

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE  
JOAQUIM VENÂNCIO

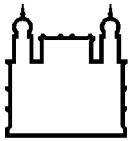
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**  
**Ensino Médio Integrado à Educação Profissional**  
**Técnica de Nível Médio em Saúde**  
**Laboratório em Bodiagnóstico em Saúde**

A importância do Setor de Controle de Qualidade  
de Reativos de Bio-Manguinhos

Diana Praia Borges

Rio de Janeiro

2008



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE  
JOAQUIM VENÂNCIO

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**  
**Ensino Médio Integrado à Educação Profissional**  
**Técnica de Nível Médio em Saúde**  
**Laboratório em Bodiagnóstico em Saúde**

**A importância do Setor de Controle de Qualidade  
de Reativos de Bio-Manguinhos**

**Diana Praia Borges**

Monografia apresentada à Escola Politécnica  
de Saúde Joaquim Venâncio para obtenção  
de título de técnico em Laboratório de  
Bodiagnóstico em Saúde.

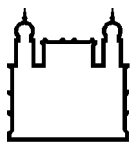
Rio de Janeiro

2008

Borges, Diana Praia

A importância do Setor de Controle de Qualidade de Reativos de Bio-Manguinhos. Rio de Janeiro, RJ. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 2008.

1. Controle de qualidade.
2. Imunofluorescência Indireta.
3. Ensaio imunoenzimático.
4. Imunocromatografia de fluxo (Teste Rápido).



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE  
JOAQUIM VENÂNCIO

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio**  
**Ensino Médio Integrado à Educação Profissional**  
**Técnica de Nível Médio em Saúde**  
**Laboratório em BIODIAGNÓSTICO em Saúde**

A importância do Setor de Controle de Qualidade  
de Reativos de Bio-Manguinhos.

**Diana Praia Borges**

Orientador: Prof. Dr. Renato Matos Lopes

Co-orientador: Luiz Alberto Pereira

Aprovada em 28 de Abril de 2008 pela banca examinadora:

Profº: Renato Matos Lopes

Profº: Moacelio Veranio Silva Filho

Profª: Emanuelle Amorim Alves

Rio de Janeiro

2008

## RESUMO

O Controle de Qualidade (CQ) de Reativos de Bio-Manguinhos atua na padronização e na garantia de qualidade de kits para o diagnóstico da Doença de Chagas (DC), IgM para Dengue, IgM para Leptospirose, Leishmaniose Humana (LH), Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), assim como na capacitação de profissionais na utilização desses produtos. Nesse trabalho apresentamos os procedimentos operacionais do CQ envolvendo a validação dos kits produzidos por Bio-Manguinhos, os mesmos são analisados através dos métodos de Imunofluorescência Indireta (IFI) para DC, HIV, LH e LVC; Ensaio Imunoenzimático (EIE) para DC, Dengue, Leptospirose e LVC; e Teste Rápido (TR) para HIV 1/2. Descreve-se a importância da documentação e a realização do controle de processo e do controle do produto terminado em cada kit, do controle da qualidade de insumos (lâminas para IFI HIV, conjugado anti-humano e anticão para IFI) e das matérias primas (placas para EIE e lâminas para IFI). Destacam-se também as ações do CQ para garantir o monitoramento da estabilidade dos produtos, a investigação de reclamações relacionadas à qualidade do produto e o treinamento aos profissionais dos Laboratórios Centrais (LACENs) que utilizam o kit de IFI para HIV. Dentre os componentes dos kits, destacamos a importância dos soros controles que devem se comportar como réplicas idênticas de uma amostra. Os kits de EIE devem apresentar seus soros controles com densidade ótica, *cut-off* e faixa cinza dentro do valor padronizado para cada doença e também deve apresentar sensibilidade e especificidade acima de 90% para serem satisfatórios ou aprovados. Os kits de IFI devem apresentar 25-50% de parasitas ou 25-35% de células fluorescentes nas lâminas e ausência de *background* no controle negativo e PBS, podendo identificar com clareza a titulação do conjugado utilizando microscópio de IFI no aumento de 40x. Para o kit de TR, é realizado o controle do tampão de corrida e do produto terminado, apresentando um resultado através de um reativo de cor

indicado em duas linhas rosa/roxa, uma na área de teste e outra na área de controle e um resultado não reativo apresenta somente uma linha na área de controle. O controle de qualidade de reativos produzidos por Bio-Manguinhos é essencial para que o produto atenda as exigências de qualidade do Ministério da Saúde / ANVISA.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus sou eternamente grata pela vida abundante, plena paz que tenho ao seu lado e pelas incontáveis bênçãos concedidas ao longo destes anos.

Agradeço a todos que, de alguma forma e em algum momento, contribuíram na concepção e execução deste trabalho.

Ao professor Renato, toda minha gratidão e admiração, pela agradável e respeitosa convivência como orientador e amigo, a quem admiro por sua dedicação, competência e seriedade. Sua compreensão nos momentos críticos desta trajetória foi fundamental.

Agradeço aos amigos profissionais do SECQR de Bio-Manguinhos pela solidariedade e auxílio técnico, essencial para o bom andamento deste trabalho.

Os apoios familiares, constantes e desmedidos, foram essenciais. Com minha mãe e minha irmã, compartilhei toda ansiedade e preocupação. De braços sempre abertos, elas representaram meu “porto seguro”. Brasilina e Mariana vocês trouxeram alegria nos momentos de angústia e leveza nos momentos de maior tensão.

Agradeço a oportunidade concedida pela Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio sob a direção do Profº André Malhão de ingressar no curso de Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde sob a coordenação do Profº Luiz Maurício e através desta oportunidade estar inserida na Fundação Oswaldo Cruz.

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Enzimas mais comuns, substrato, cromógeno e sua mensuração correspondente, formando uma solução reveladora para EIE.....  | 7  |
| <b>Tabela 2:</b> Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN) e sem soro (SS) na microplaca de EIE para diagnóstico de LVC, Dengue e Leptospirose.....  | 18 |
| <b>Tabela 3:</b> Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), controle positivo baixo (CPB) e sem soro (SS) na microplaca de EIE para diagnóstico de Doença de Chagas.....   | 18 |
| <b>Tabela 4:</b> Valores de densidade ótica (D.O.) dos soros Controle Positivo (CP), Controle Positivo Baixo (CPB), Controle Negativo (CN) e Sem Soro (SS).....  | 19 |
| <b>Tabela 5:</b> Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), sem soro (SS) e amostras numeradas de 1 a 40 (em duplicata) na microplaca de EIE para diagnóstico de LVC, Dengue e Leptospirose...20   | 20 |
| <b>Tabela 6:</b> Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), sem soro (SS) e amostras numeradas de 1 a 40 (em duplicata) na microplaca de EIE para diagnóstico de Doença de Chagas.....   | 20 |
| <b>Tabela 7:</b> Fórmulas para cálculo da média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo (XCN) para calcularmos o cut-off (CO), a faixa cinza (FC), a sensibilidade (S) e especificidade (E) dos testes. Para esses cálculos são relacionados o número de amostras verdadeiro positivas (Nº AM VP) e o número de amostras falso positivas (Nº AM FP)..... | 21 |
| <b>Tabela 8:</b> Leitura e Interpretação de uma reação de IFI para HIV-1.....  | 25 |

