

Revalidação do painel sorológico empregado na avaliação dos kits de diagnóstico da doença de Chagas

Revalidation of the serological panel report on the evaluation of Chagas disease diagnostic kits

RESUMO

Gabriella Pires da Silva Macedo* 

Álvaro da Silva Ribeiro 

Marisa Coelho Adati 

Helena Cristina Balthazar
Guedes Borges 

Roberto Machado Passo 

Valéria Furtado de Mendonça 

Yasmin Rosa Ribeiro 

José Roberto Niemeyer
de Castro 

Introdução: A doença de Chagas apresenta infecção aguda com alta parasitemia e crônica com queda da parasitemia e aumento de anticorpos. Segundo a RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015, os testes de diagnóstico da doença pertencem à classe de risco IV, com obrigatoriedade de registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O desempenho desses produtos é avaliado na análise laboratorial prévia ao registro, frente a painéis sorológicos compostos por amostras verdadeiro-positivas e negativas. **Objetivo:** Revalidar o painel sorológico composto de amostras verdadeiro-positivas para doença de Chagas utilizado na análise de kits de diagnóstico *in vitro* destinados à detecção de anticorpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. **Método:** Revalidação do painel sorológico de Chagas por análise retrospectiva de resultados obtidos nas metodologias: ELISA, teste imunocromatográfico, imunofluorescência, aglutinação, hemaglutinação e quimioluminescência, atendendo aos critérios de: positividade em dois testes rápidos; três imunofluorescências; um teste de aglutinação; cinco ELISA, dois testes de hemaglutinação; três de quimioluminescências e volume ≥ 10 mL. **Resultados:** Foram selecionados 45 kits com laudo satisfatório, sendo 60,0% ELISA, 16,0% imunofluorescência, 11,0% quimioluminescência, 7,0% hemaglutinação, 4,0% teste imunocromatográfico e 2,0% aglutinação. Foram avaliados 160 registros nos quais, 56,2% destinados a ELISA, 14,4% de quimioluminescência, 13,1% de imunofluorescência, 8,1% de hemaglutinação, 5,6% de testes rápidos e 2,5% de aglutinação. Foi elaborada uma planilha padronizada para inserção dos dados em Excel® e avaliação das amostras frente às metodologias. Um total de 64 amostras foi revalidado. **Conclusões:** O painel revalidado, composto por 64 amostras, foi caracterizado e seu uso garante resultados confiáveis, ampliando a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados no controle de qualidade de kits para diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas; Revalidação; Painel Sorológico; *Trypanosoma cruzi*; Diagnóstico

ABSTRACT

Introduction: Acute phase of Chagas disease is characterised by the presence of blood parasites while in the chronic phase, parasite titres decrease and antibodies increase. According to RDC nº 36, of August 26, 2015, diagnostic tests for the disease belong to risk class IV, with mandatory registration with the National Health Surveillance Agency. The performance of these products is assessed in the laboratory analysis prior to registration, against serological panels composed of true positive and negative samples. **Objective:** Revalidate the serological panel composed of true positive samples for Chagas disease used in the analysis of *in vitro* diagnostic kits for the detection of specific antibodies against *Trypanosoma cruzi*. **Method:** Revalidation of the Chagas serological panel by retrospective analysis of results obtained in the methodologies: ELISA, Rapid Test, Immunofluorescence, Agglutination, Hemagglutination and Chemiluminescence, meeting the criteria of: positivity in 02 Rapid Tests; 03 Immunofluorescences; 01 Agglutination Test; 05 ELISAS, 02 Hemagglutination Tests, 03 Chemiluminescences and volume ≥ 10 mL. **Results:** 45 kits with a satisfactory report were selected, being 60.0% ELISA, 16.0% immunofluorescence, 11.0% chemiluminescence, 7.0%

Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, Fundação
Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio
de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: gps.macedo@gmail.com

