

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR (PPGGEv)

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

JÉSSICA CALDEIRA DE LIMA

**Validação de *kit* imunocromatográfico rápido para diagnóstico da
Hepatite C**

São Carlos
2019

JÉSSICA CALDEIRA DE LIMA

**Validação de *kit* imunocromatográfico rápido para diagnóstico da
Hepatite C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

São Carlos
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Caldeira de Lima, realizada em 17/03/2019:

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Karachi
IFSC/USP

Aos meus pais, Luiz e Sueli, que sempre acreditaram em meus sonhos e não mediram esforços para que eu pudesse alcançá-los.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os Orixás que estiveram sempre ao meu lado, me guiando e me reerguendo em cada momento de fraqueza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, por ter me acolhido, ainda que essa fosse uma orientação fora do habitual, sem o qual a realização desse mestrado não seria possível.

À Angélica, gestora e amiga, com a qual tive a oportunidade de trabalhar e aprender durante quase cinco anos, cuja ajuda foi essencial para o desenvolvimento desse estudo.

Aos meus pais, Luiz e Sueli, e aos meus irmãos, César e Janaína, que sempre me mostraram que no coração da família encontraremos forças para lutarmos pelos nossos sonhos e que o conhecimento e a educação são as armas mais poderosas que podemos ter para lutar contra as injustiças.

Ao meu companheiro, Cassiano, que com sua calma e mansidão interrompeu meu choro, meu desespero e me mostrou que a vida pode ser mais leve e, mostrando-me que sou capaz, não me deixou desistir.

Ao presidente da WAMA, Dr. Wagner Maricondi, ao diretor administrativo, Felipe Maricondi e ao gestor comercial, João Carlos Montagnini Jr., que acreditaram em meu trabalho e me deram oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Ao time de Pesquisa e Desenvolvimento da WAMA, Lygia, Gabriel e Ana Luísa, e demais amigos que na empresa encontrei, Diana, Camila, Ana Letícia, Josiane, Leise e todos os agregados, meu obrigado por todas as vezes que ouviram minhas lamentações, me apoiaram e me alegraram com piadas, cafés especiais ou cervejas e por me socorreram quando nada mais estava dando certo, mesmo que isso nos custassem horas e horas no laboratório.

Aos colaboradores e pacientes dos laboratórios de análises clínicas parceiros, cuja ajuda permitiu que esse projeto se concretizasse.

Aos Professores Fernanda Anibal e Ricardo Borra, pelas contribuições durante o Exame de Qualificação, auxiliando o amadurecimento deste trabalho.

Aos professores que estiveram presente durante essa jornada, promovendo a troca de conhecimento e experiências, sempre de forma respeitosa e inspiradora.

À Secretaria de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, à Universidade Federal de São Carlos e a todos seus funcionários de que alguma maneira, seja ela direta ou indireta, contribuíram para que chegasse até aqui.

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas. Pessoas
transformam o mundo.”*

Paulo Freire

RESUMO

A Hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da Hepatite C (HCV, do inglês *Hepatitis C Virus*) e geralmente assintomática na fase aguda. Globalmente, estima-se que 71 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV e aproximadamente 400 mil mortes ocorram anualmente devido a complicações decorrentes da doença, como cirrose e câncer de fígado. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um *kit* imunocromatográfico rápido para a detecção de anticorpos anti-HCV, o *kit* Imuno-Rápido HCV, através da comparação de desempenho deste produto com um segundo *kit* de mesma metodologia disponível no mercado (*Comercial A*) e metodologia ELISA (Murex anti-HCV 4.0, DiaSorin) considerada padrão ouro. Dentre os testes realizados para a validação do *kit* estão análise de repetibilidade e reprodutibilidade de resultados, análise de estabilidade em tempo real e estabilidade acelerada, medições dos valores de sensibilidade e especificidade clínicas e valores preditivos positivos e negativos. Foram incluídas neste estudo, 383 amostras caracterizadas por metodologia ELISA e, a partir da comparação dos resultados, foram medidos os parâmetros sensibilidade e especificidade clínicas, valores preditivos positivo e negativo para os *kits* imunocromatográficos Imuno-Rápido HCV e *Comercial A*. Para ambos os *kits* imunocromatográficos rápidos, encontrou-se o valor de sensibilidade e valor preditivo negativo de 100%. Os valores de especificidade clínica foram de 99,7% para o Imuno-Rápido HCV e 100% para o *kit Comercial A* e os valores preditivos positivos para esses *kits* foram 98,6% e 100%, respectivamente. As análises de repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram resultados concordantes em 100% das execuções e as avaliações de estabilidade em tempo real e acelerada demonstraram a capacidade do *kit* manter seu bom funcionamento ao longo do tempo mesmo sob estresse de temperatura, sugerindo sua capacidade de manter-se estável por pelo menos 18 meses. Esses resultados corroboram com a hipótese de que o *kit* Imuno-Rápido HCV possui desempenho similar a *kits* disponíveis no mercado que utilizam a mesma metodologia e é capaz de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HCV de forma segura e rápida, combinada a uma fácil execução e baixo custo.