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| <b>RESUMO</b> .....  | v    |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....  | vii  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | viii |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  |      |
| 1.1 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio Manguinhos)....                | 1    |
| 1.2 Controle de Qualidade.....   | 2    |
| 1.3 Controle de Qualidade por Bio Manguinhos.....                                  | 4    |
| 1.4 Ensaio Imunoenzimático.....  | 6    |
| 1.5 Imunofluorescência.....  | 7    |
| 1.6 Teste Rápido (TR).....   | 9    |
| 1.7 A importância do diagnóstico sorológico.....                                   | 9    |
| <b>2 OBJETIVO</b> .....  | 12   |
| <b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....   | 13   |
| 3.1 Reativos.....  | 13   |
| 3.2 Métodos de Bio-Manguinhos.....   | 14   |
| 3.3 Procedimento da análise de EIE.....  | 17   |
| 3.3.1 Análise do controle de processo de EIE.....                                  | 17   |
| 3.3.2 Análise do produto terminado de EIE.....                                     | 19   |
| 3.3.3 Avaliação dos resultados de EIE.....   | 20   |
| 3.4 Procedimento da análise de IFI.....  | 22   |
| 3.4.1 Análise do controle de processo de IFI.....                                  | 22   |
| 3.4.2 Análise do produto terminado de IFI.....                                     | 24   |
| 3.4.3 Avaliação dos resultados de IFI.....   | 24   |
| 3.5 Imunocromatografia de fluxo (Teste Rápido para HIV1/2).....                    | 26   |
| 3.5.1 Análise do tampão de corrida no controle de processo do<br>Teste Rápido..... | 26   |
| 3.5.2 Análise do produto terminado de Teste Rápido.....                            | 27   |
| <b>4 CONCLUSÃO</b> .....   | 29   |
| <b>5 ANEXO</b> .....   | 30   |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 31   |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos):

Bio-Manguinhos é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), fundado em 1976, sendo uma referência na produção e desenvolvimento de imunobiológicos para atender às demandas de saúde pública, tais como: vacinas, kits de reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos. Em 1982, Bio-Manguinhos iniciou a produção de reagentes para diagnóstico laboratorial, procurando desenvolver padrões tecnológicos e de qualidade para atender às demandas do Sistema Único de Saúde (SUS). (1)

Atualmente, Bio-Manguinhos é o maior fornecedor de imunobiológicos do Ministério da Saúde, produzindo cerca de 100 milhões de doses anuais em forma de concentrado viral e cerca de 60 milhões de doses de vacina formulada para atender a demanda de vacinas do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e às Agências das Nações Unidas. Fornece cerca de três milhões de kits de reativos para diagnóstico, por ano, aos programas públicos da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB), ao Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST/Aids) e aos programas de vigilância epidemiológica, através do controle de endemias e agravos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). É qualificado desde 2001 junto a Organização Mundial de Saúde para fornecimento da vacina contra a febre amarela para as Agências das Nações Unidas, além de exportar diretamente para mais de 50 países. As vacinas produzidas contra a Febre Amarela e contra o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) possuem tecnologia 100% brasileira. É líder nas exportações nacionais de vacina humana e responsável por uma importante participação nas vendas totais do setor farmacêutico para o mercado externo. (1)

Comprometido com os avanços na área de saúde e o acesso da população a imunobiológicos, Bio-Manguinhos possui um dos maiores e mais avançados parques industriais da América Latina: o Complexo Tecnológico de

Vacinas (CTV). Tem 30 projetos em desenvolvimento: oito de vacinas bacterianas, oito de vacinas virais, sete de reativos para diagnóstico e sete de biofármacos. O Centro de Processamento Final de Bio-Manguinhos (CPFI) tem capacidade de produção anual de 300 milhões de doses de vacinas e possui a maior capacidade de liofilização da América Latina. (1)

Desde 2004, o Instituto também atua no desenvolvimento e na produção de biofármacos procurando garantir à população acesso gratuito a produtos de alta tecnologia e permitindo a redução dos gastos do Ministério Saúde, reduzindo a dependência de importação e a capacitação tecnológica e industrial nacional, atendendo, prioritariamente, à demanda nacional, através de uma parceria com a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. (1)

## **1.2 Controle de Qualidade:**

O compromisso de Bio-Manguinhos é desenvolver e produzir vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos dentro dos padrões da qualidade, visando contínua melhoria, motivando os colaboradores a atuarem com responsabilidade social a fim de atender as expectativas dos clientes (BIO-MANGUINHOS, 2007).

O Controle e a garantia da qualidade de Bio-Manguinhos abrangem um conjunto de medidas com o objetivo de assegurar e verificar, a qualquer momento, que os lotes produzidos cumprem uma qualidade preestabelecida. Essas medidas não são necessárias somente às operações de laboratório, mas a todas as atividades e decisões que possam afetar a qualidade do produto (BIO-MANGUINHOS, 2007).

O fabricante deve elaborar os produtos para a finalidade a que se destinam a fim de assegurar que os mesmos estejam de acordo com as exigências de qualidade, que abrangem também a identidade, a segurança e a pureza do produto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

O Setor de Controle de Qualidade de Reativos (SECQR) de Bio-Manguinhos, tratado nesse trabalho, avalia os kits para diagnóstico sorológico

com o objetivo de cumprir com os requisitos de qualidade nos procedimentos operacionais para detectar os possíveis erros dos processos produtivos que possam interferir nos resultados do diagnóstico sorológico (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Para que o resultado final do kit fornecido, tanto pelo controle de qualidade quanto pelo laboratório usuário, seja confiável e útil é necessário que se estabeleça um programa completo de garantia de qualidade que acompanha desde o processo de aquisição da matéria-prima, até a liberação do produto acabado ao consumidor (NUNES et. Al, 2005). Esse programa possui uma política que abrange e orienta o estabelecimento de ações, tais como: a definição das responsabilidades da equipe de trabalho, organizando-a e fazendo treinamentos e atualizações constantes; o estabelecimento de todas as tarefas de procedimentos operacionais padrões; a documentação da detecção de erros e das medidas corretivas adotadas; a avaliação e o estabelecimento das metas de qualidade. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A matéria prima utilizada na fabricação dos produtos pode ser uma substância ativa ou não, podendo ser parte (inalterada ou modificada) do produto terminado ou desaparecer durante o processo de produção. O Produto Terminado é aquele que foi submetido a todas as etapas de fabricação, incluindo-se a sua rotulagem e embalagem final. Para assegurar que o produto terminado atenda a suas especificações e o processo da produção seja adequado para esta finalidade, o controle de processo é realizado no material parcialmente processado. Este material deve ser submetido a etapas posteriores de fabricação antes de transformar-se em produto terminado. O produto terminado é aprovado quando atende a todos os requisitos de suas especificações ou rejeitado quando não atende a um ou mais requisitos de suas especificações. Pode ser realizado um reprocessamento de um produto rejeitado, a partir de uma etapa definida de produção, de forma que sua qualidade se torne aceitável como consequência de uma ou mais operações adicionais. É de suma importância que todas as operações sejam realizadas de acordo com Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) aprovados e que

todos os procedimentos sejam registrados para que seja possível um rastreamento das atividades realizadas relativas aos produtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Os POPs são utilizados para padronizar ações que podem ser executadas da mesma maneira por diferentes técnicos e descrevem detalhadamente cada procedimento a ser realizado no laboratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A identificação de todo produto deve ser fixada na embalagem primária e secundária (se houver), com rótulos de dimensões adequadas, de fácil leitura e compreensão para o usuário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O controle de qualidade também deve garantir o monitoramento da estabilidade das substâncias ativas e dos produtos e participar da investigação de reclamações relacionadas à qualidade do produto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Para provar que um procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, realmente levam aos resultados esperados é necessário realizar uma ação documentada denominada validação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Todos os ensaios devem ser realizados de acordo com procedimentos escritos e validados, utilizando equipamentos que devem ser calibrados a intervalos adequados e reagentes que devem ser de qualidade apropriada, bem como os profissionais do laboratório que devem ser suficientes e qualificados. O laboratório deve estar equipado para realizar todos os ensaios de controle de qualidade necessários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