Recebido: 29 abr 2020
Aprovado: 19 out 2020



hemagglutination, 4.0% immunochromatographic test and 2.0% agglutination. 160 records were evaluated, 56.2% of which were destined for ELISA, 14.4% of chemiluminescence, 13.1% of immunofluorescence, 8.1% of hemagglutination, 5.6% of rapid tests and 2.5% of agglutination. A standardized spreadsheet was prepared to insert the data in Excel® and evaluate the samples against the methodologies. A total of 64 samples were revalidated. **Conclusions:** The revalidated Panel, composed of 64 samples, was characterized and its use guarantees reliable results, expanding the analytical capacity of the Laboratory of Blood and Blood Products in the quality control of diagnostic kits.

KEYWORDS: Chagas Disease; Revalidation; Serological Panel; *Trypanosoma cruzi*; Diagnosis

INTRODUÇÃO

Atualmente, a doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como negligenciada, sendo endêmica em populações pobres da África, Ásia e América Latina¹. Esse quadro está relacionado às condições sociais e econômicas dos países afetados pela doença, contribuindo para a disseminação de doenças negligenciadas que tem grande impacto na Saúde Pública².

A propagação do agente etiológico para o homem pode se dar através da picada do barbeiro infectado pelo *Trypanosoma cruzi*³, por transfusão sanguínea⁴ e de forma vertical⁵. São consideradas vias alternativas, a infecção por via oral⁶, o transplante de órgãos e a via acidental.

A OMS estima que exista entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo com a doença e 21 países da América Latina, concentram 5.742.167 pessoas infectadas pelo *T. cruzi*⁷.

No período de 2000 a 2013, o Ministério da Saúde notificou 1.570 casos da doença na forma aguda, principalmente na região Norte com 91,1% dos casos, seguida da região Nordeste com 4,7%. É importante destacar que o estado do Pará foi responsável por 75% de todos os casos do país⁸.

Os exames laboratoriais para o diagnóstico da doença devem levar em consideração a fase da infecção. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e os exames parasitológicos como pesquisa a fresco de tripanossomatídeos, método de concentração (Strout) e gota espessa, são preconizados. Entretanto, na fase crônica, há baixa parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG). Nesta fase, o diagnóstico sorológico é realizado através da pesquisa de anticorpos específicos para o antígeno do parasita *T. cruzi* pelos testes *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), imunocromatográfico, aglutinação, hemagglutinação, quimioluminescência e imunofluorescência indireta (IFI)⁹.

De acordo com o artigo 12 da Lei Federal nº 6.360, de 23 de setembro de 1976¹⁰, nenhum dos produtos nacionais ou importados de que trata esta Lei pode ser industrializado, exposto à venda ou entregue ao consumo sem o registro no Ministério da Saúde.

Além disso, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 36, de 26 de agosto de 2015¹¹, utilizada como referência na avaliação desses produtos, dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro, requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*. De acordo com a RDC nº 36/2015¹¹, os produtos para diagnóstico de uso *in vitro* classificados como de alto risco são passíveis de análise

prévia como parte do processo de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Essa RDC define análise prévia como “análise para verificar características do produto com finalidade de registro, alteração (quando couber) ou revalidação”.

O Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), avalia a sensibilidade e especificidade dos testes para diagnóstico de uso *in vitro* (IVD) para fins de registro junto à Anvisa. Um dos parâmetros avaliados diz respeito à sensibilidade dos produtos frente ao painel sorológico constituído de amostras verdadeiro-positivas. Dessa forma, o painel sorológico verdadeiro-positivo para doença de Chagas é uma ferramenta importante na avaliação da sensibilidade desses produtos.

Após um período de 10 anos de utilização, a revalidação do painel tornou-se necessária e a reatividade das amostras, frente as novas metodologias disponíveis no mercado nacional, foi avaliada. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi revalidar o painel sorológico composto de amostras verdadeiro-positivas para doença de Chagas utilizado na análise de kits de diagnóstico *in vitro* destinados à detecção de anticorpos específicos contra *T. cruzi*, atualmente utilizados em laboratórios de análises clínicas e serviços de hemoterapia.