Palavras-chave: Hepatite C; diagnóstico; *Imunocromatografia*; point of care; validação.

ABSTRACT

Hepatitis C is an infectious disease caused by the Hepatitis C Virus (HCV) and usually asymptomatic in the acute phase. Globally, an estimated 71 million people are infected with HCV and approximately 400,000 deaths happen annually due to complications from the disease, such as cirrhosis and liver cancer. This study aimed to develop and validate a rapid immunochromatographic test for the detection of anti-HCV antibodies, the Imuno-Rápido HCV, by comparing the performance of this product with a second commercially available test (*Commercial A*) with the same methodology and ELISA methodology (Murex anti-HCV 4.0, DiaSorin) considered gold standard. Tests for validation include repeatability and reproducibility analysis, real-time and accelerated stability analysis, clinical sensitivity and specificity measurements, and positive and negative predictive values. In this study, 383 samples characterized by ELISA methodology were included and, by comparing the results, the clinical sensitivity and specificity parameters, positive and negative predictive values for the immunochromatographic tests Imuno-Rápido HCV and *Commercial A* were measured. For both immunochromatographic tests, a value of 100% were found for clinical sensitivity and negative predictive value. Clinical specificity values were 99.7% for Imuno-Rápido HCV and 100% for *Commercial A* test and positive predictive values for these kits were 98.6% and 100%, respectively. Repeatability and reproducibility analyzes showed concordant results in 100% of the tests, and real-time and accelerated stability assessments demonstrated the ability of the kit to maintain its proper functioning over time even under temperature stress, suggesting its ability to maintain stable for at least 18 months. These results corroborate the hypothesis that the Imuno-Rápido HCV has performance similar to commercially available kits that use the same methodology and is able to assist in the diagnosis of HCV infection safely and quickly, combined with easy execution and low cost.

Keywords: Hepatitis C; diagnosis; Immunochromatography; point of care; validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático de um teste rápido	13
Figura 2: Interpretação de resultados no teste imunocromatográfico de fluxo lateral do formato sanduíche.	15
Figura 3: Estrutura da placa montada mostrando a sobreposição das diversas membranas.....	24
Figura 4: Dispersão das soluções de banda teste e banda controle durante aplicação nas membranas de nitroceluloses NC-A e NC-B.....	31
Figura 5: Padrão de corrida das amostras nas membranas de nitrocelulose NC-A versus NC-B com o mesmo tempo de teste.....	32
Figura 6: Padrão de formação de BC e BT nas membranas de nitrocelulose NC-A versus NC-B com o mesmo tempo de teste e mesmas amostras.	32
Figura 7: Comparação de três concentrações de BT.	33
Figura 8: Análise de membrana para base de amostra.	34
Figura 9: Análise de cassete plástico.....	35
Figura 10: Resultado do teste de estabilidade acelerada utilizando três amostras do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) com diferentes reatividades para anticorpos anti-HCV (sendo AHCV0672 reagente, AHCV0272 fracamente reagente e AHCV0150	43
Figura 11: Resultado do teste de estabilidade em tempo real (parcial) utilizando três amostras do PNCQ com diferentes reatividades para anticorpos anti-HCV (sendo AHCV0672 reagente, AHCV0272 fracamente reagente e AHCV0150 não reagente).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos para as amostras de soro e controles testados com o padrão ouro (ELISA).	37
Tabela 2 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do kit Imuno-Rápido HCV para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro utilizando-se a técnica de ELISA como referência.	37
Tabela 3 – Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Imuno-Rápido HCV utilizando amostras de soro.	38
Tabela 4 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do kit Imuno-Rápido HCV para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de sangue total utilizando-se a técnica de ELISA como referência.	38
Tabela 5 – Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Imuno-Rápido HCV com amostras de sangue total.	39
Tabela 6 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do kit Comercial A para detecção de anticorpos anti-HCV utilizando-se a técnica de ELISA como referência.	39
Tabela 7 - Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Comercial A.	40
Tabela 8 – Comparativo de desempenho apresentado pelos <i>kits</i> Imuno-Rápido HCV e <i>Comercial A</i>	40
Tabela 9: Valores de índice <i>kappa</i> e suas interpretações.	41
Tabela 10 - Resultado do teste de repetibilidade do kit Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica).	41
Tabela 11 – Resultado do teste de reprodutibilidade do kit Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica).	42
Tabela 12 – Resultado do estudo de estabilidade acelerada.	43
Tabela 13 – Resultado do estudo de estabilidade em tempo real (parcial).	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ELISA: *Enzyme linked immunossorbent assay*