### **1.3 Controle de Qualidade por Bio-Manguinhos:**

O controle de qualidade é parte essencial do sistema da qualidade de Bio-Manguinhos. Para atender às suas diretrizes são realizadas e documentadas a análise das matérias-primas, dos produtos intermediários, das embalagens e dos produtos terminados fabricados. Também são documentadas e realizadas ações como o apoio ao desenvolvimento de novos produtos e ensaios clínicos e

o investimento na melhoria contínua destes, a qualificação de fornecedores e definição de especificações para aquisição de bens de consumo junto com outras unidades organizacionais e a investigação e avaliação dos questionamentos de clientes internos e externos quanto à qualidade dos produtos. (BIO-MANGUINHOS, 2008).

Desde 2001, o controle de qualidade de reativos realizado no Setor de Controle de Qualidade de Reativos (SECQR) vem sendo importante como um instrumento para aferição da qualidade dos reativos para diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos. Bio-Manguinhos tem incorporado metodologias de controle inovadoras, através de parcerias e de uma equipe altamente qualificada. Na média, o índice de aprovação dos kits para diagnóstico é acima de 93%, com algumas não conformidades identificadas, que levam a medidas corretivas para o incremento da qualidade. (1)

Os kits de diagnósticos produzidos são analisados pelos métodos de Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e Imunocromatografia de Fluxo (Teste Rápido para HIV). O EIE é utilizado para o diagnóstico sorológico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), IgM Leptospirose, IgM Dengue e Doença de Chagas e o IFI para o diagnóstico sorológico de Doença de Chagas, HIV, LVC e Leishmaniose Humana (BIO-MANGUINHOS, 2008).

Além do controle do produto intermediário ou pré-kit (controle de processo) e do produto terminado (controle do produto terminado), também é controlada a qualidade de insumos e das matérias primas utilizados para a montagem do pré-kit e do produto terminado (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os insumos são as lâminas para IFI HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), os conjugados anti-humano e anticão e as matérias primas são as placas para Ensaio Imunoenzimático (EIE) e as lâminas para Imunofluorescência Indireta (IFI) e IFI-HIV (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os erros encontrados podem, de maneira geral, se agrupar em aleatórios, onde sua maior ou menor magnitude é definida pela precisão do método e erros sistemáticos, que são erros que extrapolam a média comum dos erros

aleatórios. Os erros sistemáticos são mais grosseiros e podem se prevenir, enquanto os aleatórios são imprescindíveis. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

#### **1.4 Ensaio Imunoenzimático (EIE)**

Com o EIE realiza-se a pesquisa de anticorpos específicos em soro ou plasma reagindo soros com antígenos ou imunorreagentes previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas (fase sólida) previamente sensibilizadas. São adicionados às microplacas os controles do teste e as amostras a serem analisadas que, possuindo anticorpos específicos, se fixam aos antígenos. Em seguida, é adicionada uma antiimunoglobulina marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos, caso estejam presentes. A reação é evidenciada pela utilização de substâncias cromógenas que reagem com a enzima peroxidase, gerando coloração medida em aparelho de absorvância (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

A sensibilização da microplaca de EIE consiste em revestir a placa com o antígeno tratado com solução alcalina (pH superior a 8), deixando-o com carga negativa, para promover a adsorção à placa passivamente por interação eletrostáticas (forças coulômbicas), em virtude das cargas positivas do poliestireno ou polivinil utilizado para condicioná-las (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Enzimas, como a fosfatase alcalina e a peroxidase, são macromoléculas de natureza protéica com função biológica, alto poder catalítico de reações químicas e elevada especificidade ao substrato correspondente. Podem ser conjugadas com antígenos (Ag-E) e anticorpos ou anti-anticorpos (Ac-E) formando o conjugado enzimático utilizado no ensaio (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

A coloração do sistema é alterada ao se adicionar uma solução reveladora composta de um substrato ( $H_2O_2$ ) correspondente à enzima Peroxidase conjugada e um cromógeno (Tetrametilbenzidina -TMB). A quebra do substrato pela enzima conjugada e seus produtos atuam no cromógeno que é um componente doador de elétrons. Na Tabela 1 apresentamos as enzimas mais

comuns e seus substratos e cromógenos correspondentes (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

A mensuração da tabela 1 corresponde ao comprimento de onda utilizado para a leitura dos orifícios das microplacas de EIE que pode ser realizada por um espectrofotômetro apropriado, que transforma a intensidade da cor em números descritos como Densidade Óptica (D.O.) (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

| ENZIMA             | SUBSTRATO / CROMÓGENO / MENSURAÇÃO                              |
|--------------------|---|
| Peroxidase         | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / o-fenilenodiamina (oPD) / 492nm |
|                    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Tetrametilbenzidina / 450 nm    |
| Fosfatase Alcalina | p-nitrofenil-fosfato (pNP) / 405nm                              |

*Tabela 1: Enzimas mais comuns, substrato, cromógeno e sua mensuração correspondente, formando uma solução reveladora para EIE.*

O valor de corte (Cut-off) de EIE varia de acordo com o antígeno em análise, de maneira que assegure as características mais adequadas do ensaio para o correto diagnóstico sorológico. O título do Cut-off é determinado multiplicando a média dos soros negativos pelo desvio padrão do mesmo indicado na bula dos reativos. O título deve estar em uma zona intermediária entre os resultados reativos (positivos) e os não reativos (negativos). Pelo valor encontrado no título do Cut-off, estabelecemos a especificidade e sensibilidade do reativo com um painel de soro de referência (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

O método apresenta alta sensibilidade quando apresenta enzimas altamente ativas, antígenos puros, substratos de alta qualidade, anticorpo e conjugado em ótimas condições (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

### **1.5 Imunofluorescência**

A imunofluorescência é o teste mais utilizado no diagnóstico de laboratório para a pesquisa de anticorpos e baseia-se na capacidade das moléculas de anticorpo se ligar covalentemente a marcadores fluorescentes (fluorocromos)

sem perder sua reatividade específica com o antígeno (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Os fluorocromos geram um fenômeno denominado fluorescência, pois são substâncias que absorvem luz de um comprimento de onda menor, e quando excitados com a luz ultravioleta emitem luz de comprimento de onda maior. São muito sensíveis as visualizações e diferem quanto ao espectro de excitação e emissão. A grande vantagem do uso de marcadores é que mesmo concentrações extremamente baixas de fluorocromos (ex. 10-18 g) podem ser detectadas através do microscópio de fluorescência (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