MÉTODO

O painel sorológico positivo para doença de Chagas do LSH, constituído por 76 amostras de plasma caracterizadas como verdadeiro-positivas, foi revalidado utilizando-se como critério a reatividade nas diferentes metodologias aplicáveis ao diagnóstico *in vitro* da doença de Chagas. Os kits que obtiveram laudo de análise (LA) satisfatório, avaliados no INCQS no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015, foram selecionados e utilizados como parâmetro para avaliar a reatividade e o comportamento das amostras que compõem o painel. Foram identificados os protocolos analíticos com o registro dos resultados das amostras nas diferentes metodologias e elaborada uma planilha em Excel®. Os resultados correspondentes a metodologia de ELISA e quimioluminescência foram registrados na forma de rácio, que corresponde a razão entre a densidade óptica (DO) e o valor do *cut-off* (CO). Para os testes de aglutinação, hemagglutinação e IFI foi observada a intensidade da resposta de cada amostra que é dada por cruces “+”, variando de 1+ a 4+, sendo 4+ a resposta máxima da intensidade. Os resultados das amostras frente aos testes rápidos foram descritos como reagentes (R) e não reagentes (NR).



Baseados na metodologia aplicada na validação do painel, realizada no ano de 2008 no LSH¹², que incluiu a positividade em três testes ELISA, em um ensaio de hemaglutinação, em um de aglutinação, em um de IFI e em um *Western Blot*, foram estabelecidos os seguintes critérios para revalidação das amostras: reatividade em pelo menos cinco ELISA com rácio acima de 1,5; reatividade em dois testes rápidos; reatividade em pelo menos três testes de quimioluminescência; positividade em pelo menos três testes de IFI, em um teste de aglutinação, e em dois testes de hemaglutinação. Além da reatividade nos testes de escolha, as amostras deveriam possuir volume superior ou igual a 10 ml, pois a perda de volume é uma característica comum às amostras do painel com o passar dos anos pela grande demanda do laboratório, principalmente em análises automatizadas, onde volumes maiores são necessários para realização dos testes. Além disso, as amostras recebidas passam por um processo de filtração para redução de fibrina, o que resulta na diminuição do volume total e necessidade constante de renovação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015, foram recebidos para análise no LSH do INCQS 54 kits para o diagnóstico *in vitro* da doença de Chagas, assim distribuídos: nove kits (16,7%) no ano de 2010, 15 (27,8%) em 2011, oito (14,8%) em 2012, um (1,8%) em 2013, 11 (20,4%) em 2014 e dez (18,5%) em 2015. O número de kits recebidos anualmente está relacionado à demanda do registro de produtos na Anvisa que, no ano de 2013, foi inferior aos demais avaliados. Do total de 54 produtos analisados, 45 (83,0%) receberam laudo satisfatório e nove (17,0%), insatisfatórios. Dessa forma, o número amostral de kits utilizados na revalidação das amostras foi de 45 produtos, distribuídos nas seguintes metodologias: 27 (60,0%) ELISA, três (7,0%) teste de hemaglutinação, cinco (11,0%) de quimioluminescência, sete (16,0%) de IFI, dois (4,0%) testes imunocromatográficos e apenas um (2,0%) teste de aglutinação (Figura).