HCV: *Hepatitis C Virus*

IC: Intervalo de confiança

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

k: Coeficiente *kappa*

LFA: *Lateral Flow Assay*

NR: Não reagente

OMS: Organização Mundial da Saúde

PNCQ: Programa Nacional de Controle de Qualidade

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

R: Reagente

R_{fraco}: Fracamente reagente

TRD: Teste Rápido Diagnóstico

VPN: Valor preditivo negativo

VPP: Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
1.1.	A Hepatite C	9
1.2.	O Vírus da Hepatite C.....	11
1.3.	Testes Rápidos	12
1.4.	Construção de um LFA.....	16
1.4.1.	Reagentes de Captura	16
1.4.2.	Reagentes Detectores.....	17
1.4.3.	Membrana	17
1.4.4.	Base de Amostra	18
1.4.5.	Base de Conjugado	18
1.4.6.	Base Absorvente	18
1.4.7.	Cassete Plástico	18
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	Objetivo geral	20
2.2.	Objetivos específicos	20
3.	METODOLOGIA.....	21
3.1.	Padronização do Protótipo	21
3.1.1.	Banda Teste, Banda Controle e Membrana de Nitrocelulose.....	21
3.1.2.	Determinação do Volume de Amostra e Tempo de Leitura	22
3.1.3.	Bloqueio da Base do Conjugado.....	22
3.1.4.	Conjugado de Ouro Coloidal.....	22
3.1.5.	Seleção da Concentração do Conjugado.....	23
3.1.6.	Base de Amostra	23
3.1.7.	Cassete Plástico	23
3.1.8.	Montagem da Folha Teste e Obtenção das Tiras Individuais.....	24
3.1.9.	Avaliação de Desempenho do Protótipo.....	24
3.2.	Validação do Protótipo	25
3.2.1.	Aspectos Éticos:.....	25
3.2.2.	Amostras.....	25
3.2.3.	Realização dos testes com o kit desenvolvido na empresa WAMA Diagnóstica (Kit Imuno-Rápido HCV).....	25

3.2.4. Realização dos testes com o kit comercial disponível no mercado (Comercial A).....	26
3.2.5. Realização dos Testes com a Técnica ELISA	26
3.2.6. Análise Estatística Diagnóstica.....	27
3.2.7. Análise de Repetibilidade:.....	28
3.2.8. Análise de Reprodutibilidade:	28
3.2.9. Análise de Estabilidade em Tempo Real e Acelerada.....	29
3.2.9.1. Estabilidade Acelerada	29
3.2.9.2. Estabilidade em Tempo Real (parcial).....	29
3.2.10. Análise de Interferentes	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Padronização dos Protótipos.....	31
4.1.1. Seleção das Bandas Teste e Controle e Membrana de Nitrocelulose	31
4.1.2. Seleção do Conjugado	33
4.1.3. Seleção de Base de Amostra.....	34
4.1.4. Seleção de Cassete Plástico	34
4.1.5. Ajuste do Protótipo.....	35
4.2. Validação do Protótipo	36
4.2.1. Teste ELISA	37
4.2.2. Análise de sensibilidade clínica e especificidade clínica do kit Imuno-Rápido HCV .	37
4.2.3. Análise de sensibilidade clínica e especificidade clínica do kit Comercial A.....	39
4.2.4. Comparação entre o kit Imuno-Rápido HCV e o kit Comercial A.....	40
4.2.5. Análise de Repetibilidade	41
4.2.6. Análise de Reprodutibilidade	42
4.2.7. Análise de Estabilidade.....	43
4.2.7.1. Análise de Estabilidade Acelerada	43
4.2.7.2. Análise de Estabilidade em Tempo Real (Parcial).....	44
4.2.8. Análise de Interferentes	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	52
8. APÊNDICE.....	59
9. ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Hepatites Virais e a Hepatite C