A seleção do material empregado para o preparo do conjugado é muito importante para a qualidade do teste. Para se ter reações mais específicas empregaram conjugados preparados com anti-soros potentes que podem ser utilizados em altas diluições, enquanto que anti-soros de má qualidade dão origem a conjugados cujas reações apresentam elevada coloração de fundo (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

O uso de corantes, como azul de Evans diminui a coloração de fundo da lâmina quando visualizada no microscópio de imunofluorescência. As lâminas antes de serem visualizadas no microscópio de imunofluorescência com objetiva de aumento de 40x são montadas em glicerina alcalina porque a intensidade de luz emitida pela fluoresceína depende do pH do meio, sendo máxima em pH 8,5 (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

O microscópio de imunofluorescência possui uma lâmpada de mercúrio, de instalação cara e possui vida média de 200 horas ou menos, como fonte de luz de alta intensidade que junto com os filtros de excitação relacionam comprimento de onda capaz de ativar a fluoresceína, e filtros de barreira, que removem interferentes da luz e permitem alta transmissão da fluorescência emitida. O sistema intercambial de filtro permite o exame da amostra em diferentes comprimentos de onda, no caso de colorações com mais de um fluorocromo (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

A imunofluorescência pode ser dividida em direta e indireta. O método indireto pode ser utilizado nos mesmos sistemas que empregam o método direto, porém é mais sensível que o direto, pois o anticorpo não marcado tem mais sítios de ligação que o antígeno. Ocorre uma amplificação com o uso de dois anticorpos, é mais fácil de ser controlada e podemos utilizar um único conjugado para diferentes sistemas. Porém necessita de maior tempo, mais reagentes e pode ser menos específica (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Devido ao maior número de moléculas fluorescentes que irão corresponder a cada determinante antigênico, observamos a maior intensidade de fluorescência nas técnicas indiretas (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Para a leitura e interpretação das reações é necessário utilizar o microscópio de imunofluorescência com a lente objetiva de 40X. Em algumas preparações de lâminas, a presença de grumos de células pode ser observada no centro dos poços da lâmina. Neste caso, para facilitar a interpretação do teste, recomendamos a realização da leitura em campos mais periféricos, onde não são observadas aglomerações de células. É necessário focalizar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nas células ou parasitas, bem como a coloração de fundo (“background”) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

## **1.6 Teste Rápido (TR)**

O Teste Rápido é destinado para pesquisa de anticorpos específicos para HIV. O teste é composto por uma membrana de nitrocelulose, contendo os elementos de reação ajustados em um invólucro plástico apropriado, com uma janela para se acrescentar à amostra de teste e outra para leitura do resultado da reação formando um cassete. O princípio de funcionamento baseia-se na reação específica antígeno-anticorpo. Compõe-se de uma fase sólida (membrana), na qual estão imobilizados elementos de captura (antígeno), e uma fase móvel, na qual estão suspensos o conjugado de captura e a molécula-alvo que é o anticorpo anti-HIV (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

### **1.5 A Importância do diagnóstico sorológico:**

Os testes sorológicos são importantes para suprir as deficiências dos métodos parasitológicos ou microbiológicos na pesquisa de antígenos, anticorpos ou imunocomplexo, pela rapidez, simplicidade de execução, possibilidade de automação e baixo custo operacional. Na pesquisa de anticorpos, os métodos imunológicos diretos ou indiretos têm sido amplamente utilizados para que se tenham várias possibilidades de um diagnóstico de certeza de um processo infeccioso, pois nem sempre este diagnóstico é possível, quer pela ausência do agente infeccioso, quer pela falta de sensibilidade dos métodos utilizados, por falhas técnicas ou por longos períodos exigidos para uma resposta do laboratório. Na pesquisa de anticorpos, os testes sorológicos têm sido utilizados como auxiliares no diagnóstico individual (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Para que os testes sorológicos utilizados para definição da ausência do patógeno ou de seus produtos apresentem elevados níveis de sensibilidade e especificidade é necessário utilizar anticorpos altamente específicos em técnicas rigorosamente padronizados. Tais anticorpos são denominados de monoclonais, estes são a base para vários testes de pesquisas de antígenos e por serem altamente específicos proporcionam um grande avanço no desenvolvimento dos testes para imunodiagnóstico (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Nos últimos anos houve um grande desenvolvimento nos testes para imunodiagnóstico, principalmente com relação aos antígenos e anticorpos empregados no Brasil e, em menor escala, com relação aos métodos. Observamos uma maior tendência ao aperfeiçoamento e a consolidação dos testes já existentes, em vez do desenvolvimento de técnicas baseadas em novos princípios (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Os testes sorológicos têm se tornado cada vez mais refinados e de execução simples, porém, para se garantir a qualidade dos resultados, é necessário um controle bem rigoroso. As técnicas devem ser cuidadosamente padronizadas quanto à concentração do antígeno, tempo, temperatura, diluentes

entre outros. Deve-se sistematicamente, monitorar os testes empregando amostras de um painel de soros rigorosamente padronizados. As condições de realização dos testes e de leitura dos resultados devem ser padronizadas em cada laboratório (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

O controle de qualidade, bem como o conhecimento da aplicação dos testes sorológicos e a correta interpretação dos resultados obtidos, são fundamentais para clínicos, patologistas e laboratoristas orientarem seus resultados obtidos às investigações clínicas e epidemiológicas (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

## **2 OBJETIVO**

Demonstrar a importância do Controle de Qualidade para a produção de reativos para diagnóstico sorológico, bem como o procedimento deste controle por Bio-Manguinhos esclarecendo a necessidade de um correto diagnóstico laboratorial para as investigações clínicas e epidemiológicas.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Reativos

Os reativos são usados para determinar e quantificar antígenos ou anticorpos presentes no soro, plasma ou sangue, utilizando um conjunto de insumos com o objetivo de investigar uma doença ou infecção no indivíduo ou na população (FERREIRA & ÁVILA, 1998). O anticorpo é uma molécula específica de origem celular (imunoglobulina) formada como resposta a um estímulo de um antígeno. O antígeno é um componente biológico vivo ou inativado, específico e sensível que reagindo com o anticorpo, torna possível o diagnóstico de uma doença ou infecção (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003).

Os anticorpos monoclonais são proteínas produzidas para detectar ou combater antígenos específicos de microorganismos que causam doenças específicas no organismo podendo ser utilizados para o conhecimento das características do antígeno de interesse e no estudo de sua imunogenicidade. São mais utilizados no Brasil como reagente para diagnóstico, porém seu uso como terapia para determinadas enfermidades está se difundindo no mundo (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

O conjugado antiimunoglobulina humana e canina é marcado com isotiocianato de fluoresceína (ITFC), um fluorocromo que apresenta alta intensidade da luz emitida e maior sensibilidade da retina à cor verde. Pelo método de imunofluorescência indireta, apresenta um título mínimo de fluorescência de 1:100 e é utilizado em diagnósticos laboratoriais na detecção específica de imunoglobulinas (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Apesar da importância dos insumos, os soros controles são um dos principais componentes dos kits. Estes são aliqüotados individualmente e conservado junto com os outros componentes. Os soros controles devem se comportar como réplicas idênticas de uma amostra, devendo ser límpidos, livres de hemólise e estarem devidamente filtrados antes de serem utilizados para controlar os processos analíticos dos kits produzidos. Devem ser armazenados, aliqüotados e congelados de tal modo que se assegure a estabilidade do soro para repetidas utilizações diárias em no mínimo alguns meses. São adicionados estabilizantes e/ou bacteriostáticos como azida sódica, mertiolate, glicerina, etilenoglicol ou Bronidos para manter a estabilidade dos mesmos (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

