apresentou reatividade em todas as replicatas e o coeficiente de variação do índice de reatividade foi inferior ao limite máximo estabelecido de 20% para todos os lotes.

A amostra negativa apresentou resultados negativos em todas as replicatas, ficando dentro dos critérios esperados ($CV < 25\%$), para todos os lotes.

4.3.2.1.1.6. Reprodutibilidade

Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, por dia em uma mesma microplaca, 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas. Esse ensaio foi repetido em 5 dias diferentes, variando os operadores e as pipetas das reações.

A Figura 14 mostra a distribuição dos índices de reatividade da amostra positiva baixa e da amostra negativa. Vale ressaltar que as amostras utilizadas não foram as mesmas para os três lotes.

Figura 14: Distribuição dos índices de reatividade de amostras positiva e negativa em estudo de reprodutibilidade para uma amostra positiva e uma amostra negativa (a linha representa a média dos valores)

A Tabela 17 traz os coeficientes de variação para a amostra positiva e negativa nos três lotes pilotos.

Tabela 17: Coeficiente de variação dos índices de reatividade de todas as replicatas das amostras positiva e negativa na reprodutibilidade

	LOTE A	LOTE B	LOTE C
Amostra positiva	10,9%	13,1%	15,2%
Amostra negativa	13,4%	14,7%	17,6%

A amostra positiva apresentou reatividade em todas as replicatas e o coeficiente de variação do índice de reatividade foi menor que o limite máximo aceitável de 25%.

A amostra negativa apresentou resultados negativos em todas as replicatas, ficando dentro dos critérios esperados.

4.3.2.1.1.7. Avaliação de Soro x Plasma

Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas três amostras classificadas como não reagentes para a doença de Chagas, coletadas nas seguintes condições:

- Soro coletado em tubo seco;
- Soro coletado em tubo com gel separador;
- Plasma coletado com EDTA como anticoagulante;
- Plasma coletado com citrato como anticoagulante;
- Plasma coletado com heparina como anticoagulante.

Além disso, também foram ensaiadas estas mesmas amostras acrescidas de amostra positiva. O fator de diluição utilizado para a adição da amostra positiva foi 1:2 para todas as amostras negativas.

As tabelas 17 e 18 mostram os índices de reatividade para a amostra negativa e positiva nos três lotes pilotos.

Tabela 18: Índices de Reatividade de amostras negativas colhidas com diversos tipos de tubo

Identificação da amostra	Índice de Reatividade		
	LOTE A	LOTE B	LOTE C
PQ006 Soro Seco	0,56	0,41	0,42
PQ006 Soro Gel	0,50	0,44	0,46
PQ006 Plasma EDTA	0,46	0,42	0,45
PQ006 Plasma Citrato	0,34	0,35	0,39
PQ006 Plasma Heparina	0,45	0,43	0,50
PQ007 Soro Seco	0,29	0,25	0,40
PQ007 Soro Gel	0,31	0,28	0,39
PQ007 Plasma EDTA	0,35	0,28	0,39
PQ007 Plasma Citrato	0,50	0,28	0,32
PQ007 Plasma Heparina	0,37	0,29	0,39
PQ009 Soro Seco	0,14	0,26	0,41
PQ009 Soro Gel	0,14	0,25	0,41
PQ009 Plasma EDTA	0,10	0,22	0,39
PQ009 Plasma Citrato	0,13	0,17	0,32
PQ009 Plasma Heparina	0,18	0,22	0,42

Tabela 19: Índices de Reatividade de amostras negativas colhidas com diversos tipos de tubo, acrescidas de amostras positivas

Identificação da amostra	Índice de Reatividade		
	LOTE A	LOTE B	LOTE C
PQ006 Soro Seco + 2018	4,25	2,77	2,23
PQ006 Soro Gel + 2018	4,36	3,11	2,35
PQ006 Plasma EDTA + 2018	4,13	2,79	2,17
PQ006 Plasma Citrato + 2018	3,89	2,7	2,28
PQ006 Plasma Heparina + 2018	3,93	2,71	2,26
PQ007 Soro Seco + 2018	3,77	2,64	2,43
PQ007 Soro Gel + 2018	3,51	2,69	2,55
PQ007 Plasma EDTA + 2018	4,02	2,61	2,76
PQ007 Plasma Citrato + 2018	4,42	2,73	2,65
PQ007 Plasma Heparina + 2018	4,72	3,06	2,57
PQ009 Soro Seco + 2018	4,42	3,1	2,4
PQ009 Soro Gel + 2018	4,33	2,9	2,41
PQ009 Plasma EDTA + 2018	4,47	2,81	2,69
PQ009 Plasma Citrato + 2018	4,27	2,81	2,59
PQ009 Plasma Heparina + 2018	4,09	2,61	2,73

Todas as amostras negativas apresentaram resultados não reagentes nas alíquotas de soro e plasma, enquanto todas as alíquotas das amostras negativas acrescidas de positiva apresentaram resultados positivos, indicando a não interferência dos diferentes anticoagulantes na obtenção de plasma em relação ao soro.

4.3.2.1.1.8. Avaliação das condições de armazenamento de amostras

As amostras utilizadas para a Avaliação de Soro versus Plasma foram congeladas a -20°C por sete dias, depois foram descongeladas e testadas novamente. Os testes foram repetidos por mais 5 ciclos de congelamento/descongelamento, com intervalo de pelo menos 2 dias entre cada ciclo.

O Anexo 2 mostra os índices de reatividade para a amostra negativa e positiva nos três lotes pilotos após vários ciclos de congelamento e descongelamento.

A título de exemplo, a Figura 15 traz os resultados, em índice de reatividade, de uma amostra positiva no Lote C após cinco ciclos de congelamento e descongelamento

Figura 15: Índices de Reatividade de uma amostra positiva após cinco ciclos de congelamento e descongelamento

Durante os cinco ciclos de congelamento/descongelamento, as amostras negativas apresentaram resultados não reagentes para alíquotas de soro e plasma, enquanto todas as alíquotas das amostras negativas acrescidas de positiva apresentaram resultados positivos, indicando que esse tipo de armazenamento

assegura as propriedades da amostra, independente do anticoagulante utilizado na obtenção desta.

4.3.2.1.1.9. Estudo comparativo de Desempenho com kit Comercial

Como este kit é um produto para ser comercializado, este teste é importante para demonstrar que o mesmo é melhor ou igual aos já existentes no mercado. Esse estudo foi realizado também para cumprir exigências da legislação brasileira para registro de produtos.

Durante os testes de validação todas as apresentações mostraram resultados semelhantes, portanto, essa análise de Concordância de Desempenho foi realizada apenas com o lote C.

Para verificar a concordância com teste comercial no lote C do novo kit ELISA Chagas, foram ensaiadas 3.183 amostras, entre positivas e negativas para a doença de Chagas, em paralelo com um kit comercial aprovado pela ANVISA (Gold ELISA T. cruzi IgG). Os resultados estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 20: Comparação de desempenho do novo kit ELISA Chagas e kit comercial

		Novo kit ELISA CHAGAS		Total
		Positivo	Negativo	
Kit comercial	Positivo	199	3	202
	Negativo	14	2.967	2.981
Total		213	2.970	3.183

As 17 amostras discordantes entre os testes foram negativas no teste de referência IFI e podem ser consideradas falso-positivas em um dos dois kits.

Utilizando-se o programa de tratamento estatístico Win Episcope 2.0, foi calculada a concordância e o índice kappa (k). O índice Kappa é um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração, descontando no cômputo final, a concordância devida ao fator chance. O cálculo do Kappa corrige estas distorções. O seu valor varia de “menos 1” (completo desacordo) a “mais 1” (concordância total).

A interpretação dos valores escolhida foi a de Pereira (1995) e de Andrade e Zicker (1997):

Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

O teste em questão apresentou concordância de 99,5% e índice kappa (IC 95%) de 0,959 (0,921 – 0,991), demonstrando ótima correlação entre os kits testados.

4.3.2.1.2. Estudos de Estabilidade

4.3.2.1.2.1. Estabilidade acelerada

Em todos os lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de diluição em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas em duplicata. A taxa de decaimento de reatividade é comparada com um kit Controle (armazenado de 2 a 8°C) através da inclinação da reta (p).

Com a perda da estabilidade, espera-se a queda de reatividade das amostras. O que normalmente indica esta perda de reatividade são as amostras positivas. As amostras negativas são colocadas apenas como controle para verificar se a degradação do kit não afeta a negatividade das mesmas.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear nos quais é possível observar por quanto tempo o kit mantém-se estável.

A título de exemplo, a Figura 16 traz os resultados de estabilidade acelerada para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

Figura 16: Estabilidade acelerada dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

A análise de todos os resultados demonstra que o lote A perdeu a estabilidade entre o 10º e o 13º dia, quando a amostra positiva baixa apresentou índice de reatividade inferior a 1,0. O lote B perdeu estabilidade entre o 10º e o 14º dia, quando a amostra positiva baixa apresentou índice de reatividade inferior a 1,0. E o lote C perdeu estabilidade entre o 10º e o 13º dia, quando a D.O. do controle positivo tornou-se inferior a 0,500 (limite inferior do critério de aceitação estabelecido na Instrução de Uso).

4.3.2.1.2.2. Estabilidade de kit aberto

No primeiro dia de ensaio (dia zero) todos os componentes do kit foram abertos e depois de ensaiados, voltaram a ser armazenados conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C).

Os ensaios foram realizados durante 5 dias consecutivos e depois, uma vez por semana por mais 11 semanas.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear nos quais é possível observar se o kit mantém-se estável.

A título de exemplo, a Figura 17 traz os resultados de estabilidade de kit aberto para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e para uma amostra positiva baixa.