A Hepatite é a inflamação do fígado, chamada hepatite viral quando ocasionada por um vírus. Atualmente, são descritos cinco tipos de vírus da Hepatite (A, B, C, D e E) com diferentes formas de transmissão e impactos na saúde, sendo as Hepatites A, B e C as mais comuns no Brasil. Estima-se que cerca de 1,4 milhão de mortes ocorram anualmente no mundo em decorrência de infecções agudas, câncer de fígado e cirrose relacionadas as hepatites virais. As infecções pelos vírus das Hepatites A e E são geralmente adquiridas através do consumo de alimentos e água contaminados. A prevenção é feita através de melhorias nas condições de saneamento, segurança alimentar e vacinação. De outro modo, os vírus das Hepatites B, C e D são transmitidos principalmente através de sangue contaminado. A Hepatite D ocorre apenas em pessoas que já estão infectadas com o vírus da Hepatite B e, portanto, pode ser evitado através da vacinação do vírus da Hepatite B e outros esforços de prevenção (WHO, 2016; BRASIL, 2018).

O vírus da Hepatite C (VHC ou do inglês *Hepatitis C Virus*, HCV) é o agente causador da doença infecciosa Hepatite C, anteriormente chamada Hepatite não-A não-B, correspondendo a grande parte das hepatites pós-transfusionais que não podiam ser identificadas pelos testes sorológicos de Hepatite A e B já existentes (ALTER et al., 1975). Somente cerca de uma década após os primeiros relatos da Hepatite não-A não-B, Choo e colaboradores (1989) identificaram o agente etiológico Vírus C como o agente infeccioso da Hepatite C (BRASIL, 2008).

Atualmente, a Hepatite C é considerada um importante e crescente problema de saúde a nível mundial (*The Global Burden of Hepatitis*, 2004; BRASIL, 2015) e encontra-se disseminada por todos os continentes com diferentes graus de prevalência (SILVA et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 3% da população mundial esteja infectada pelo vírus da Hepatite C (STRAUSS, 2001; MOHD et al., 2013; WHO, 2016b), sendo que um número considerável dessas pessoas desconhece o fato de possuir o vírus (STRAUSS, 2001) ou que a descoberta da doença ocorra tardiamente, fazendo com que aproximadamente 400 mil pessoas morram por ano devido a complicações de saúde relacionadas à infecção pelo HCV, como cirrose, carcinoma hepatocelular e falência do fígado (WHO, 2016).

Pelo fato do Brasil ser um país de proporções continentais, com grandes variações demográficas, sociais e culturais entre as suas diferentes regiões, muitos dos estudos com a

finalidade de determinar a prevalência do HCV no país limitam-se a populações específicas ou áreas geográficas restritas como, por exemplo, populações privadas de liberdade ou doadores de sangue de determinada região geográfica, fazendo com que os estudos de prevalência apresentem dados ainda pouco precisos (FERREIRA e SILVEIRA, 2004). Entretanto, dados divulgados por Strauss (2001), Ferreira e Silveira (2004) e estudos realizados pela Sociedade Brasileira de Hepatologia (1999) apontam que a prevalência nacional do HCV esteja situada entre 1 e 3% da população brasileira.

A transmissão do vírus da Hepatite C ocorre majoritariamente por via parenteral, principalmente através de exposições percutâneas ao sangue contaminado. (CONTE, 2000a; BRASIL, 2008; SILVA et al., 2012). São considerados indivíduos de risco usuários de drogas injetáveis, pessoas que receberam transfusões sanguíneas ou hemoderivados anteriormente ao ano de 1994, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), pacientes transplantados, em hemodiálise ou hemofílicos e pessoas em privação de liberdade (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; BRASIL, 2008; MARTINS, NARCISO-SCHIAVON e SCHIAVON, 2011).