É de suma importância a seleção das amostras utilizadas para a definição de parâmetros sorológicos como sensibilidade e especificidade pelo controle de qualidade. Estas amostras são selecionadas de populações de indivíduos sabidamente doentes e não doentes. Para se evitar resultados falsos positivos, deve-se levar em consideração as diferentes fases do processo infeccioso, além de fatores como a epidemiologia e os achados clínicos e laboratoriais na seleção das amostras de soro (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Determinamos a sensibilidade do teste a fim de demonstrar o quanto o mesmo é sensível para encontrar a porcentagem de pacientes doentes com teste positivo em uma população sabidamente infectada (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

Para se determinar a especificidade do teste, é definida a porcentagem de indivíduos “normais” com teste negativo em população sabidamente identificada. Entende-se por indivíduo normal, aquele que não é portador da doença para a qual o diagnóstico do teste é destinado. A especificidade pode ser influenciada por inúmeros fatores que levam a falsos resultados positivos, como por exemplo, indivíduos polinfectados por parasitas intestinais apresentam um somatório de componentes antigênicos que reagem cruzadamente com inúmeros antígenos - alvo dos testes sorológicos (FERREIRA & ÁVILA, 1998).

### 3.2 Métodos de Bio-Manguinhos

Cada kit produzido no Instituto baseia-se em Imunofluorescência Indireta (IFI) para o diagnóstico de HIV, Doença de Chagas, Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e Leishmaniose Humana, em Ensaio Imunoenzimático (EIE) para o diagnóstico de Doença de Chagas, Leptospirose, Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e Dengue e em Imunocromatografia de fluxo – Teste Rápido (TR) para HIV1/2 (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os insumos produzidos para os reativos de Bio-Manguinhos são os anticorpos monoclonais, conjugado anti-humano e anti-cão e lâminas para IFI HIV.

Os anticorpos monoclonais são aplicados como reagentes na elaboração de sistemas de detecção das doenças, gerando kits para o diagnóstico destas, além de também serem usados no controle das vacinas produzidas por Bio-Manguinhos. (1)

As amostras de soro recebidas para a montagem dos Painéis Sorológicos Internos são provenientes de Instituições Nacionais e do Laboratório de Painel Sorológico de Bio-Manguinhos (LAPPS/ DERED). Os painéis sorológicos são montados com amostras de soro processadas, caracterizadas sorologicamente e envasadas de acordo com o diagnóstico a ser aplicado. É realizada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) a análise e validação destas amostras, que são utilizadas como painel interno para suas respectivas doenças (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os kits são produzidos e armazenados em Bio-Manguinhos no Departamento de Reativos para Diagnostico (DERED) até serem retirados pelo Setor de Amostragem (SEAMO) e encaminhados ao SECQR. As amostragens dos kits são separadas e armazenadas conforme acondicionamento especificado na bula de uso do kit, em freezer e geladeiras devidamente validadas (BIO-MANGUINHOS, 2007).

O SECQR realiza a análise das matérias primas (microplacas para EIE, Lâminas para IFI HIV e lâminas para IFI sem sensibilização), e a análise de

insumos (controle de processo de lâminas para IFI-HIV e do conjugado anti-humano para IFI) testada com um kit aprovado dentro do período de validade. Além das análises do controle de processo e do produto terminado de IFI, EIE e TR (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Após a análise do controle de processo, as amostras podem ser liberadas para o uso na produção, se o resultado for conforme o padronizado pelo Instituto. Novas amostras podem ser enviadas ao SECQR para serem reprocessadas por no máximo 03 vezes, se o resultado for não conforme, exceto para as lâminas sem sensibilização que são descartadas se forem não conformes. Após a amostra ser reprocessada, estando conforme, a mesma é liberada para o uso na produção. Se o resultado continuar não conforme, a amostra é descartada. Todo procedimento é registrado e documentado e um laudo é feito e entregue ao SEAMO (Setor de Amostragem) em ambos os casos (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Após a análise do produto terminado, se o resultado for conforme, o produto é liberado como aprovado e um quantitativo de amostra é destinada ao SECQR e armazenado na câmara fria (2ª a 8°C e -20°C) devidamente validada, para análises periódicas para o teste de estabilidade e reteste para atender a reclamações do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os testes de estabilidade são realizados em todos os kits de produto terminados aprovado com o objetivo de avaliar a estabilidade das características do kit durante o tempo de validade determinado e após a validade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As análises de EIE são realizadas a cada dois meses e as de IFI a cada três meses, contados a partir da data da primeira análise do produto terminado do referente lote, até completar dois anos após validade. São consideradas reavaliações as análises dentro do período de validade impresso no rótulo do kit e avaliações as análises após o término da validade. Quando há reclamação do SAC, as fichas são enviadas ao SECQR pelo DEREM (Departamento de Relações com o Mercado) para serem analisadas quanto à necessidade de reteste do lote em questão. Se o reteste for necessário, um kit

correspondente ao lote da reclamação é retirado da câmara fria para análise. Após a análise a ficha é reenviada ao DEREM com os devidos resultados das análises como procedente ou improcedente (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Após a análise os kits são rearmazenados na câmara fria. O procedimento das análises segue conforme o método descrito posteriormente para Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e Imunocromatografia de Fluxo (Teste Rápido - TR) (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### **3.3 Procedimento da análise de EIE:**

Os testes iniciam-se com o preparo da diluição da amostra e conjugado, diferindo em alguns testes no uso da lecitina de leite, como nos kits de Dengue e Doença de Chagas. Nesta etapa são adicionados os soros controles positivo e negativo (no controle de processo e produto final) e, no caso do produto final, também se adicionam as amostras do painel interno (com soros padronizados). Em seguida, adicionam-se as amostras e os soros controles às respectivas diluições em microplaca de EIE composta por seis tiras (strips) duplas e segue-se para incubação na estufa a 37°C. A etapa posterior consiste na lavagem em lavadora de EIE com tampão de lavagem, proveniente do kit. Prepara-se o conjugado com o diluente de amostras /conjugado e adiciona-se em toda placa e incuba-os em estufa a 37°C. No caso do teste de Dengue IgM, anterior a esta etapa do conjugado, ocorre a diluição e adição dos antígenos; segue-se a etapa de lavagem com tampão de lavagem, proveniente do kit e a solução de revelação composta pelo cromógeno (TMB), diluente do substrato e substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com a enzima peroxidase, que também são provenientes do kit. Após esta etapa, a incubação é feita em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ao final, a reação é bloqueada pela adição de Ácido Sulfúrico (proveniente do kit), procedendo à leitura na leitora de microplacas Elisa em comprimento de onda de 450nm. (BIO-MANGUINHOS, 2007).