Figura 17: Estabilidade de kit aberto dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

A análise dos resultados demonstra que os três lotes do kit se mantiveram estáveis por pelo menos 70 dias depois de abertos.

4.3.2.1.2.3. Estabilidade de kit em uso

Neste teste os componentes só foram abertos conforme a necessidade do uso. Os testes foram realizados semanalmente e após cada ensaio o kit voltou a ser armazenado conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C).

Nos três lotes piloto foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de diluição em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas, em duplicata.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear nos quais é possível observar se o kit mantém-se estável.

A título de exemplo, a Figura 18 traz os resultados de estabilidade de kit aberto para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e para uma amostra positiva baixa.

Figura 18: Estabilidade de kit em uso dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

A análise dos resultados demonstra que os três lotes do kit se mantiveram estáveis por pelo menos 60 dias depois de abertos.

4.3.2.1.2.4. Estabilidade à temperatura ambiente

Os kits em teste foram testados no dia zero e incubados em sala climatizada, com a temperatura ambiente controlada (19°C a 27°C).

Nos três lotes piloto foram ensaiadas, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de diluição em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas em duplicata.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear nos quais é possível observar se o kit mantém-se estável.

A título de exemplo, a Figura 19 traz os resultados de estabilidade à temperatura ambiente para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e para uma amostra positiva baixa.

Figura 19: Estabilidade à temperatura ambiente dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

A análise dos resultados demonstra que os três lotes do kit se mantiveram estáveis por pelo menos 90 dias quando mantidos à temperatura ambiente.

4.3.2.1.2.5. Estabilidade em tempo real

Neste estudo os testes foram realizados mensalmente durante pelo menos 12 meses e após cada ensaio o kit foi armazenado conforme indicado na Instrução de Uso (2 a 8°C).

Nos três lotes piloto foram ensaiados, em uma mesma microplaca, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras de um painel de diluição em duplicata e 9 amostras negativas para a doença de Chagas em duplicata.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear, nos quais é possível observar se o kit mantém-se estável. Uma tendência de queda de reatividade poderá ser observada devido à degradação natural do kit durante o período de sua validade; porém, esse decaimento não pode alterar o desempenho do kit quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, pelo período de validade do mesmo.

A título de exemplo, a Figura 20 traz os resultados de estabilidade em tempo real para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e para uma amostra positiva baixa.

O vencimento do kit é estipulado no momento da fabricação do mesmo, considerando-se o vencimento do componente que vence primeiro. Os estudos de estabilidade em tempo real são feitos para verificar se o kit permanece estável por todo período de validade atribuída.

Controle Positivo – Lote piloto A

Amostra Positiva baixa – Lote piloto A

Controle Positivo – Lote piloto B

Amostra Positiva baixa – Lote piloto B

Controle Positivo – Lote piloto C

Amostra Positiva baixa – Lote piloto C

Figura 20: Estabilidade em tempo real dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa.

A análise dos resultados demonstra que os três lotes do kit se mantiveram estáveis por pelo menos 12 meses, confirmando os 7 dias de estabilidade acelerada a 37°C.

4.3.2.1.2.6. Estabilidade a temperaturas extremas

Foram realizadas duas simulações de transporte de um kit. A primeira consiste na simulação de um envio normal de kit (grupo 1). A segunda (grupo 2) refere-se a simulação de desvio no envio de kit. Os testes foram realizados mensalmente até perda da estabilidade.

Os resultados dos índices de reatividade de cada amostra foram colocados nos seus respectivos gráficos de regressão linear, nos quais é possível observar se o kit mantém-se estável ou não. Para a simulação do grupo 1 uma tendência de queda de reatividade poderá ser observada devido a degradação natural do kit durante o período de sua validade; porém, esse decaimento não pode alterar o desempenho do kit quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade. Os resultados da simulação do grupo 2 vão indicar o efeito do desvio de procedimento de transporte.

A título de exemplo, a Figura 21 traz os resultados de estabilidade à temperaturas extremas para os lotes piloto A, B e C para o controle positivo e para uma amostra positiva baixa, para o grupo 1 e a Figura 22 para o grupo 2.

Figura 21: Estabilidade a temperaturas extremas dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa – Grupo 1

Figura 22: Estabilidade a temperaturas extremas dos lotes piloto A, B e C com o controle positivo e uma amostra positiva baixa – Grupo 2

4.3.3. Estudos Clínicos

Foram realizados testes no lote C do kit ELISA Chagas em 5 locais diferentes. Foram ensaiadas um total de 6.443 amostras, sendo 285 positivas e 6.158 negativas para a doença de Chagas. Os resultados estão resumidos na tabela 21 abaixo.

Tabela 21: Resumo dos resultados do estudo clínico do kit ELISA Chagas

Resultados Kit protótipo –lote piloto C	Grupo		Total
	Amostras Positivas	Amostras randômicas negativas	
Reagente	285 (100%)	19 (0,3%)*	304
Não reagente	0	6.139 (99,7%)	6.139
Total	285	6.158	6.443

* Após repetição as 19 amostras permaneceram positivas ou inconclusivas e deram resultados negativos na imunofluorescência.

A Figura 23 mostra a distribuição das freqüências dos índices de reatividade das 285 amostras positivas e 6.158 amostras negativas testadas no estudo clínico.

Figura 23: Distribuição das freqüências de amostras positivas e negativas no estudo clínico do kit ELISA Chagas

4.3.4. Registro do produto

4.3.4.1. Processo de registro.

Antes de ser colocado no mercado, qualquer produto novo para diagnóstico *in vitro* deve ser registrado junto à ANVISA. Este registro foi feito de acordo com a legislação em vigor no momento. Na época em que o kit de ELISA para Chagas foi submetido à ANVISA para registro a legislação em vigor era a Portaria n.º 8/MS/SVS, de 23 de janeiro de 1996, que hoje foi substituída pela Resolução RDC n.º 206/06.

O produto foi aprovado pela ANVISA e o seu número de registro publicado no Diário Oficial da União.

4.3.4.2. Análise Prévia

Por se tratar de produto para diagnóstico *in vitro* de uso em triagem sorológica de doadores de sangue, como parte do registro junto à ANVISA, foi realizada a análise prévia deste produto.

A análise prévia foi feita pelo INCQS, com o objetivo de avaliar o desempenho do kit e suas características de sensibilidade e especificidade, antes de ser liberado para o mercado. Esta análise foi feita em um único lote (lote C), onde foram avaliadas cerca de 1.000 a 1.500 amostras, entre positivas e negativas.

Os resultados da análise prévia foram fornecidos à empresa em forma de laudo de análise, mas por motivos de confidencialidade os mesmos não podem ser aqui divulgados.

5. DISCUSSÃO

A análise da literatura evidenciou um crescente progresso e conseqüente melhoria dos produtos, acompanhando o desenvolvimento tecnológico. Porém, o mercado se modifica cada vez mais rápido e a legislação nem sempre consegue acompanhar esta evolução. Além disso, muitas vezes a legislação existente não é clara o suficiente, deixando margem a dúvidas, que não são muitas vezes devidamente esclarecidas pelos órgãos reguladores competentes. Outras vezes a legislação faz exigências regulatórias, mas não deixa claro como cumpri-las.

No relatório técnico, que é um dos documentos que deve ser enviado à ANVISA para registro do produto, temos que dar informações detalhadas sobre o produto, desde a sua composição, até os resultados obtidos nos estudos comparativos para determinação de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade.

Um exemplo claro disto é a Resolução RDC nº 206/06, que pede alguns documentos complementares. Estes documentos devem ser anexados à petição de registro, revalidação ou de alteração de registro, quando exigidos, ou seja, o fabricante/fornecedor do produto deverá esperar a exigência da ANVISA para saber quais documentos complementares deve providenciar. Isto pode acarretar demora da análise e liberação dos processos de registro de produtos para diagnóstico *in vitro* no Brasil.

Dentre os documentos complementares exigidos pela RDC nº 206/06, um deles é o Relatório de análise prévia considerada satisfatória, realizada por unidade da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Mas esta resolução não define quais são os produtos que devem ser submetidos a esta análise. Apesar do nome, análise **prévia**, esta só é realizada após protocolo do dossiê de registro junto à ANVISA e recebimento de exigência da ANVISA solicitando a realização desta análise. Atualmente o único laboratório que está habilitado a realizar a análise prévia é o INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro. Isto limita as possibilidades das empresas e centraliza os testes em um único laboratório que fica sobrecarregado e tem dificuldades em atender a demanda do mercado em tempo reduzido.

Também não há legislação publicada definindo para quais testes será realizada a análise prévia e quais são os resultados esperados. Todo conhecimento que temos sobre esta área vem de reuniões ou encontros entre

ANVISA, INCQS e entidades de classe/setor regulado ou de análises prévias já realizadas anteriormente pelas empresas.

Ainda como documento complementar, a Resolução RDC nº 206 pede o Relatório de Pesquisa Clínica, de acordo com a Resolução CNS/MS nº 251, de 07 de agosto de 1997, ou instrumento legal que venha a substituí-la.

O produto kit ELISA Chagas aqui desenvolvido, foi registrado seguindo a Portaria nº 8/ 96, que era a vigente na época em que o dossiê de registro foi submetido à ANVISA. Uma análise, ainda que superficial, da nova resolução (RDC nº 206/06, que passou a vigorar em abril/07) não indica grandes alterações pela nova legislação e a classe de enquadramento segundo listagem disponível no site da ANVISA é classe III – produtos de alto risco (http://www.anvisa.gov.br/produtossaude/enquadramento/tab_invitro_.pdf). Já nos Estados Unidos este mesmo produto é enquadrado como de baixo risco, pois a doença de Chagas não é endêmica naquela região.