Outras formas de transmissão são conhecidas, porém com menor incidência, sendo consideradas vias raras, como é o caso da transmissão vertical mãe-filho, transmissão através relação sexual, por meio de procedimentos invasivos (por exemplo, tratamentos odontológicos), confecção de tatuagens e piercings e o uso compartilhado de objetos pessoais como lâminas de barbear, escovas de dente e ferramentas de manicure, como alicates de unhas (CONTE, 2000a; BRASIL, 2008; SILVA et al., 2012).

O período de incubação do Vírus da Hepatite C pode variar de 15 dias a 6 meses e a infecção pelo HCV é dividida em fase aguda e crônica (STRAUSS, 2001; MELÃO et al., 2009; WHO, 2017). Tanto a hepatite aguda quanto a crônica são geralmente assintomáticas, caracterizando uma infecção silenciosa (FERREIRA e SILVEIRA, 2004). Quando presentes, os principais sintomas são febre, fadiga, perda de apetite, urina com coloração escura e icterícia (BRASIL, 2015; WHO, 2017).

Caracteriza-se como fase aguda os primeiros seis meses da infecção, nos quais é rara a apresentação de sintomas da doença e o risco de morte relacionado à presença do vírus é baixo. Além disso, entre 15 e 45% das pessoas infectadas apresentam cura espontânea sem administração de um tratamento (CONTE, 2000b; WHO, 2016). Quando a infecção persiste além dos primeiros seis meses, ocorre a chamada fase crônica, que atinge entre 55 e 85% das pessoas infectadas, e sua confirmação se dá através do resultado anti-HCV positivo e a

persistência de RNA do HCV por mais de seis meses (FERREIRA e SILVEIRA, 2004). Estima-se que 71 milhões de pessoas infectadas pelo HCV no mundo encontram-se na fase crônica da doença (BRASIL, 2008; WHO, 2017). Nesta fase, o risco da infecção evoluir para um quadro de cirrose hepática dentro de 20 anos é de 15 a 30% caso não ocorra intervenção terapêutica e, dentre a população com cirrose, 1 a 5% das pessoas desenvolvem hepatocarcinoma (CONTE, 2000b; BRASIL, 2010; WHO, 2016). A infecção pelo HCV já é a maior responsável por cirrose e transplante hepático no Mundo Ocidental. (BRASIL, 2008).

1.2. O Vírus da Hepatite C

O HCV é um vírus de fita simples de RNA, envelopado, com diâmetro de cerca de 50 nm pertencente à família *Flaviviridae*, a qual também pertencem os vírus da Febre Amarela e da Dengue (STRAUSS, 2001; CHEVALIEZ e PAWLOTSKY, 2006; BOSTAN e MAHMOOD, 2010). Entre as proteínas expressas pelo HCV, destacam-se as proteínas estruturais E1 e E2 (glicoproteínas do envelope) e Core (formação de capsídeo) e as proteínas não estruturais NS (1 a 5), responsáveis pela replicação viral (STRAUSS, 2001; CHEVALIEZ e PAWLOTSKY, 2006; NOUROZ et al., 2015).

São conhecidos ao menos seis genótipos do HCV, divididos em diversos subgrupos. A prevalência de cada genótipo varia de acordo com a região geográfica, sendo os genótipos 1, 2 e 3 globalmente distribuídos (BOSTAN e MAHMOOD, 2010). No Brasil, os genótipos mais encontrados são 1, 3 e 2, em ordem de prevalência (CAMPIOTTO et al., 2005; SILVA et al., 2006). Nos EUA e norte europeu, o genótipo 1 subtipo b é o de maior prevalência, enquanto que no Japão e na China, destaca-se o genótipo 2, subtipos a e b (NOUROZ et al., 2015). O genótipo 4 é mais prevalente no Egito e Oriente Médio, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 é mais comumente encontrado no Sudeste Asiático (LOPES et al, 2009).