A etapa de lavagem das placas é realizada para retirar o excesso de imunorreagentes não ligados e ocorre entre as demais etapas do método. Utiliza-se em Bio-Manguinhos lavadoras de placas automáticas, pois estas



|          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |  |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
|          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |  |
| <b>G</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> |  |
| <b>H</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> | <b>CN</b> | <b>CN</b> | <b>CP</b> | <b>CP</b> |  |

*Tabela 3: Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), controle positivo baixo (CPB) e sem soro (SS) na microplaca de EIE para diagnóstico de Doença de Chagas.*

A análise é conforme e apresenta resultado satisfatório quando após a leitura, os valores da densidade ótica (D.O.) dos soros controles apresentarem resultados na faixa descrita na tabela 4. Devido à grande variabilidade das D.O.s, quando a amostragem do controle de processo for inconclusiva (fora da faixa descrita na tabela 4), é solicitado um quantitativo de kits para uma reanálise (BIO-MANGUINHOS, 2007).

| Doença | LVC   | Dengue           | Leptospirose     | Chagas        |
|--------|---|------------------|------------------|---------------|
| CP     | $\geq 0,700$  | $\geq 0,700$     | $\geq 0,700$     | $\geq 0,700$  |
| CPB    | --  | --               | --               | 0,220 – 0,500 |
| CN     | 0,060 – 0,110   | 0,060 –<br>0,140 | 0,060 –<br>0,180 | 0,070 – 0,120 |
| SS     | não poderá ser superior a D.O. obtida no controle negativo. |                  |                  |               |

*Tabela 4: Valores de densidade ótica (D.O.) dos soros Controle Positivo (CP), Controle Positivo Baixo (CPB), Controle Negativo (CN) e Sem Soro (SS).*

### **3.3.2 Análise do produto terminado de EIE:**

Primeiramente é realizada inspeção visual do material de embalagem, frascos, caixas de acondicionamento e dos rótulos dos componentes do kit, conforme os padrões de impressão da instituição. Se alguns destes itens estiverem errados um novo quantitativo de kits é solicitado para análise (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os soros controles e as amostras do painel interno são dispostos conforme as tabelas abaixo, sendo a tabela 5 para análise de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), Dengue e Leptospirose e a tabela 6 para Doença de Chagas, que difere das outras por apresentar além do controle positivo e negativo, um controle positivo baixo para análise (BIO-MANGUINHOS, 2007).

|   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | CP | 01 | 09 | 17 | 25 | 33 | CP | 01 | 09 | 17 | 25 | 33 |
| B | CP | 02 | 10 | 18 | 26 | 34 | CP | 02 | 10 | 18 | 26 | 34 |
| C | CP | 03 | 11 | 19 | 27 | 35 | CP | 03 | 11 | 19 | 27 | 35 |
| D | SS | 04 | 12 | 20 | 28 | 36 | SS | 04 | 12 | 20 | 28 | 36 |
| E | SS | 05 | 13 | 21 | 29 | 37 | SS | 05 | 13 | 21 | 29 | 37 |
| F | CN | 06 | 14 | 22 | 30 | 38 | CN | 06 | 14 | 22 | 30 | 38 |
| G | CN | 07 | 15 | 23 | 31 | 39 | CN | 07 | 15 | 23 | 31 | 39 |
| H | CN | 08 | 16 | 24 | 32 | 40 | CN | 08 | 16 | 24 | 32 | 40 |

*Tabela 5: Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), sem soro (SS) e amostras numeradas de 1 a 40 (em duplicata) na microplaca de EIE para diagnóstico de LVC, Dengue e Leptospirose.*

|   | 1   | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7   | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|
| A | CP  | 01 | 09 | 17 | 25 | 33 | CP  | 01 | 09 | 17 | 25 | 33 |
| B | CP  | 02 | 10 | 18 | 26 | 34 | CP  | 02 | 10 | 18 | 26 | 34 |
| C | CPB | 03 | 11 | 19 | 27 | 35 | CPB | 03 | 11 | 19 | 27 | 35 |
| D | CPB | 04 | 12 | 20 | 28 | 36 | CPB | 04 | 12 | 20 | 28 | 36 |
| E | CN  | 05 | 13 | 21 | 29 | 37 | CN  | 05 | 13 | 21 | 29 | 37 |
| F | CN  | 06 | 14 | 22 | 30 | 38 | CN  | 06 | 14 | 22 | 30 | 38 |
| G | SS  | 07 | 15 | 23 | 31 | 39 | SS  | 07 | 15 | 23 | 31 | 39 |
| H | SS  | 08 | 16 | 24 | 32 | 40 | SS  | 08 | 16 | 24 | 32 | 40 |

*Tabela 6: Disposição dos soros controle positivo (CP), controle negativo (CN), sem soro (SS) e amostras numeradas de 1 a 40 (em duplicata) na microplaca de EIE para diagnóstico de Doença de Chagas.*

### 3.3.2 Avaliação dos resultados de EIE:

Após a leitura do teste, calculamos a média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo (XCN) para calcularmos o *cut-off* (CO), a faixa cinza (FC), a sensibilidade (S) e especificidade (E) do teste.

As amostras reagentes (positivas) são aquelas que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao *cut-off*. As amostras não reagentes (negativas) são aquelas que apresentarem densidade ótica inferior ao *cut-off*. As amostras indeterminadas são aquelas com densidade ótica compreendida entre o *cut-off* e a faixa cinza, devendo ser repetidas as amostras quando apresentarem resultados falsos ou dentro da faixa cinza (BIO-MANGUINHOS, 2007).

| LVC  | Dengue   | Leptospirose                                     | Chagas   |
|--|--|--|--|
| $CO = \bar{X} CN \times 2$                       | $CO = \bar{X} CN \times 2,2$                     | $CO = \bar{X} CN \times 2,3$                     | $CO = \frac{\bar{X} CPB + \bar{X} CN}{2}$        |
| $FC = CO \times 1,2$                             | $FC = CO \times 1,1$                             | $FC = CO \times 1,2$                             | $FC = CO \times 1,2$                             |
| $S = \frac{N^{\circ} AM VP}{VP + FN} \times 100$ | $S = \frac{N^{\circ} AM VP}{VP + FN} \times 100$ | $S = \frac{N^{\circ} AM VP}{VP + FN} \times 100$ | $S = \frac{N^{\circ} AM VP}{VP + FN} \times 100$ |
| $E = \frac{N^{\circ} AM VN}{VN + FP} \times 100$ | $E = \frac{N^{\circ} AM VN}{VN + FP} \times 100$ | $E = \frac{N^{\circ} AM VN}{VN + FP} \times 100$ | $E = \frac{N^{\circ} AM VN}{VN + FP} \times 100$ |

*Tabela 7: Fórmulas para cálculo da média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo (XCN) para calcularmos o cut-off (CO), a faixa cinza (FC), a*

*sensibilidade (S) e especificidade (E) dos testes. Para esses cálculos são relacionados o número de amostras verdadeiro positivas (Nº AM VP) e o número de amostras falso positivas (Nº AM FP).*

O teste é satisfatório ou aprovado quando os valores da densidade ótica apresentam resultados na faixa descrita na tabela 4 e quando apresentarem valores de sensibilidade e especificidade acima de 90%.