Após o desenvolvimento do produto, o mesmo precisa passar por estudos clínicos, para verificar seu desempenho, e precisa também ser enviado dossiê para registro na ANVISA. Todos estes estudos e registro são caros e demorados. Para se ter uma idéia, o custo da taxa de solicitação de realização de pesquisa clínica para o kit ELISA Chagas desenvolvido foi R\$ 8.500,00, Fora os custos com a pesquisa em si. A aprovação do projeto de pesquisa demorou 4 meses para aprovação inicial e 8 meses no total. Este tempo, considerado rápido, só foi possível graças à nossa experiência nesta área de atuação e insistentes telefonemas e correspondências eletrônicas cobrando a liberação do processo.

Segundo relatório de 2007 da Câmara Americana de Comércio (Amcham Brasil), em pesquisa realizada pela mesma junto ao setor regulado, evidenciou-se que aproximadamente 35% dos pedidos de registro de produtos para diagnóstico in vitro recebem a primeira manifestação por parte da ANVISA 5 meses ou mais após protocolo do pedido (Brasil, Câmara Americana de Comércio - data de acesso 12/09/07). Esta primeira manifestação não é necessariamente favorável ao registro, mas pode ser solicitação de exigências técnicas que demandam resposta do solicitante e outro período para análise da mesma. É importante ressaltar que a demora na análise dos processos de registro e alteração de registro de produtos e

o alto custo do mesmo dificulta a entrada de novos produtos no mercado e atualização dos produtos já existentes.

Uma das exigências para registro de produtos importados no Brasil é o Certificado de Livre Comércio no país de origem, o que atrasa ainda mais o registro, pois é preciso esperar que o produto seja registrado no país de origem para depois ser registrado aqui.

Em outros países, como nos Estados Unidos, por exemplo, há um forte diálogo entre empresa e agência reguladora (no caso Food and Drug Administration - FDA). O FDA conta com especialistas em diversos assuntos e quando sente falta de algum conhecimento específico contrata consultoria de especialistas para resolver determinado caso. Qualquer dúvida em relação às boas práticas de fabricação, registro de produtos, estudos clínicos etc. podem ser conversadas e o FDA orienta o fabricante/importador de como proceder para cada caso. A legislação do FDA também não é perfeita, mas é dinâmica e é constantemente atualizada (no mínimo uma vez por ano). Além disso, a descentralização existente no FDA, que conta com unidades em vários estados e municípios, facilita o trabalho da agência reguladora e do setor regulado, que não precisam se deslocar em grandes distâncias, agilizando os atendimentos. Por outro lado, há maior rigor na definição da finalidade de uso liberada na aprovação. A aprovação dos processos de registro também é demorada e cara.

Já a legislação da Europa traz um pouco mais de detalhes em relação a índices e parâmetros de sensibilidade, especificidade, mas também é vaga em alguns outros aspectos. Na União Européia as empresas se auto-declaram conformes para muitos produtos (todos de menor risco) e cabe às autoridades fiscalizar se as regras estão sendo cumpridas. O setor regulador é mais exigente com os produtos de maior risco e entrega às empresas fabricantes/distribuidoras a responsabilidade pelos produtos de menor risco. Com esta divisão de tarefas o governo tem mais tempo para as fiscalizações e orientação ao setor regulado, que assume suas responsabilidades e cumpre as regras. Além disso, as inspeções de Boas Práticas de Fabricação podem ser realizadas por organismos certificadores, além das agências de saúde, dividindo também esta tarefa.

Com a globalização percebe-se que, atualmente a legislação é bem mais homogênea de país a país, mas ainda estamos longe de conseguir a legislação ideal e uma sistemática de atualização da legislação que acompanhe o mercado.

Para isto, há necessidade de contínua evolução e constantes melhorias, com o amadurecimento do setor regulado e órgãos reguladores. Este amadurecimento passa pelo processo de educação contínua e de investigação científica e também deve envolver universidades e instituições de pesquisa em projetos de inovação tecnológica.

Os procedimentos aqui elaborados, tanto na forma de organograma como na forma de procedimento escrito atendem à legislação vigente atualmente. Deve-se levar em consideração que a legislação é dinâmica e pode ser alterada ou revogada e, portanto, estes modelos de procedimento também deverão ser alterados.

Estes procedimentos podem ser utilizados como um guia para fabricantes/fornecedores de produtos para diagnóstico *in vitro*, que devem alterar e complementar os mesmos de acordo com o tipo de produto a ser produzido e com as normas vigentes no local de uso.

A falta de literatura pertinente nesta área dificulta o entendimento da legislação e a elaboração de procedimentos. Muitas vezes a subjetividade da legislação ou textos mal escritos levam a um entendimento errôneo quanto à real interpretação da norma. Mas, o que temos disponível hoje, nos permite criar uma sistemática de trabalho, seguindo sempre os procedimentos escritos e implementando melhorias nos processos.

A revisão contínua dos procedimentos deve incorporar melhorias que visem a qualidade. Para isso, devem ser analisados resultados e relatórios de visita a usuários do kit, dados de campo e resultados de testes realizados durante e após a produção. Isto permite implementar melhorias também ao produto, e ao processo de produção.

O kit de ELISA para Chagas foi desenvolvido, fabricado e validado seguindo os procedimentos elaborados nesta tese, demonstrando que os mesmos são factíveis e, portanto, podem ser utilizados como guia para outros produtos.

Durante o desenvolvimento do kit foram feitos testes para produção e padronização dos diversos reagentes.

De acordo com a literatura (SILVEIRA et al, 2001 e FRADE, 2005) os principais antígenos de *Trypanosoma cruzi* com potencial uso clínico/epidemiológico tem peso molecular entre 20 e 300 kDa, ficando a maioria entre 24 e 100 kDa. Os

antígenos aqui obtidos de lisado do *T. cruzi* têm peso molecular entre 20 e 94 kDa (Figura 5), demonstrando concordância com a literatura.

A fase sólida escolhida para este sistema ELISA foi microplaca plástica, por permitir a realização de múltiplos ensaios e automação. Dos plásticos disponíveis para essa finalidade, o poliestireno é um plástico com pequena capacidade de ligação não covalente e mais adequado para proteínas. Há placas de poliestireno com alta, média e baixa capacidade de ligação de proteínas. A fase sólida escolhida foi microplaca de poliestireno de alta capacidade de ligação. Dentre os tipos de placa testadas, esta foi a que apresentou melhor capacidade de ligação para os antígenos em questão e menor reação de fundo (Tabela 9). Apesar das microplacas de alta capacidade de ligação (*high binding*) normalmente darem uma maior inespecificidade, devido à alta capacidade de ligação, este foi o tipo que melhor se adaptou ao produto em estudo. O fornecedor escolhido, apesar do alto preço, é reconhecido no mercado e as placas são de fácil aquisição em lotes com excelente reprodutibilidade.

Através de pesquisa de mercado identificamos a necessidade de acrescentar um indicador ao Diluente de Amostras que fizesse com que o mesmo mudasse de cor com a adição das amostras. Isto é importante para a pipetagem manual, pois facilita a etapa de adição de amostras e serve como controle de pipetagem. Já em equipamentos automatizados este controle pode ser feito por diferença de densidade óptica, através da leitura das microplacas antes e após adição da amostra em comprimento de onda 630 nm (Tabela 10).

O uso de corantes também no conjugado e controles do kit facilita a identificação dos mesmos e ajuda a evitar troca de reagentes na hora do uso. O fato de todos os componentes (exceto solução de lavagem) serem prontos para uso facilita a execução do teste e evita erros de diluições dos componentes.

É sabido que após a transmissão do parasito *T. cruzi*, a doença de Chagas progride com a produção de classes específicas de anticorpos durante o desenvolvimento da infecção. Anticorpos da classe IgM aparecem primeiramente como característica da fase aguda/recente da infecção (SILVEIRA, UMEZAWA e LUQUETTI, 2001; UMEZAWA e SILVEIRA, 1999). Os anticorpos da classe IgG,

também presentes na fase aguda, acompanham a infecção pelo resto da vida (UMEZAWA e SILVEIRA, 1999). Tem sido bem documentado em diversos modelos experimentais e em humanos, que o surgimento de IgM e IgG são precoces (sete a 15 dias após a infecção) atingindo níveis elevados a partir da quinta semana de infecção coincidindo esta elevação com o aumento da parasitemia detectável ao exame a fresco (LANA e TAFURI, 2005). Com base nestas informações e considerando os recentes surtos que tivemos de infecção por *T. cruzi* por via alimentar e o constante aumento de casos de transmissão congênita da doença de Chagas, para aumentar a sensibilidade do kit de modo que fosse detectada também a fase aguda da doença, decidiu-se utilizar um conjugado para detecção concomitante de anticorpos das classes IgG e IgM.

Os estudos de sensibilidade e especificidade demonstram que o kit ELISA Chagas desenvolvido atende às especificações de 100% de sensibilidade, ou seja, nenhum resultado falso negativo na população de amostras positivas estudadas. Atende também aos critérios de especificidade de pelo menos 99%, ou seja, no máximo um por cento (1%) das amostras negativas podem dar resultados falso positivos. Nos estudos realizados para este kit obtivemos 99,3 a 99,8% de especificidade nos três lotes piloto estudados (Tabela 12). Os valores mínimos de sensibilidade e especificidade aqui definidos não se encontram em normas ou legislações brasileira, mas foram obtidos da experiência prévia em análises prévia realizada pelo INCQS para outros kits de Chagas.

Apesar do kit desenvolvido ser um teste qualitativo e portanto, o limite de detecção não poder ser quantitativamente analisado, por analogia ao teste de referência, chegou-se à conclusão que há uma tendência de quanto maior o título da imunofluorescência, maior leitura no ELISA, (Figura 12).