Os tipos de genótipo do HCV influenciam na evolução da doença, em variações nas manifestações clínicas e também na resposta ao tratamento ao qual o paciente é submetido, sendo o genótipo 1 relacionado à ocorrência de infecções crônicas, maior resistência do vírus ao tratamento e também a danos hepáticos de maior intensidade quando comparado aos demais genótipos (BARBOSA, SILVA e MARTINS, 2005; TOMEI et al., 2005).

Até os dias atuais, não foi possível o desenvolvimento de uma vacina contra a infecção pelo HCV, por causa disso e da alta prevalência do vírus, é extremamente importante que seja realizado um rastreamento dos casos de Hepatite C como forma de controle da doença (KHUROO, KHUROO e KHUROO, 2015).

A partir da descoberta do HCV e do início da produção de antígenos e peptídeos sintéticos, tornou-se possível o desenvolvimento de testes diagnósticos para a detecção de anticorpos anti-HCV (BRANDÃO et al., 2001). Devido ao fato do HCV circular em baixa concentração no sangue, a detecção de anticorpos específicos contra esse vírus é a maneira mais frequentemente empregada para identificação da infecção (BRANDÃO et al., 2001; KHUROO, KHUROO e KHUROO, 2015). Um resultado de teste sorológico reagente para anticorpos anti-HCV pode indicar tanto uma infecção presente quanto passada. Para fazer a diferenciação, são necessários testes de rastreamento com alta sensibilidade, como imunoenaios enzimáticos (EIA), seguidos de testes confirmatórios, como os testes de ácido nucleico para RNA do HCV, que apresentam maior especificidade (BRANDÃO et al., 2001; KHUROO, KHUROO e KHUROO, 2015). Entretanto, a realização de testes como EIA e de pesquisa de RNA viral exigem equipamentos sofisticados, treinamento técnico de operadores e estruturas laboratoriais de alto custo, fazendo com que em regiões com recursos limitados, essas técnicas sejam impraticáveis (JOHN e PRICE, 2013; KHUROO, KHUROO e KHUROO, 2015).

Uma alternativa a estes testes dispendiosos e trabalhosos são os testes de *point of care* (POC), como os testes rápidos (TR) que utilizam amostras de soro, plasma, sangue total e fluido oral para pesquisa de anticorpos anti-HCV (O'FARRELL, 2013; KHUROO, KHUROO e KHUROO, 2015).

1.3. Testes Rápidos

Os primeiros registros de desenvolvimento de testes imunocromatográficos rápidos, também chamados de ensaio de fluxo lateral (do inglês, *Lateral Flow Assay*, LFA), datam por volta de 1950 e tem sua origem na convergência de várias técnicas, como o ensaio de aglutinação de látex, ELISA (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e radioimunoensaio (O'FARRELL, 2009; SHARMA et al., 2015).

Os testes rápidos para diagnóstico têm como vantagens seu baixo custo de fabricação, são portáteis podendo ser utilizados em locais de difícil acesso e sem infraestrutura laboratorial, são de fácil execução, possuem poucos passos e, contrariamente aos testes padrões, apresentam resultado em até 30 minutos, o que evita que muitos pacientes não retornem para receber o diagnóstico e tratamento. Essas vantagens colaboram para que o interesse em desenvolvimento e comercialização destes testes seja bastante elevado atualmente (BRANSON, 2003).

Os LFAs são um formato de teste rápido amplamente utilizado, possibilitando o diagnóstico de infecção ou contaminação por certos patógenos, medicamentos, drogas de

abuso, metabólitos e hormônios, por exemplo. Além dos diagnósticos clínicos, os LFAs são aplicados na veterinária, agricultura, indústria de alimentos, segurança e qualidade ambiental, ensaios industriais e diagnóstico molecular. Esses testes se baseiam no método imunocromatográfico, no qual uma reação de reagentes secos, aplicados sobre um material carreador, é ativada através da adição de amostra fluida (O'FARRELL, 2009; POSTHUMATRUMPIE, KORF e VAN AMERONGEN, 2009).

O funcionamento destes testes rápidos baseia-se em um princípio bastante simples, onde uma amostra líquida (ou extrato) é aplicada sobre um conjunto de membranas sobrepostas e se move por elas através de capilaridade. À estas membranas, são adicionadas moléculas que podem interagir com o analito de interesse presente na amostra a ser analisada, resultando em um acúmulo de reagentes em determinadas regiões da membrana, que provocarão o surgimento de um sinal visível, apresentando o resultado do teste (KOCZULA e GALLOTTA, 2016).