Em caso com resultados insatisfatório ou de reprovação do kit, é solicitado um quantitativo de kits para uma reanálise (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### **3.4 Procedimento da análise de IFI:**

Os soros controles (positivo e negativo) são diluídos e colocados sobre o antígeno e amostras do painel interno (somente para o produto terminado) e incubado para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. As respectivas diluições são pipetadas em cada orifício correspondente, conforme as disposições das lâminas de cada teste incubam-se as mesmas em câmara úmida em estufa a 37°C. Após esta incubação as lâminas são lavadas com tampão fosfato (PBS), água WFI e secadas em estufa a 37°C. As lâminas são incubadas com o conjugado fluorescente previamente diluído em PBS – Azul de Evans e em seguida, fazem-se os mesmos procedimentos de lavagem e secagem como descrito anteriormente. Se houver anticorpo no soro, o conjugado (fluoresceína ligada a antiimunoglobulina) reage com o anticorpo específico ao antígeno. O título do conjugado, que será a máxima diluição em que se observa fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo, é determinado utilizando-se diluições seriadas do conjugado com tampão fosfato (PBS) e Azul de Evans. Para a diluição seriada deve-se adicionar glicerina proveniente do kit e proceder à leitura em microscópio próprio para Imunofluorescência utilizando a lente objetiva do microscópio com aumento de 40X. (BIO-MANGUINHOS, 2007 e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

### 3.4.1 Análise do controle de processo de IFI:

Para os kits de Leishmaniose Visceral Canina, Leishmaniose Humana e Doença de Chagas devem ser realizadas a sensibilização do antígeno nas lâminas de vidro com 12 orifícios. O antígeno correspondente ao kit é pipetado em cada orifício da lâmina um volume de 10 $\mu$ L mantendo-o homogeneizado durante o preparo. É necessário deixar secar a lâmina por duas horas em estufa a 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas (BIO-MANGUINHOS, 2004 e 2005).

Após a sensibilização, é realizada a diluição seriada dos soros controle. Para LVC e leishmaniose humana a diluição do controle positivo deve ser 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, e o controle negativo deve ser 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada. Para Doença de Chagas a diluição do controle positivo deve ser 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e o controle negativo deve ser 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada (BIO-MANGUINHOS, 2004 e 2005).

Na diluição seriada o conteúdo deve ser bem homogeneizado antes de transferir o volume para o tubo seguinte.

Essas diluições do soro devem ser adicionadas nas lâminas previamente sensibilizadas seguindo um protocolo de trabalho previamente elaborado de acordo com a instrução de uso do kit (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Para os kits de IFI HIV1, cada orifício da lâmina contém, como antígeno, células da linhagem K37-3, de origem linfocitária, infectadas pelo HIV-1. Todas as células estão infectadas, mas aproximadamente 25 a 35% das células possuem antígenos virais capazes de serem detectados em sua superfície (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A diluição do controle positivo deve ser 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256, e o controle negativo deve ser 1/8, utilizando o esquema da diluição seriada. São utilizadas 10 lâminas para encontrar a titulação do conjugado (BIO-MANGUINHOS, 2004, 2005, 2006).

Após o período de incubação e lavagem das lâminas, é necessária a diluição do conjugado com o PBS - Azul de Evans. A solução de PBS - Azul de Evans (PBS-AE) deve ser preparada a 0,004% (BIO-MANGUINHOS, 2006).

Diluindo o conjugado anti-IgG marcado com fluoresceína de acordo com a instrução de uso do kit da diluição 1/50 até 1/1050. As diluições devem ser adicionadas nas lâminas seguindo um protocolo de trabalho previamente elaborado. O fluorocromo mais comum e o utilizado no kit de Bio-Manguinhos é o isotiocianato de fluoresceína (FITC – fluorescein isothiocyanate) com comprimento de onda para absorção de 450-500 nm e comprimento de onda de emissão de 500-550 nm que é visualizado pela cor verde.

O título do conjugado deve ser definido para a definição da diluição do seu uso com a utilização de um microscópio de imunofluorescência e a lente objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado corresponderá à primeira diluição em que se observar fluorescência intensa no controle positivo diluído e fluorescência fraca no controle positivo na diluição correspondente ao título impresso no rótulo. Além disso, deve-se observar também ausência de fluorescência no controle negativo e no PBS utilizado para o controle de conjugado (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### **3.4.2 Análise do produto terminado de IFI:**

Proceder de acordo com o controle de processo para encontrar a titulação do conjugado.

Após esta etapa, é necessário diluir as amostras do painel interno para acrescentar o conjugado de acordo com a titulação encontrada do conjugado.

Para os kits de LVC, Leishmaniose Humana e Doença de Chagas são diluídas 30 amostras com tampão fosfato (PBS). Essas amostras são diluídas em 1/40 e 1/80 e acrescentadas nas lâminas previamente sensibilizadas juntamente com os soros controles positivos e negativos diluídos em 1/40. Para os kits de HIV são diluídas 40 amostras, os controles positivos e negativos em 1/8 (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Após o período de lavagem e incubação das amostras e dos soros controles, é necessário preparar a diluição de conjugado e PBS - Azul de Evans

com a titulação previamente encontrada de acordo com a instrução de uso do kit (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### 3.4.3 Avaliação dos resultados de IFI:

Para que ocorra a liberação do controle de processo como satisfatório é necessário observar a presença de 25% a 50% de parasitas ou de 25% a 35% de células fluorescentes nas lâminas e ausência de *background* no controle negativo e PBS, podendo identificar com clareza a titulação do conjugado. O *background* pode estar presente nas primeiras titulações devido à alta concentração do conjugado, porém quando as diluições aumentarem este *background* tende a sumir, fazendo com que os controles positivos apresentem um fundo mais nítido e o controle negativo e PBS com ausência de *background* apresentando uma coloração avermelhada. Caso as características apresentadas não sejam observadas na análise, o pré-kit é dado com insatisfatório (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Para que ocorra a liberação do controle do produto terminado como aprovado, é necessário que este apresente as características descritas para liberação como satisfatório do controle de processo e a análise do painel interno apresente sensibilidade e especificidade maior ou igual a 90% (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Para os kits de HIV procede-se à leitura de cada amostra em no mínimo cinco diferentes campos, em um mesmo poço na lâmina, considerando os padrões abaixo.

| Leitura   | Interpretação        |
|---|----------------------|
| Ausência de fluorescência em todas as células que apresentam, em geral, coloração "vermelho-tijolo".  | Amostra não reagente |
| Cerca de 25 a 35% das células apresentam fluorescência na membrana e em outras partes da célula, sendo que as demais apresentam, em geral, coloração "vermelho tijolo". <i>Algumas amostras podem</i> | Amostra reagente     |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| <i>apresentar reatividade menos intensa, porém, sempre que observada a fluorescência no percentual indicado, a amostra será reagente.</i>    |                       |
| Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente. Na maioria das vezes, pode-se observar reação fluorescente em quase todas as células. | Amostra indeterminada |

*Tabela 8 : Leitura e Interpretação de uma reação de IFI para HIV-1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)*

### **3.5 Imuncromatografia de fluxo (Teste Rápido para HIV 1/2):**

O Teste Rápido para HIV 1/2 de Bio-Manguinhos emprega uma combinação única de um anticorpo específico ligado a uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de HIV 1/2 ligados a uma fase sólida (membrana). Os anticorpos presentes, caso existam, se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Neste ensaio, ocorre uma reação do tampão de corrida com o soro, plasma ou sangue total humano utilizado para o teste. O tampão de corrida propicia o fluxo lateral dos componentes liberados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos (BIO-MANGUINHOS, 2007).