A análise de interferentes e reações cruzadas demonstra que há reação cruzada com *Leishmania* o que já havia sido preconizado em literatura (LANA e TAFURI, 2005) e com amostras com fator reumatóide positivo. Em regiões endêmicas para Leishmaniose isto pode ser um problema, ocasionando em falsos resultados positivos na triagem sorológica para doença de Chagas. Além disso, amostras hemolisadas também podem interferir no teste (Tabelas 13, 14 e 15).

O kit ELISA Chagas mostrou-se reprodutível, com coeficiente de variação $\leq 15,2\%$ tanto para repetitividade como para reprodutibilidade nas amostras positivas dos três lotes analisados (Figuras 13 e 14 e Tabelas 16 e 17). Apesar do único trabalho de literatura encontrado definindo os valores ideais de CV para reprodutibilidade e repetitividade para testes diagnóstico (CROWTHER, 2001) sugerir que o CV seja menor que 10%, o mesmo traz um gráfico de perfil de precisão, onde fica claro que quanto menor a concentração do analito em estudo (no nosso caso anticorpos anti- *T. cruzi*), maior será a imprecisão do teste, ou seja, maior o CV em repetições (Figura 24). Considerando também que o kit ELISA Chagas é qualitativo, determinamos como aceitável para este ensaio $CV < 20\%$ na repetitividade e $< 25\%$ na reprodutibilidade de amostras positivas. Já para as amostras negativas, cujos valores de densidade óptica são muito baixos, estabelecemos apenas uma análise qualitativa dos resultados, ou seja, todos os resultados obtidos para amostra negativa deveriam estar abaixo do valor de cut-off da reação. Por outro lado, as amostras positivas devem ser repetidamente positivas, independente do CV observado.

Figura 24: Perfil de precisão de um ensaio mostrando erro não uniforme.

A faixa de trabalho ideal do ensaio pode ser definida como a faixa onde a imprecisão está abaixo de um nível pré-determinado, por exemplo, 10% (extraído de CROWTHER, 2001).

Na avaliação do uso de soro versus plasma (Tabelas 18 e 19) ficou demonstrado que o kit ELISA Chagas desenvolvido pode ser utilizado para análise de amostras tanto de soro como de plasma (com diferentes anticoagulantes), não

dando diferença nos resultados das amostras testadas nestes dois tipos de amostra. A preferência por uso de soro se deve à presença de fibrinogênio no plasma que pode dificultar pipetagens automatizadas. Caso haja interesse futuro em outros tipos de amostra, como líquido, por exemplo, o kit deverá ser testado com este tipo de amostra e comprovando-se eficácia no mesmo deverá ser feita uma alteração no registro do produto para inclusão deste novo tipo de amostra.

A avaliação das condições de armazenamento da amostra indica que as mesmas podem ser congeladas e descongeladas pelo menos cinco vezes e mantêm-se estável para realização do ensaio (Figura 15). Apesar dos estudos aqui realizados demonstrarem isto, é recomendável sempre o uso de amostras frescas, pois os anticorpos são termolábeis e amostras com baixos títulos de anticorpos podem ser prejudicadas.

O estudo comparativo de desempenho com kit comercial é importante para demonstrar que o produto é melhor ou igual aos já existentes no mercado. Não há interesse comercial e nem de saúde pública no lançamento de produtos com desempenho inferior aos já existentes, mesmo se fossem mais baratos. Portanto, a legislação brasileira para registro de produtos solicita este tipo de comprovação para aprovação do produto. No teste realizado para o kit ELISA Chagas a concordância foi 99,5% e índice kappa (IC 95%) 0,959 (0,921 – 0,991), demonstrando ótima correlação (ANDRADE e ZICKER, 1997; PEREIRA, 1995) entre o novo kit e o kit comercial testado (Tabela 20).

Na busca feita antes da realização dos estudos de estabilidade só foram encontradas legislações brasileiras que tratam dos estudos de estabilidade de medicamentos (como a Resolução - RE nº 1 de 29 de julho de 2005). Mesmo na busca por normas e legislações internacionais, não se encontrou nenhuma informação que trouxesse indicações de correlação da validade do produto quando submetido à estabilidade acelerada em relação à validade do mesmo quando em estabilidade em tempo real. Portanto, partiu-se da experiência prévia com teste ELISA indireto, onde 7 dias de estabilidade acelerada correspondiam a 12 meses de tempo real. Partindo-se deste princípio, realizou-se o estudo de estabilidade

acelerada do kit ELISA Chagas e os três lotes estudados perderam sua estabilidade entre o 10º e o 13º dia de estudo, indicando que os mesmos teriam validade de pelo menos 12 meses na sua condição ideal de armazenamento (Figuras 16 e 20). Mas não se pode usar esta equivalência como padrão, pois há variações de kit para kit, como matéria prima utilizada, processo de fabricação, etc. Portanto, foi necessário fazer também o estudo de estabilidade em tempo real, onde os kits permaneceram de 2 a 8°C e foram testados mensalmente. Neste estudo, os três lotes testados permaneceram estáveis por mais de 12 meses, indicando que, no nosso modelo, 7 dias a 37°C equivale a 12 meses de 2 a 8°C.

É aconselhável que a cada lote produzido faça-se a estabilidade acelerada como parte do controle de qualidade de liberação do lote para verificar-se se o lote fabricado vai manter-se estável pelo prazo previsto. É necessário fazer a estabilidade em tempo real nos primeiros lotes para certificar-se de que a estabilidade acelerada corresponda a um determinado período na estabilidade em tempo real. Recomenda-se também que seja feita a estabilidade em tempo real para todos os lotes comercializados e caso o produto apresente algum problema, o mesmo deve ser recolhido do mercado e as causas da perda de estabilidade devem ser investigadas.

Nos três lotes piloto do kit ELISA Chagas foram feitos também os estudos de estabilidade à temperatura ambiente, que é o teste de resistência da norma ABNT NBR 14.864, estabilidade de kit aberto, estabilidade de kit em uso e estabilidade a temperaturas extremas. Estes estudos simulam o transporte e uso do kit e serviram para estabelecer as condições de transporte e manuseio do kit. Em todos os estudos, os resultados obtidos foram satisfatórios (Figuras 17, 18, 19, 21 e 22).

O estudo clínico realizado com mais de 6.000 amostras mostrou um bom desempenho do produto no mercado, ainda que em fase experimental (Tabela 21 e Figura 23). Apesar do kit conter em seu conjugado anticorpo anti-IgM, com o intuito de detectar amostras da fase aguda da doença, nos estudos realizados não tivemos nenhum caso de amostra apenas IgM positiva. Acreditamos que é possível encontrar este tipo de amostra, mas devido à excelente triagem nas entrevistas em banco de sangue, estas serão raras.

Enfim, o produto final atendeu a todos os requisitos de validação aqui estabelecidos e foi registrado na ANVISA após análise previa no INCQS, podendo ser comercializado. Lembrando que a validação prospectiva, ou seja, monitoramento das produções, controles de qualidade, estudos de estabilidade e acompanhamento do kit no mercado é uma etapa muito importante e deve ser feita enquanto o kit estiver sendo comercializado. Isto permite implementar melhorias e evitar desvios da qualidade. Mas, caso aconteça algum problema, está sempre previsto o recolhimento de kits por desvios de qualidade observados a posteriori, de acordo com as normas de boas práticas de fabricação e de garantia da qualidade. Toda empresa deve ter um procedimento de Notificação e Recolhimento de produtos do mercado, conforme previsto em legislação de Vigilância Sanitária. Seguindo-se as normas e procedimentos garante-se a segurança dos processos, procedimentos e produtos de uso em saúde para a população.

6. CONCLUSÃO

1 – Foram analisadas as legislações referentes às Boas Práticas de Fabricação, complementadas com outras fontes, quando necessário e obteve-se um protocolo completo sobre todas as fases de desenvolvimento até registro do produto para diagnóstico sorológico. O procedimento desenvolvido e aplicado mostrou-se adequado às características do kit registrado, podendo também servir de guia básico para outros testes.

2 – O kit ELISA Chagas desenvolvido foi produzido e validado quanto ao seu desempenho com resultados compatíveis aos desejados para a finalidade de triagem sorológica da doença de Chagas, tendo sido registrado na ANVISA após análise e aprovação do INCQS.

7. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em 26 de setembro de 2005, sob nº Protocolo CEP nº 319.

8. ANEXOS

ANEXO 1

MODELO DE PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDAÇÃO DE KITS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO																											
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 1 de 12																								
Histórico das Alterações: (se houver)																											
Aprovações: Elaborado por: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>Nome</td> <td>Assinatura</td> <td>Data</td> </tr> </table> Aprovado por: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>Nome</td> <td>Assinatura</td> <td>Data</td> </tr> </table> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>Nome</td> <td>Assinatura</td> <td>Data</td> </tr> </table> Homologado por: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>Nome</td> <td>Assinatura</td> <td>Data</td> </tr> </table>							Nome	Assinatura	Data				Nome	Assinatura	Data				Nome	Assinatura	Data				Nome	Assinatura	Data
Nome	Assinatura	Data																									
Nome	Assinatura	Data																									
Nome	Assinatura	Data																									
Nome	Assinatura	Data																									

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE KITS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 2 de 12

ÍNDICE:

1. Objetivo	2
2. Responsabilidades	2
3. Definições	2
4. Introdução	4
5. Considerações gerais	4
6. Materiais	5
7. Procedimento	6

1. Objetivo:

2. Responsabilidades:

O responsável técnico da empresa é responsável por revisar este procedimento e mantê-lo atualizado. Os funcionários e estagiários do setor de produção são responsáveis por seguir este procedimento, por realizar os ensaios e relatar todos os resultados finais.