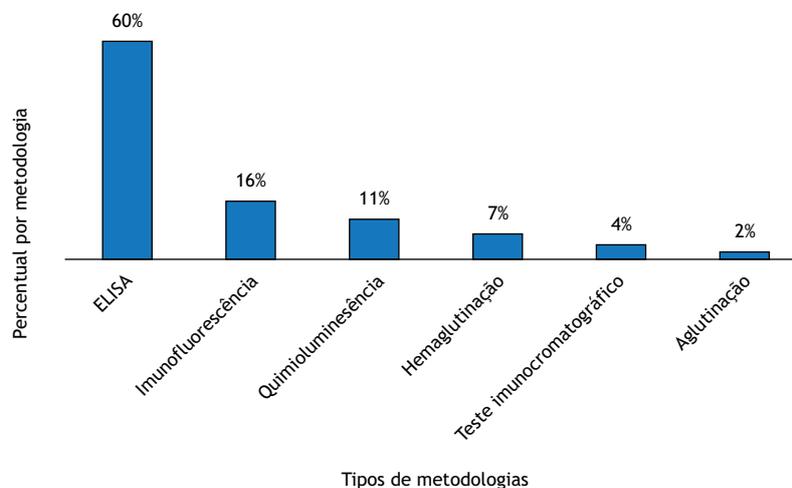
O teste ELISA foi o método sorológico de maior demanda para análise (60,0%). Segundo Fitarelli¹³, desde o ano 2000, ELISA foi a metodologia de escolha para a determinação da doença de Chagas no mercado de diagnóstico e esse quadro se manteve constante desde então^{13,14}.

Através da seleção dos 45 kits satisfatórios, foram identificados 160 protocolos de análise, nos quais 90 (56,25%) destinados à ELISA, 23 (14,4%), à quimioluminescência, 21 (13,1%), à IFI, 13 (8,1%) à hemaglutinação, nove (5,6%) aos testes rápidos e quatro (2,5%) à aglutinação.

Após análise retrospectiva dos dados e confecção de planilha em Excel®, foi realizada a avaliação da reatividade das amostras frente às diferentes metodologias para o diagnóstico da doença de Chagas. De acordo com os critérios de revalidação estabelecidos, 100,0% das amostras foram reagentes em pelo menos cinco testes ELISA, apresentando valores de rácio superiores a 1,5, assim como nos três testes de IFI utilizados. Quanto às demais metodologias, a reatividade do painel correspondeu a 92,1% no teste imunocromatográfico, a 97,4% no teste de aglutinação, a 93,4% para hemaglutinação e a 98,7% para quimioluminescência.

Um total de 12 (15,8%) amostras apresentou resultados não reagentes em uma ou mais metodologias. Quatro foram não reagentes nos testes rápidos, cinco amostras foram negativas no teste de hemaglutinação, uma amostra no teste de aglutinação, uma amostra não atendeu simultaneamente ao teste imunocromatográfico e de aglutinação e outra amostra teve resultado não reagente tanto para teste imunocromatográfico quanto para o de quimioluminescência (Tabela).

As 12 amostras que apresentaram resultados discordantes nos testes rápidos, hemaglutinação, aglutinação e quimioluminescência não foram revalidadas, passando a fazer parte de um novo painel sorológico indeterminado.



Fonte: LSH, 2018.

Figura. Distribuição das metodologias utilizadas na revalidação das amostras do painel positivo da doença de Chagas.



Tabela. Quantitativo de amostras que não atenderam aos critérios de revalidação frente aos testes estabelecidos.

Testes	Não revalidadas (%)
Teste imunocromatográfico	4 (5,3%)
Teste imunocromatográfico e aglutinação	1 (1,3%)
Teste imunocromatográfico e quimioluminescência	1 (1,3%)
Hemaglutinação	5 (6,6%)
Aglutinação	1 (1,3%)

Fonte: LSH, 2018.

As seis amostras reprovadas no teste imunocromatográfico representaram 43,0% dos resultados discordantes, enquanto cinco amostras com resultados negativos na hemaglutinação foram responsáveis por 36,0%. O critério de revalidação para a aglutinação representou 14,0% dos resultados discordantes. Na metodologia de quimioluminescência, foram observados 7,0% de resultados discordantes, referentes a uma amostra com resultado negativo.

A perda da reatividade das 12 amostras quando comparadas aos resultados da validação do painel¹² pode estar relacionada à queda do título de anticorpos, ao tempo de uso e ao limite de detecção do *kit*. Além disso, algumas amostras possuem níveis diferentes de reatividade.