No caso de uma amostra ser positiva, o complexo “imuno-conjugado” migra na membrana de nitrocelulose, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do teste (T) e produzindo uma linha roxa/rosa (resultado reagente). Na ausência de anticorpos para HIV 1/2, a linha roxa/rosa não aparece na área do teste (resultado não reagente) (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Em todos os casos, a amostra continua a migrar na membrana produzindo uma linha roxa/rosa na área de controle (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### **3.5.1 Análise tampão de corrida no controle de processo do Teste Rápido:**

O controle de processo do Teste Rápido é realizado através do teste de reatividade do tampão de corrida (sem amostras) com um lote a ser analisado (tampão teste) e um lote de tampão aprovado anteriormente (tampão controle). Teste com sorologia negativa, utilizando somente amostras de sangue negativo e teste com controles positivos para HIV 1/2 com o tampão teste e tampão controle. O teste é iniciado somente se o tampão em análise tiver sido previamente aprovado nas análises de pH e microbiológicas pelo setor responsável (BIO-MANGUINHOS, 2007).

O objetivo do teste é comparar o desempenho do tampão teste frente ao tampão controle, ambos em 5 cassetes, adicionando 3 gotas do tampão com o frasco em um ângulo de 90°. Nenhuma banda da escala deve ser observada em até 10 minutos (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Os testes com amostras de sangue total humano negativo, soros negativos e duas diluições diferentes de sangue positivo para HIV1 (1:128) e HIV2 (1:16). Essas amostras e soros são testados em cassetes diferentes usados para testar o tampão teste pingando 3 gotas do tampão com o frasco em um ângulo de 90°, a linha controle deve ser observada em até 5 minutos e a linha teste para as amostras positivas deve ser observada com uma intensidade 2 de cor de acordo com a escala de avaliação de intensidade para HIV (anexo) (BIO-MANGUINHOS, 2007).

### **3.5.2 Análise do produto terminado de Teste Rápido:**

Consiste em teste de especificidade onde são testadas amostras de sangue e soro negativos e teste de sensibilidade que são testadas diluições em série utilizando-se amostras de sangue negativo e soros controle positivos para HIV ½ (BIO-MANGUINHOS, 2007).

O teste dos cassetes em amostras positivas é realizado utilizando a diluição em série de amostra HIV1 e HIV2 pipetando 5µL de cada diluição no seu respectivo cassete e 3 gotas do tampão de corrida. São necessários 10 minutos para interpretação dos resultados (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Um resultado não reativo é indicado por uma linha roxa/rosa na área de controle (C), e nenhuma linha colorida na área de teste (T). Indica que não há anticorpos HIV-1/2 detectáveis na amostra do indivíduo, mas este resultado não exclui totalmente a infecção por HIV (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Um resultado reativo é indicado por duas linhas rosa/roxa, uma na área de teste (T) e uma na área de controle (C). A intensidade da linha na área de teste (T) varia de claro a muito escura conforme a concentração de anticorpos específicos (BIO-MANGUINHOS, 2007).

Mesmo uma linha muito clara na área de teste (T) deve ser considerada um resultado reativo. Um resultado reativo deve ser confirmado por outros métodos de diagnóstico como Western Blot, Immunoblot ou IFI conforme recomendações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 1998).

A tecnologia deste método esta sendo transferida da Chembio Diagnostic Systems Inc. Posteriormente, serão realizadas todas as etapas descritas acima juntamente com os testes de reprodutibilidade utilizando-se amostras de soros positivos baixos e amostras de sangue positivo baixo para HIV1 e HIV2, além de testes realizados com painel de amostras de soro BBI e TERAGENIX que são soros controle positivos provenientes da CHEMBIO (BIO-MANGUINHOS, 2007).

## 4 CONCLUSÃO

Bio-Manguinhos produz uma completa linha de kits de reativos e insumos para diagnóstico de AIDS, Leishmaniose, Doença de Chagas, Leptospirose e Dengue. Desta produção são ofertados cerca de três milhões de kits por ano em apoio a programas prioritários do Ministério da Saúde. Bio-Manguinhos também atua no desenvolvimento de novos kits de reativos para diagnóstico e no aperfeiçoamento dos existentes que apresentam vantagens como metodologia de simples execução, possibilidade de automação, boa sensibilidade e especificidade. Cada kit produzido no Instituto baseia-se em Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (EIE) e/ou Imunocromatografia de fluxo – Teste Rápido HIV1/2 (TR).

O controle de qualidade de reativos produzidos por Bio-Manguinhos é essencial para que o produto atenda as exigências de qualidade do Ministério da Saúde / ANVISA. Bio-Manguinhos busca crescer cada dia mais não só na descoberta de novos produtos, mas sim no aperfeiçoamento dos produtos existentes, incentivando sua equipe de profissionais a trabalhar com responsabilidade social para melhor atender aos seus clientes. O controle de qualidade trabalha com rigorosos critérios para que os reativos sejam produzidos com qualidade, utilizando métodos e equipamentos devidamente validados, registrando em documentos autorizados pela garantia da qualidade todos os procedimentos para futuras referências. O controle também deve avaliar padrões de identificação e pureza do produto.

Cada método possui características diferentes, porém necessitam de parâmetros que avaliem sua qualidade. As amostras do painel sorológico são de grande importância, pois possibilitam definir parâmetros como sensibilidade e especificidade do teste. A importância do controle de qualidade não abrange só atender as exigências do Ministério da Saúde, mas também a todos os profissionais usuários deste produto que devem ser treinados e capacitados para a utilização deste, visando à importância de um correto diagnóstico sorológico para a saúde pública.

## 5 ANEXO

### 5 Escala de Avaliação de Intensidade de HIV 1/2



## 6

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIO-MANGUINHOS, 2007. Memorial descritivo. SECQR.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 1998, Portaria 686 da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde de 27/08/1998. Determina o cumprimento das Diretrizes pelas Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro*.
- NUNES LCC, Medeiros MGF, Soares-Sobrinho JL, Alencar JRB, Rolim Neto PJ, Costa FO. Análise dos perigos na produção de comprimidos. 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2003, Resolução nº 210 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 04/08/2003. Determina o cumprimento das Diretrizes estabelecido no Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
- BIO-MANGUINHOS, 2008. Manual Sistema da Qualidade nº0008. Revisão 03.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 1998, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente transmissíveis e Aids, Controle de qualidade de testes sorológicos em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. – Brasília. Série TELELAB.
- FERREIRA, A. W. & ÁVILA, S. do L. M. de, Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003. Instrução normativa nº 13 do Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária de 03/10/2003. Aprova Regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de imunofluorescência indireta para doença de chagas, BM 004 02Bk. Ed. Setembro de 2004.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de imunofluorescência indireta para HIV. BM 010 06Bk. Ed. Abril de 2006.

- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral canina. BM 008 07Bk. Ed. Dezembro de 2004.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de imunofluorescência indireta para leishmaniose humana, BM 007 04Bk. Ed. Janeiro de 2005.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de ensaio imunoenzimático para IgM anti-dengue, BM 006 05Bk.Ed. Fevereiro de 2005.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de ensaio imunoenzimático para doença de chagas. BM 002 04Bk. Ed. Outubro de 2004.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de ensaio imunoenzimático para leishmaniose visceral canina, BM 014 06Bk. Ed. Agosto de 2006.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de ensaio imunoenzimático para IgM leptospirose. BM 017 05Bk. Ed. Abril de 2007.
- BIO-MANGUINHOS, Instrução de uso de teste rápido de triagem qualitativa para detecção de Anticorpos para HIV 1/2, BM 015 04Bk. Ed. Fevereiro de 2007.