3. Definições:

Calibração: definida como o conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre os valores representados pelo resultado do teste e os valores correspondentes obtidos com as amostras de referência.

Coefficiente de Variação é a razão entre o desvio-padrão e a média dos resultados analisados.

Reprodutibilidade: O índice de reprodutibilidade corresponde ao grau de concordância entre os resultados do teste realizado em condições diferentes com a mesma amostra.

Sensibilidade de um teste sorológico: refere-se à porcentagem de resultados positivos pelo teste na população de doentes, ou seja, resultados positivos para as

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i>			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 3 de 12
<p>amostras caracterizadas como positivas pelos ensaios do cliente e pelo método de referência.</p> <p>Validação: comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.</p> <p>Erro Aleatório: resultado de uma medição <i>menos</i> a média de resultados de um número (n) de ensaios sob condições de repetitividade.</p> <p>Erro sistemático: média de resultados de um número (n) de ensaios sob condições de repetitividade <i>menos</i> o valor verdadeiro (aceito ou esperado). Nota: o valor verdadeiro, o erro sistemático e as causas não são completamente conhecidos.</p> <p>Especificidade de um teste sorológico é definida pela porcentagem de resultados negativos pelo teste nos indivíduos não doentes, ou seja, resultados negativos para as amostras caracterizadas como negativas pelo método de referência.</p> <p>Imprecisão: estimativa do erro analítico aleatório, pode ser definida como dispersão aleatória de um conjunto de resultados em replicata ou valores expressos quantitativamente por uma estatística como desvio padrão ou coeficiente de variação.</p> <p>Inexatidão: estimativa do erro analítico sistemático, pode ser definida como a diferença numérica entre o valor obtido e o verdadeiro.</p> <p>Índice de Reatividade (IR): É a razão entre a Densidade Ótica da amostra e o valor do <i>Cut-off</i>, também chamado de ratio.</p> <p>Kit: Para facilitar a elaboração e compreensão deste documento, o termo kit é empregado como significando conjunto de reagentes e insumos que definem o sistema diagnóstico, neste documento, para pesquisa de antígenos ou anticorpos.</p> <p>Limite de detecção é a capacidade de identificar a presença de um analito em determinadas condições ou de determinar quantitativamente a sua quantidade dentro de limites definidos de precisão.</p> <p>Repetitividade: O índice de repetitividade corresponde ao grau de concordância entre os resultados do teste realizado sucessivamente com uma mesma amostra, sob as mesmas condições.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 4 de 12
<p>4. Introdução:</p> <p>Este documento foi elaborado de acordo com a Norma NBR 14.864 - Diagnóstico <i>in vitro</i> - Procedimentos para validação de reagentes ou sistemas de Diagnóstico da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), CB-36 - Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico <i>in vitro</i>. CE-36:003.03 – Comissão de Estudo de Produto para Diagnóstico <i>in vitro</i>. A Norma NBR 14.864 foi baseada na ISO DIS 15.197:1998.</p> <p>Este procedimento tem por objetivos monitorar o desempenho do produto; avaliar a dimensão dos erros aleatório e sistemático, decidir da aceitabilidade do kit; e desenvolver um plano de controle da qualidade para validar sua eficiência prospectivamente.</p> <p>As atividades necessárias à validação e os resultados obtidos em cada etapa, acompanhados de relatório de decisão, serão registrados em relatórios próprios e arquivados sob a responsabilidade do Setor de Controle de Qualidade.</p> <p>Os modelos e resultados obtidos na validação serão repassados ao usuário na forma de características de desempenho constantes da Instrução de Uso.</p> <p>A análise crítica dos resultados obtidos será considerada na elaboração das condições de uso e de um plano de controle de qualidade, incluindo recomendações ao usuário para obter o desempenho desejado do produto.</p> <p>4.1. Requisitos da Validação</p> <p>Na elaboração deste procedimento de validação foram consideradas as características do método imunoenzimático do exame, a utilidade médica dos resultados na seleção de doadores de sangue e órgãos e as condições de uso do kit.</p> <p>5. Considerações Gerais:</p> <p>O desempenho do teste ELISA será avaliado comparativamente ao teste de referência em questão. Para isto, serão empregadas amostras de referência ou amostras controle negativas e positivas. Dentre as amostras positivas serão utilizadas amostras de títulos variados, incluindo aquelas no limite de decisão clínica de diagnóstico. Esta análise comparativa permitirá estabelecer também o limite de detecção do teste e a análise de interferências.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 5 de 12
<p>Para avaliar o limite de detecção do teste, será avaliada a sensibilidade relativa do teste em relação ao método de referência. Para o estudo de interferências no teste, será avaliada a especificidade relativa do teste em relação ao método de referência.</p> <p>Os ensaios de validação poderão ser feitos nesta empresa e/ou em empresas devidamente qualificadas.</p> <p>6. Materiais:</p> <p>Produção dos Componentes e kits</p> <p>As produções serão realizadas de acordo com seus Procedimentos Operacionais Padrão (POP).</p> <p>Amostras</p> <p>Serão empregadas amostras da coleção de amostras da empresa ou obtidas por doação de instituições e laboratórios ou bancos de sangue qualificados ou de painéis comerciais ou de painéis montados na empresa, com resultados obtidos por métodos utilizados para pesquisa de antígenos e anticorpos, além dos controles do próprio kit.</p> <p>Amostras controle: são consideradas amostras controle aquelas obtidas como positivas para alguma patologia ou positivas por outro método. Também podem ser usadas amostras negativas de indivíduos sadios. As amostras controle com resultados não esperados em alguma análise devem ser ensaiadas pelo teste de referência para esclarecimento do resultado.</p> <p>Amostras de referência: a amostra será classificada como de referência quando tiver o resultado do método de referência para o parâmetro em questão.</p> <p>Método de referência: para a pesquisa de antígenos e anticorpos, utilizando testes imunológicos e com base na literatura, adotaremos como método de referência para a Pesquisa de anticorpos para doença de Chagas a imunofluorescência indireta (IFI).</p> <p>Estes testes serão realizados pela empresa ou por laboratório qualificado.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 6 de 12
<p>7. Procedimento:</p> <p>Índices e Parâmetros: O teste ELISA para pesquisa de antígenos e anticorpos é do tipo qualitativo. Porém, como o teste fornece uma leitura analítica (intensidade de cor) proporcional à quantidade de anticorpos ou antígenos detectados, pode ser considerado também um teste semi-quantitativo.</p> <p>7.1. Sensibilidade AÇÃO: ensaiar amostras controle ou de referência caracterizadas como positivas pelo teste de referência e EM pelo menos mais um teste comercial aprovado pela ANVISA. ESPERADO: todas as amostras de doentes devem apresentar resultado positivo no teste ELISA, ou seja, sensibilidade de 100%.</p> <p>7.2. Especificidade analítica AÇÃO: ensaiar amostras caracterizadas como negativas em outro teste comercial aprovado pela ANVISA e, em caso de discordância de resultados, confirmar pelo teste de referência. ESPERADO: no máximo 1% de todas as amostras de não doentes podem apresentar resultado falso-positivo no teste ELISA, ou seja, especificidade $\geq 99\%$ para Chagas.</p> <p>7.3. Limite de detecção AÇÃO: ensaiar amostras caracterizadas como positivas pelo método de referência. Para o teste com o kit Chagas ensaiar amostras com resultados de títulos variados no teste de referência IFI, caso disponível ensaiar pelo menos duas no limite de decisão clínica de diagnóstico (título 1/40). ESPERADO: concordância de 100% para as amostras com resultados positivos pelo método de referência.</p> <p>7.4. Análise de interferências AÇÃO: Ensaiar amostras de soro lipêmicas, hemolisadas e com fator reumatóide positivo.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 07 de 12
<p>ESPERADO: Espera-se que não haja interferências, se houver, as mesmas serão descritas nas instruções de uso do produto como advertência ao usuário final.</p>			
<p>7.5. Reações cruzadas</p> <p>AÇÃO: ensaiar amostras de referência caracterizadas como negativas para o parâmetro em teste, mas positivas para outras patologias.</p> <p>ESPERADO: Espera-se que não haja reações cruzadas, se houver, as mesmas serão descritas nas instruções de uso do produto como advertência ao usuário final.</p>			
<p>7.6.Repetitividade</p> <p>AÇÃO: ensaiar uma amostra de soro ou plasma classificada como positiva e uma amostra negativa (no teste ELISA) para o parâmetro a ser analisado. A amostra positiva deverá ter apresentado resultados de DO, preferencialmente, de até 2 vezes o valor do <i>cut-off</i> (poderá ser feito <i>pool</i> de amostras ou diluição em amostra negativa, desde que a amostra apresente resultados positivos estáveis). O ensaio deverá conter 30 replicatas de cada amostra numa mesma placa, pipetada da mesma maneira, pelo mesmo operador. Calcular o índice de reatividade (IR) para cada resultado. Calcular DP e CV.</p> <p>ESPERADO: a amostra positiva deve mostrar reatividade em todas as replicatas. O coeficiente de variação do índice de reatividade (relação $DO/cut-off$) não deve exceder 20% para a amostra positiva testada. A amostra negativa deve dar resultados negativos em todas as replicatas. Sua análise será apenas qualitativa.</p>			
<p>7.7. Reprodutibilidade</p> <p>AÇÃO: ensaiar uma amostra de soro ou plasma classificada como positiva e uma amostra negativa (no teste ELISA) para o parâmetro a ser analisado. A amostra positiva deverá ter apresentado resultados de DO, preferencialmente, de até 2 vezes o valor do <i>cut-off</i> (poderá ser feito <i>pool</i> de amostras ou diluição em amostra negativa, desde que a amostra apresente resultados positivos estáveis). Se houver volume suficiente de amostra, usar as mesmas amostras utilizadas para o teste de repetitividade.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 08 de 12