Comumente, uma tira teste do tipo LFAs (Figura 1) é composta por uma série de membranas sobrepostas, nas quais os reagentes são impregnados e secos, e fixadas sobre um cartão plástico de apoio que proporciona estabilidade e facilidade no manuseio. Um adesivo ou cassete plástico pode ser utilizado para que seja exercida a pressão necessária sobre estas membranas e seus reagentes para que o funcionamento do teste ocorra corretamente. O desempenho do teste e seu correto funcionamento serão determinados através da interação entre os diversos componentes que formam a tira de teste (O'FARRELL, 2009; SHARMA et al., 2015; KOCZULA e GALLOTTA, 2016).

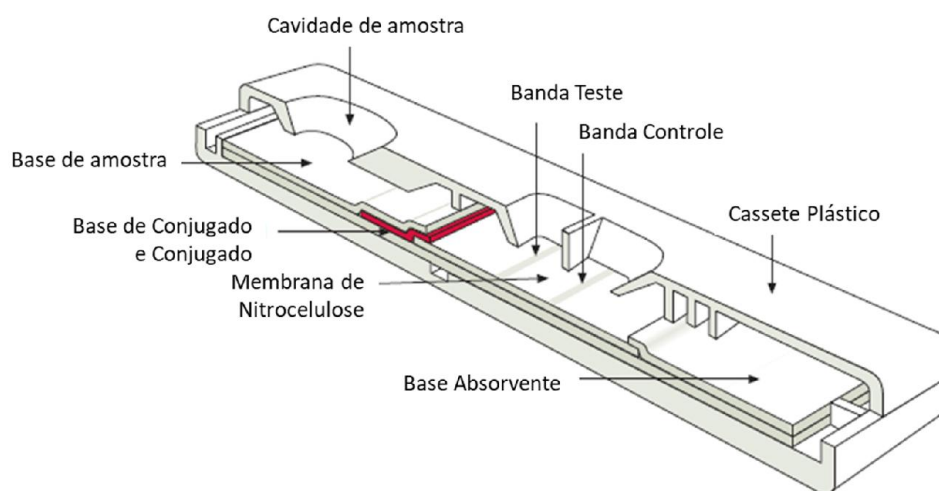


Figura 1: Desenho esquemático de um teste rápido

Fonte: Adaptado de MILLIPORE (2015).

Para dar início ao teste, o volume de amostra requerido é adicionado próximo a extremidade inferior da tira, sobre a primeira membrana da sobreposição, chamada de base de amostra ou membrana de amostra. Geralmente, essa membrana é impregnada com uma solução tampão e surfactantes para que a amostra, ao entrar em contato com reagentes, se torne compatível com o restante do teste, promovendo uma melhor interação com o sistema de detecção. Assim, a amostra migra através da base de amostra para a base do conjugado, na qual a partícula de conjugado está imobilizada. A partícula pode ser, por exemplo, ouro coloidal ou uma partícula de látex colorida, fluorescente ou paramagnética, que está conjugada a um componente biológico específico, podendo ser um antígeno ou anticorpo, dependendo do formato do teste. A amostra solubiliza o conjugado seco e o analito na amostra interage com o conjugado formando um complexo que migra para a próxima seção da tira, a área de reação. A área de reação consiste em uma membrana hidrofóbica composta por nitrocelulose ou acetato de celulose, na qual componentes biológicos específicos (normalmente anticorpos ou antígenos) estão imobilizados na forma de linhas horizontais. A linha onde são imobilizados os reagentes de captura do complexo conjugado-analito é chamada de banda teste (BT). Ainda dentro da área de reação, encontra-se uma segunda linha, chamada de banda controle (BC), responsável pela validação do teste, indicando o correto funcionamento dos componentes e o adequado fluxo de líquido pela tira teste. O excesso de reagentes migra até a base absorvente, que se encontra na outra extremidade da tira teste. Os resultados são interpretados na área de reação como presença ou ausência das bandas com diferentes intensidades resultantes do acúmulo de conjugado, que podem ser vistas a olho nu ou utilizando um leitor dedicado. (O'FARRELL, 2009; SHARMA et al., 2015; KOCZULA e GALLOTTA, 2016).