O processo de congelamento e de descongelamento do painel não interfere na redução do título de anticorpo. A Universidade de São Paulo (USP) realizou uma avaliação da estabilidade de amostras positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que foram submetidas a ensaios de ELISA, *Western Blot* e IFI. Nesse estudo foram realizados 11 ciclos de congelamento e descongelamento nos quais não foi verificado efeito da reatividade

dos anticorpos específicos¹⁵. Tal fato também foi comprovado no presente estudo, pois as amostras foram descongeladas pelo menos 45 vezes durante o processo de revalidação.

O último critério estabelecido para a revalidação está relacionado com o volume das amostras, que deveriam ter no mínimo 10 mL, de acordo com o protocolo de atividade do laboratório, a fim de garantir volume suficiente para as próximas demandas do LSH. Apenas uma amostra não atendeu a esse critério, apresentando 9 mL. No entanto, ela já havia sido excluída pelos critérios relacionados à positividade das metodologias analisadas.

Após o processo de revalidação, o painel passou a ser composto por 64 (84,0%) amostras devidamente revalidadas. Um total de 16,0% das amostras (12/76) que não cumpriu os critérios de revalidação passou a constituir um painel de amostras indeterminadas, que serão analisadas frente outros marcadores.

CONCLUSÕES

Após a análise das 76 amostras, que constituíam o painel sorológico da doença de Chagas, frente aos 45 *kits* com laudo de análise satisfatório, de seis metodologias diferentes, foi possível revalidar o painel que passou a ser composto por 64 amostras verdadeiro-positivas.

O painel revalidado destina-se à realização da análise prévia para fins de registro, etapa obrigatória para comercialização dos *kits* para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas no país. É uma ferramenta utilizada na análise de produtos para garantir resultados confiáveis e ampliar a capacidade analítica do LSH.

Cabe ressaltar que os *kits* que obtiveram resultados insatisfatórios não foram utilizados nesse processo de revalidação retrospectiva, garantindo a confiabilidade dos resultados do painel.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Research priorities for chagas disease, human african trypanosomiasis and leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012.
2. Chagas CRJ. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Bra Med*. 1913;27(23):225.
3. Silva LHP. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1959;1(2):99-118.
4. Wendell S. Doença de chagas transfusional: clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1997.
5. Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1992;34(5):403-8. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651992000500006>
6. Ramos FLP. Boletim epidemiológico do IEC. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz; 2015[acesso 21 jan 2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#situacao>
7. World Health Organization - WHO. Chagas disease (american trypanosomiasis). Geneva: World Health Organization; 2018[acesso 21 jan 2019]. Disponível em: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
8. Ministério da Saúde (BR). Doença de chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol*. 2015;46(21):1-9.
9. Mello MB. Padronização do *kit* de Elisa recombinante para o diagnóstico da doença de chagas visando sua utilização nos serviços de hemoterapia [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
10. BRASIL. Lei Nº 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. *Diário Oficial União*. 24 set 1976.



11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 ago 2015.
12. Passo RM. Confecção de painel para controle da qualidade de conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* empregados no diagnóstico sorológico da doença de chagas [monografia]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
13. Fitarelli DB, Horn JF. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre, RS. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(5):310-4. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000066>
14. Watson H. Teste Elisa e sua aplicação. Web Artigos. 12 nov 2013[acesso 24 jan 2019]. Disponível em: <https://www.webartigos.com/artigos/teste-elisa-e-sua-aplicacao/115312>
15. Castejón MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Olivieri JC, Oliveira CAF, Ueda M. Avaliação dos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento na estabilidade dos soros para a detecção de anticorpos anti-HIV. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012;71(3):573-81.

Contribuição dos Autores

Macedo GPS, Ribeiro YR - Aquisição, análise e interpretação dos dados e revisão do trabalho. Adati MC - Concepção e planejamento (desenho do estudo). Borges HCBG, Ribeiro AS, Passo RM, Mendonça VF, Castro JRN - Redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.