<p>O ensaio deverá ser realizado, utilizando o mesmo lote de kit, em condições diferentes. Cada amostra deverá ser pipetada 10 vezes em uma placa. O ensaio deverá ser repetido em 5 dias diferentes, consecutivos ou não, sendo que pelo menos dois operadores diferentes deverão pipetar as placas (ex. dia 1, operador A; dia 2, operador B; dia 3, operador A ou C; se possível, etc.) Deverão ser obtidos pelo menos 10 replicatas por dia, dando um total de pelo menos 50 replicatas.</p> <p>ESPERADO: a amostra positiva deve mostrar reatividade em todas as replicatas. O coeficiente de variação do índice de reatividade (relação DO/<i>cut-off</i>) não deve exceder 25% para a amostra positiva testada. A amostra negativa deve dar resultados negativos em todas as replicatas. Sua análise será apenas qualitativa.</p> <p>7.8. Estabilidade</p> <p>Definida como capacidade do kit reter sua composição, características e propriedades durante condições especificadas, e quando mantido sob estas condições, de manter suas características de desempenho dentro de limites e prazos especificado.</p> <p>Montar um painel com amostras positivas e negativas para ser usado durante os estudos de estabilidade.</p> <p>Os estudos de estabilidade dividem-se em:</p> <p><u>- Estabilidade em tempo real:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> No dia do ensaio, remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente. Ensaar os kits seguindo suas Instruções de Uso. Retornar os kits às condições de armazenamento apropriadas (2 a 8°C). Repetir as etapas a-c uma vez por mês até que o kit perca validação por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não. Um kit deve continuar sendo testado além da sua validade, se continuar estável e demonstrar resultados aceitáveis. <p><u>- Estabilidade acelerada:</u></p> <p>Será comparada a taxa de decaimento de reatividade do kit com um kit Controle (kit aberto no momento do ensaio, usado como referência e armazenado de 2-8°C).</p> <ol style="list-style-type: none"> No primeiro dia do ensaio (dia zero), remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente. Ensaar o kit seguindo suas Instruções de Uso. Colocar o kit em incubadora a 37°C. Repetir as etapas a-c nos dias 3, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 e 28 ou até que o kit perca validação por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não. O kit deve continuar sendo testado após o 28º dia, se continuar estável. Testar a intervalos de 3 em 3 dias ou com menor frequência, dependendo do nível de decaimento, até que o kit perca validação. 			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 09 de 12
<p>- Estabilidade à Temperatura Ambiente:</p> <p>a) No primeiro dia do ensaio (dia zero), remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente.</p> <p>b) Ensaiai o kit seguindo suas Instruções de Uso.</p> <p>c) Colocar os kits à temperatura ambiente (19 a 27°C).</p> <p>d) Repetir as etapas a-c a cada 15 dias até observar decaimento. Passar, então, a testar semanalmente ou a intervalos menores, dependendo do nível de decaimento observado, até que o kit perca validação. Só será considerado que o kit perdeu validação quando houver perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.</p> <p>e) A cada dia testado deverá ser feito em paralelo um kit Controle, ou seja, um kit aberto no momento do ensaio, usado como Referência e armazenado sob condições normais de temperatura (2-8°C).</p> <p>- Estabilidade de Componente Aberto:</p> <p>a) No primeiro dia do ensaio (dia zero), remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente.</p> <p>b) Abrir os frascos de todos os reagentes líquidos e a embalagem de todas as microplacas. Fechar novamente os que não forem ser utilizados.</p> <p>c) Ensaiai o kit seguindo suas Instruções de Uso.</p> <p>d) Retornar os kits à temperatura normal de armazenamento (2 a 8°C).</p> <p>e) Repetir as etapas a-d uma vez por dia durante 5 dias consecutivos e depois, uma vez por semana por mais 11 semanas. Passar, então, a testar semanalmente ou a intervalos menores, dependendo do nível de decaimento observado, até que o kit perca validação. Só será considerado que o kit perdeu validação quando houver perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.</p> <p>f) A cada dia testado deverá ser feito em paralelo um kit Controle, ou seja, um kit aberto no momento do ensaio, usado como Referência e armazenado sob condições normais de temperatura (2-8°C).</p> <p>- Estabilidade kit em uso:</p> <p>a) No primeiro dia do ensaio (dia zero), remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente.</p> <p>b) Abrir apenas os frascos/embalagem dos componentes que forem ser utilizados.</p> <p>c) Ensaiai meia microplaca por dia, seguindo as Instruções de Uso do kit.</p> <p>d) Retornar os kits à temperatura normal de armazenamento (2 a 8°C).</p> <p>e) Repetir as etapas a-d uma vez por semana por mais 5 semanas.</p> <p>f) A cada dia testado deverá ser feito em paralelo um kit Controle, ou seja, um kit aberto no momento do ensaio, usado como Referência e armazenado sob condições normais de temperatura (2-8°C).</p> <p>g) Só será considerado que o kit perdeu validação quando houver perda de estabilidade por 2 vezes consecutivas ou não.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 10 de 12
<p>- Estabilidade à temperaturas extremas:</p> <p>a) Separar os kits fechados que estão armazenados de 2 a 8°C em 2 situações:</p> <p>1ª) Simulação de um transporte normal de kit: Solicitar que metade dos kits seja embalada pelo almoxarifado como se fosse ser enviada para algum usuário. Manter os kits nesta situação, à temperatura ambiente, por 36 horas. Retornar os mesmos para a câmara fria por mais 24 hs. Retirar da câmara fria e testar conforme etapas c-d abaixo.</p> <p>2ª) Simulação de problemas no transporte de kit: Retirar a outra metade dos kits da câmara fria e deixar à temperatura ambiente por 6 horas, colocar a 37°C e mantê-los nesta temperatura por 2 horas, em seguida aumentar a temperatura para 40°C e deixar por mais 1 hora. Retirar da incubadora e deixar à temperatura ambiente por mais 21 hs. Retornar os mesmos para câmara fria por mais 24 hs. Retirar da câmara fria e testar conforme etapas c-d abaixo.</p> <p>b) No primeiro dia do ensaio (dia zero), remover os kits do armazenamento de 2 a 8°C e permitir que os mesmos atinjam a temperatura ambiente.</p> <p>c) Ensaar os kits de cada simulação acima seguindo suas Instruções de Uso.</p> <p>d) Devolver os kits para câmara fria (2 a 8°C).</p> <p>e) Repetir as etapas c-d uma vez por mês até o seu vencimento ou perda de estabilidade. Só será considerado que o kit perdeu estabilidade quando houver perda de estabilidade por 2 vezes, sendo elas consecutivas ou não.</p> <p>f) A cada dia testado deverá ser feito em paralelo um kit Controle, ou seja, um kit aberto no momento do ensaio, usado como Referência e armazenado sob condições normais de temperatura (2-8°C).</p> <p>7.9. Avaliação de soro versus plasma</p> <p>AÇÃO: ensaiar amostras de indivíduos classificados como não doentes, coletadas nas seguintes condições:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Soro coletado em tubo seco • Soro coletado em tubo com gel separador • Plasma coletado com EDTA como anticoagulante • Plasma coletado com citrato como anticoagulante • Plasma coletado com heparina como anticoagulante <p>Ensaar também estas mesmas amostras acrescidas de amostra positiva. Diluir uma amostra positiva alta nas amostras negativas acima, usando o mesmo fator de diluição para cada um dos soros/plasmas.</p> <p>ESPERADO: que as amostras negativas dêem resultados não reagentes nas alíquotas de soro e plasma e que as amostras negativas acrescidas de positiva dêem resultados positivos nas alíquotas de soro e plasma.</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE KITS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 11 de 12
<p>7.10. Avaliação de condições de armazenamento de amostra</p> <p>AÇÃO: após a realização do teste acima, congelar as amostras a -20°C. Manter congeladas por pelo menos uma semana, descongelar e testar. Repetir os testes por pelo menos 5 ciclos de congelamento/descongelamento, com intervalo de pelo menos 2 dias entre cada ciclo de congelamento/descongelamento.</p> <p>ESPERADO: que as amostras negativas dêem resultados não reagentes nas alíquotas de soro e plasma e que as amostras negativas acrescidas de positiva dêem resultados positivos nas alíquotas de soro e plasma após cada ciclo de congelamento/descongelamento, por pelo menos 3 ciclos.</p> <p>7.11. Critérios de aceitabilidade do kit</p> <p>Atender a todos os critérios de índices e parâmetros e de avaliação de erros. Se algum critério não for atendido, o kit poderá ser considerado validado com restrição e observações sobre os critérios não atendidos.</p> <p>7.12. Estabelecimento das condições de uso</p> <p>A Instrução de Uso será revisada contemplando os aspectos importantes para garantir a eficiência do kit. Além das informações técnicas e metodológicas e de características de desempenho, dará destaque ao detalhamento do procedimento do exame utilizando o teste, permitindo que o operador execute a medição sem informações adicionais.</p> <p>7.13. Plano de controle de qualidade e validação prospectiva</p> <p>A análise crítica do controle de qualidade prospectivo e do acompanhamento de informações dos usuários deve contemplar a possibilidade de alteração e complementação da instrução de uso do kit.</p> <p>Como parte da validação prospectiva serão realizados os seguintes testes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade acelerada e em tempo real (ou longa duração) de cada lote fabricado. • Teste de amostras positivas e negativas no controle de qualidade final de cada lote do kit fabricado. • Teste de repetitividade realizado no controle de qualidade final de cada lote do kit fabricado, com os controles do próprio kit. • Acompanhamento do desempenho do kit no mercado. <p>7.14. Registros</p> <p>Os registros detalhados dos resultados dos testes de validação serão feitos em formulários e relatórios próprios</p>			

TÍTULO: PROCEDIMENTO PARA VALIDACAO DE KITS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO			
Documento n°: _____	Revisão n°: _____	Data de Implantação: _____	Página: 12 de 12
<p>Os dados referentes ao kit, às amostras e aos resultados obtidos serão rastreáveis, de acordo com critérios de garantia da qualidade.</p> <p>As atividades necessárias à validação, e os resultados obtidos em cada etapa, acompanhado de relatório de validação, com decisões sobre o kit, serão registrados em relatórios próprios arquivados sob responsabilidade do setor de Produção/Controle de Qualidade.</p> <p>7.15. Recursos</p> <p>7.15.1. Recursos Humanos</p> <p>Durante o processo de validação os funcionários da empresa serão devidamente treinados nos procedimentos usados na produção dos componentes e kit, bem como para a realização dos testes descritos neste procedimento.</p> <p>7.15.2. Instalações</p> <p>Será validado também o local onde os componentes e kits serão produzidos, bem como os equipamentos e condições ambientais utilizados na sua produção.</p>			

ANEXO 2: Índices de Reatividade de amostras positivas e negativas após cinco ciclos de congelamento e descongelamento

	LOTE A						LOTE B						LOTE C					
	Dia 0	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	Dia 0	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	Dia 0	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo
PQ006 Soro Seco	0,57	0,59	0,68	0,69	0,72	0,69	0,42	0,64	0,59	0,62	0,68	0,56	0,41	0,44	0,36	0,46	0,51	0,35
PQ006 Soro Gel	0,63	0,77	0,77	0,71	0,75	0,74	0,46	0,64	0,69	0,64	0,63	0,64	0,44	0,43	0,47	0,56	0,51	0,39
PQ006 Plasma EDTA	0,57	0,74	0,7	0,79	0,77	0,72	0,45	0,6	0,7	0,62	0,66	0,54	0,42	0,45	0,44	0,46	0,5	0,37
PQ006 Plasma Citrato	0,51	0,6	0,53	0,62	0,54	0,55	0,39	0,44	0,58	0,42	0,46	0,45	0,35	0,38	0,35	0,41	0,47	0,35
PQ006 Plasma Heparina	0,62	0,7	0,58	0,67	0,68	0,65	0,5	0,54	0,59	0,55	0,65	0,49	0,43	0,5	0,54	0,57	0,55	0,55
PQ007 Soro Seco	0,48	0,49	0,37	0,43	0,47	0,43	0,4	0,38	0,39	0,36	0,39	0,37	0,25	0,33	0,36	0,36	0,33	0,28
PQ007 Soro Gel	0,49	0,46	0,36	0,4	0,41	0,39	0,39	0,33	0,38	0,35	0,38	0,31	0,28	0,33	0,28	0,3	0,34	0,25
PQ007 Plasma EDTA	0,5	0,45	0,42	0,4	0,42	0,41	0,39	0,38	0,41	0,4	0,34	0,37	0,28	0,32	0,29	0,33	0,33	0,24
PQ007 Plasma Citrato	0,42	0,45	0,38	0,43	0,45	0,42	0,32	0,38	0,36	0,39	0,37	0,31	0,28	0,28	0,25	0,24	0,32	0,2
PQ007 Plasma Heparina	0,45	0,51	0,53	0,52	0,5	0,46	0,39	0,49	0,47	0,44	0,48	0,42	0,29	0,32	0,35	0,26	0,35	0,24
PQ009 Soro Seco	0,43	0,44	0,61	0,54	0,57	0,4	0,41	0,46	0,47	0,41	0,46	0,41	0,26	0,26	0,26	0,24	0,33	0,2
PQ009 Soro Gel	0,38	0,42	0,4	0,41	0,5	0,37	0,41	0,42	0,45	0,31	0,4	0,37	0,25	0,26	0,29	0,33	0,26	0,16
PQ009 Plasma EDTA	0,38	0,36	0,41	0,45	0,48	0,36	0,39	0,41	0,46	0,37	0,5	0,39	0,22	0,3	0,25	0,31	0,23	0,22
PQ009 Plasma Citrato	0,35	0,38	0,35	0,41	0,37	0,33	0,32	0,41	0,41	0,3	0,39	0,37	0,17	0,23	0,17	0,26	0,2	0,16
PQ009 Plasma Heparina	0,44	0,37	0,43	0,48	0,44	0,37	0,42	0,46	0,45	0,34	0,48	0,43	0,22	0,28	0,22	0,29	0,27	0,2
PQ006 Soro Seco + 2018	4,41	4,12	4,07	3,55	4,28	3,86	2,23	2,58	2,63	2,26	2,46	2,51	2,77	2,77	2,61	2,83	2,96	2,67
PQ006 Soro Gel+ 2018	4,29	4,86	4,42	4,19	4,36	3,71	2,35	2,57	2,81	2,5	2,73	2,61	3,11	2,75	2,47	2,46	3,06	2,51
PQ006 Plasma EDTA + 2018	3,83	5,16	4,87	4,89	4,92	4,4	2,17	2,88	2,95	3,05	3,02	2,8	2,79	2,96	2,1	2,81	3,14	2,61
PQ006 Plasma Citrato + 2018	3,82	4,67	4,89	4,84	4,68	4,76	2,28	2,63	2,96	2,57	2,62	2,74	2,7	2,95	2,59	2,93	3,17	2,81
PQ006 Plasma Heparina + 2018	4,16	4,53	4,23	4,38	4,21	4,45	2,26	2,59	2,67	2,45	2,75	2,34	2,71	3,4	3,22	3,18	3,58	3,00
PQ007 Soro Seco + 2018	4,21	4,11	4,23	3,92	3,7	3,99	2,43	2,47	2,46	2,4	2,32	2,07	2,64	3,32	2,92	3,29	3,35	3,21
PQ007 Soro Gel + 2018	4,11	4,02	4,26	3,36	3,61	3,87	2,55	2,28	2,36	2,35	2,29	1,96	2,69	3,03	2,69	3,07	3,14	2,72
PQ007 Plasma EDTA + 2018	4,56	3,52	4,39	3,23	3,11	4,07	2,76	2,41	2,32	2,35	2,69	2,19	2,61	2,92	2,43	2,79	3,02	2,43
PQ007 Plasma Citrato + 2018	4,39	4,59	4,29	3,55	4,13	4,08	2,65	2,44	2,51	2,62	2,48	2,51	2,73	2,91	2,46	2,92	3	2,48
PQ007 Plasma Heparina + 2018	4,42	4,62	4,2	3,9	4,5	3,85	2,57	2,58	2,81	2,61	2,76	2,6	3,06	2,9	2,38	2,65	3,03	2,43
PQ009 Soro Seco + 2018	4,24	5,08	4,57	5,01	4,85	4,54	2,4	2,69	3,03	2,92	2,85	2,84	3,1	2,92	2,65	2,79	3,04	2,62
PQ009 Soro Gel + 2018	4,27	4,74	4,34	5,05	4,77	4,53	2,41	2,88	3,06	2,66	2,89	2,86	2,9	2,97	2,68	3,07	3,12	2,75
PQ009 Plasma EDTA + 2018	4,09	4,26	4,38	4,32	4,37	4,67	2,69	2,74	2,95	2,56	2,72	2,74	2,81	3,29	3,3	3,13	3,5	3,05
PQ009 Plasma Citrato + 2018	4,46	3,66	3,89	3,96	4,09	4,43	2,59	2,59	2,7	2,48	2,61	2,87	2,81	3,63	2,87	3,25	3,41	3,03
PQ009 Plasma Heparina + 2018	4,81	4,39	3,85	4,33	3,94	4,25	2,73	2,87	2,81	2,44	2,69	2,82	2,61	3,3	2,65	2,81	3,17	2,74

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.L.S.S.; ZICKER, F., org. **Métodos de investigação epidemiológicas em doenças transmissíveis**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1997. v.1.

ARGENTINA. Ministerio de Salud. Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnololia Medica. Legislação. Normativa: Productos Médicos. **Normativa de Productos Medicos**. Disponível em: www.anmat.gov.ar/normativa/Normativa/productosmedicos.htm. Acesso em: 11 jun. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.485**: produtos para a saúde – sistemas de gestão da qualidade – requisitos para fins regulamentares. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14.864**: diagnóstico *in vitro* - procedimentos para validação de reagentes ou sistemas de diagnóstico. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços. Consulta a Banco de Dados. Produtos para Saúde. Produtos para Saúde. Enquadramento de Produtos para Uso *In Vitro*. **Relação de nomenclaturas técnicas dos produtos para diagnóstico *in vitro* e os respectivos enquadramentos nas classes de risco previstas**: Resolução - RDC n.206, de 17 de novembro de 2006. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/produtosauade/enquadramento/tab_invitro_.pdf. Acesso em: 05 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Decreto n.79.094, de 5 de janeiro de 1977**. Regulamenta a Lei n.6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete a um sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16611&word=#>'. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Lei n.6.360, de 23 de setembro de 1976**. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16615&word=>. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Lei n.9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16621&word=>. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.8, de 23 de janeiro de 1996**. Dispõe sobre o registro de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* na Secretaria de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=783&word=>. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.686, de 27 de agosto de 1998**. Determina a todos os estabelecimentos que fabriquem, produtos para diagnóstico de uso “*in vitro*”, o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelas “Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico de uso “*in vitro*”. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=842&word=>. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.59, de 27 de junho de 2000**. Determina a todos os fornecedores de produtos médicos, o cumprimento dos requisitos estabelecidos pelas “Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos”. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15279&word=>. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretarias do Ministério. Vigilância em Saúde. Conheça o site da Secretaria de Vigilância em Saúde. Glossário de Doenças e outros tópicos de A a Z. Doença de Chagas. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. (Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.38, supl.3, 2005). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/consenso_chagas.pdf. Acesso em: 19 set. 2007.

BRASIL. Resolução RDC n.153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.120, 24 jun. 2004. Seção 1, p.68-83.

BRASIL. Resolução RDC n.206, de 17 de novembro de 2006. Estabelece Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.221, 20 nov. 2006. Seção 1, p.36-38.

BRASIL. Resolução RE n.1, de 29 de julho de 2005. Autoriza a publicação do Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.146, 1 ago. 2005. Seção 1, p.119.

CÂMARA AMERICANA DE COMÉRCIO. Amcham Brasil. **Relatório sobre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. S.l.: Amcham Brasil, 2007. 122p. Disponível em:

http://www.abimed.org.br/email/downloads/relatorio_anvisa_2007_final.pdf. Acesso em: 12 set. 2007.

CANADÁ. Department of Justice. Canadá Site: Laws. Regulations by Title. **SOR/98-282: Medical Devices Regulations**. Disponível em: <http://laws.justice.gc.ca/en/f-27/sor-98-282/text.html>. Acesso em: 26 jul. 2007.

CANADÁ. Health Canada. Drugs and Health Products. Medical Devices. Application Information. **Guidance Documents**. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/md-im/applic-demande/guide-ld/index_e.html. Acesso em: 26 jul. 2007.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **Journal of Protozoology**, v.14, p.447-451, 1967.

CONTRERAS, V.T.; NAVARRO, M.C.; LIMA, A.R.; ARTEAGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, p.1213-1220, 2002.

CORRAL, R.S.; ALTCHER, J.; ALEXANDRE, S.R.; GRINSTEIN, S.; FREILIJ, H.; KATZIN, A.M. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital and chronic Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.8, p.1957-1962, 1996.

CROWTHER, J.R. Validation of diagnostic tests for infectious diseases. In: CROWTHER, J.R. **The ELISA guidebook**. Totowa: Humana Press, 2001. p.301-345. (Methods in Molecular Biology, v.149).

DI NOIA, J.M.; BUSCAGLIA, C.A.; DE MARCHI, C.R.; ALMEIDA, I.C.; FRASCH, A.C.C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **Journal of Experimental Medicine**, v.195, n.4, p.401-413, 2002.

EUROPA: o Portal da União Européia. A EU num ápice. História. **A história da União Européia**. Disponível em: http://europa.eu/abc/history/index_pt.htm. Acesso em: 26 abr. 2007.

EUROPA: o Portal da União Européia. Decisão da Comissão, de 07 de maio de 2002. Relativa a especificações técnicas comuns para dispositivos médicos de diagnóstico de uso *in vitro* (notificada com o número C(2002) 1344). **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, v.45, n.L131, p.17-30, 2002. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l_131/l_13120020516pt00170030.pdf. Acesso em: 19 set. 2007.

EUROPA: o Portal da União Européia. Directiva 2003/94/CE da Comissão, de 8 de outubro de 2003, que estabelece princípios e diretrizes das boas práticas de

fabricação de medicamentos para uso humano e medicamentos experimentais para uso humano. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, v.46, n.L262, p.22-26, 2003. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2003/l_262/l_26220031014pt00220026.pdf. Acesso em: 19 set. 2007.

EUROPA: o Portal da União Européia. Directiva 98/79/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de outubro de 1998, relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, v.41, n.L331, p.1-37, 1998.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Doença de Chagas. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.22, p.241-249.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Sorologia: importância e parâmetros. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.1, p.1-8.

FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L.; BECK, S.T. Parâmetros e controle de qualidade de imunoensaios. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.4, p.39-46. (Ciências Farmacêuticas).

FRADE, A.F. **Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da doença de Chagas, em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5 anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil**. São Paulo, 2005. 113p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

GASTAL, F.L.; ROESSLER, I.F., COSTA, P.M. História e Saúde. In: ORGANIZAÇÃO NACIONAL DE ACREDITAÇÃO. **TALSA Multiplicadores: Treinamento em Avaliação de Serviços, Licenciamento Sanitário e Acreditação – Multiplicadores**. Brasília: ONA, 2004. mód.1. [Apostila].

HAYNES, P.A.; RUSSELL, D.G.; CROSS, G.A.M. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2979-2988, 1996.

HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; NAGASSE, T.K. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.20, p.208-212, 1978.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.11, p.85-108. (Série Biblioteca Biomédica).

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the olin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 5 March 2002. Disponível em: http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FERM%2FERM4_05%2FS1462399402004118a.pdf&code=e0492669b44442afead73b8e039e5e6c. Acesso em: 19 set. 2007.

MANNING-CELA, R.; CORTÉS, A.; GONZÁLES-REY, E.; VAN VOORHIS, W.C.; SWINDLE, J.; GONZÁLES, A. LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.69, n.6, p.3916-3923, 2001.

MENEGHISSE, C.S. Desenvolvimento, produção, validação e boas práticas de fabricação de kits imunodiagnósticos. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.10, p.99-107.

MENEGHISSE, C.S.; VAZ, A.J.; BARBOSA, J.F.; IHA, A.H. Validação de reagentes para diagnóstico *in vitro*: caracterização do antígeno *T. cruzi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 39, São Paulo, 2005. **Resumos**. São Paulo, 2005.

MERCOSUL: Portal Oficial. Documentos Oficiais. Normativa. Resoluções. 1995. **n.4: Boas práticas de fabricação de produtos médicos**. Disponível em: <http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/pt/index.htm>. Acesso em: 26 jul. 2007.

MERCOSUL: Portal Oficial. Documentos Oficiais. Normativa. Resoluções. 1996. **n.79: Registro intrazona de produtos diagnósticos de uso-in-vitro-tendo em vista: o tratado de assunção, o protocolo de ouro preto e a resolução n.38/95 do Grupo Mercado Comum**. Disponível em: <http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/pt/index.htm>. Acesso em: 26 jul. 2007.

MERCOSUL: Portal Oficial. Documentos Oficiais. Normativa. Resoluções. 1996. **n.65: Guia de buenas practicas de fabricacion y control para - reactivos de diagnostico de uso "in vitro"**. Disponível em: <http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/pt/index.htm>. Acesso em: 26 jul. 2007.

OTANI, M.M. **Programa de avaliação externa para os testes de triagem sorológica de doadores de bancos de sangue dos centros de referencia da América Latina**: utilização de multipainel específico. São Paulo, 2003. 158p. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia**: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 583p.

PERONE, D.; SANTOS, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; CICARELLI, R.M.B. *Trypanosoma cruzi*: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TcrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody. **Parasitology**, v.126, p.577-583, 2003.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.27.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.92-100, 2001.

RODRIGUEZ, J.B. Specific molecular targets to control tropical diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, n.12, p.1105-1116, 2001.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.2, p.24-25.

SILVA JÚNIOR, J.G. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125p.

SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v.17, n.6, p.286-291, 2001.

TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.5, p.463-491, 2006.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER J.R.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chaga's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2143-2147, 1996b.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; GRUBER, A.; PEREIRA-CHIOCOLLA, V.L.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological

evaluation of an outbreak of acute Chagas' disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p.87-93, 1996a.

UMEZAWA, E.S.; SILVEIRA, J.F. Serological diagnosis of chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, suppl.1, p.285-288, 1999.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Medical Devices. 21 CFR Parts 808, 812 and 820. Medical devices. **Current Good Manufacturing Practice (cGMP)**: final rule. Disponível em: <http://www.fda.gov/cdrh/fr1007ap.pdf>. Acesso em: 3 maio 2007.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Devices and Radiological Health. Title 21- Food and Drugs. Chapter I-Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter H-Medical Devices. **Part 809: In Vitro Diagnostic Products for Human Use**. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=809&showFR=1>. Acesso em: 26 nov. 2005.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Devices and Radiological Health. Title 21- Food and Drugs. Chapter I-Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter H-Medical Devices. **Part 862: Clinical Chemistry and Clinical Toxicology Devices**. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=862&showFR=1>. Acesso em: 4 maio 2007.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Devices and Radiological Health. Device Classification Panels. **Device Classes**. Disponível em: http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/3132.html#class_1. Acesso em: 26 nov. 2005.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Devices and Radiological Health. **Overview**: Pre Market Approval. Disponível em: <http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/pma/>. Acesso em: 04 mai. 2007.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Center for Devices and Radiological Health. Office of In Vitro Diagnostic. Device Evaluation and Safety. **Overview of IVD Regulation**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/regulatory-overview.html#1>. Acesso em: 3 mai. 2007.

URUGUAI. Ministerio de Salud Publica. Reglamentacion relativa al DTM. **Decretos relativos AL DTM**. Disponível em: www.msp.gub.uy/noticia_180_1.html. Acesso em: 10 maio 2007.

VAZ, A.J. Imunoensaios utilizando conjugados. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.8, p.67-83.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. **The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**: a guide with abstracts of microplates applications. Guernsey: Dynatech Laboratories, 1979. 128p.

WIKIPÉDIA. **Chagas ciclo de doença**. [Imagem JPG]. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Chagas_ciclo_de_doen%C3%A7a.JPG. Acesso em: 26 nov. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease**: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 2002. (WHO Technical Report Series, 905).

ZARATE-BLADES, C.R.; BLADÉS, N.; NASCIMENTO, M.S.; SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA E.S. Diagnostic performance of testes based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.57, p.229-232, 2007.