Os formatos dos LFAs podem ser tanto sanduíche quanto competitivos. O formato sanduíche é utilizado para analitos grandes (proteínas) com múltiplos determinantes antigênicos. Este formato pode ser utilizado para detecção de anticorpo ou antígeno. No caso de detecção de antígeno, um conjugado contendo um anticorpo específico para o antígeno pesquisado é aplicado na base do conjugado e outro anticorpo específico para este mesmo antígeno é aplicado na banda teste. Assim, o antígeno, quando presente na amostra, interage com o conjugado, formando um complexo que se liga aos anticorpos aplicados na banda teste. Por outro lado, para detecção de anticorpo, utilizam-se um conjugado contendo um antígeno reconhecido pelo anticorpo pesquisado e outro antígeno na banda teste. Os resultados obtidos pelo formato sanduíche são presença da banda teste (resultado positivo) ou ausência da mesma (resultado negativo) e a presença de banda controle indica o funcionamento adequado do teste

(Figura 2) (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE, KORF e VAN AMERONGEN, 2009; SAJID, KAWDE E DAUD, 2015).

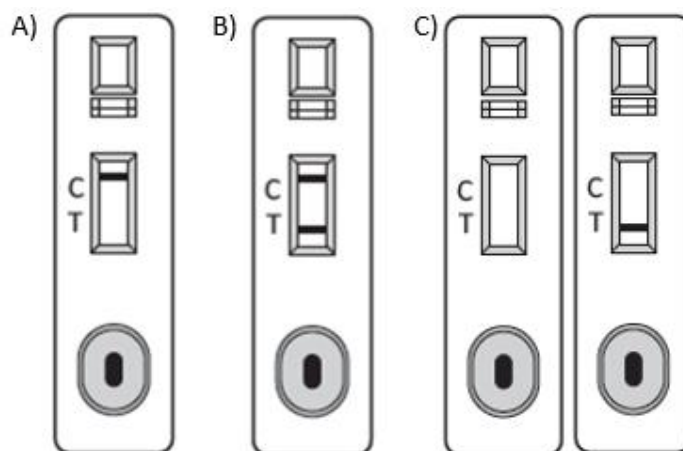


Figura 2: Interpretação de resultados no teste imunocromatográfico de fluxo lateral do formato sanduíche. A) Teste com resultado negativo. B) Teste com resultado positivo. C) Testes com resultado inválido.

Fonte: Autor.

Já o formato competitivo é utilizado para compostos de baixo peso molecular, os quais não podem se ligar em dois anticorpos simultaneamente. A ausência da banda teste indica presença do analito, ao passo que o aparecimento das bandas teste e controle indica um resultado negativo. O formato competitivo também pode detectar antígeno ou anticorpo. Para detecção de antígeno, utiliza-se um conjugado contendo um anticorpo específico para o antígeno e o mesmo antígeno a ser detectado é aplicado na banda teste. Assim, o antígeno presente na amostra e o da banda teste competem pelo mesmo conjugado. No caso de detecção de anticorpo, um antígeno conjugado é aplicado na base do conjugado ao passo que um anticorpo primário que reconheça especificamente o antígeno é aplicado na banda teste. Após aplicação da amostra, ocorre uma competição entre o analito e o conjugado para ligar ao anticorpo da banda teste (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE, KORF e VAN AMERONGEN, 2009; SAJID, KAWDE e DAUD, 2015).

Durante os anos 80, o desempenho dos LFAs era considerado inferior aos testes imunoenzimáticos ELISA. Entretanto, com o aprimoramento da técnica ao longo dos anos, esses testes atualmente apresentam desempenho comparável ao ELISA, ou seja, nos dias atuais, são capazes de apresentar alta sensibilidade e especificidade sem perder suas vantagens (baixo custo, fácil manuseio, uso de diferentes tipos de amostras, transporte e armazenamento não

requerem refrigeração, obtenção dos resultados em um tempo curto, boa estabilidade e portabilidade) fazendo com que se tornem aplicáveis em diversas situações (PONCE et al., 2005; BRASIL, 2007; O'FARRELL, 2009; SHARMA et al., 2015).

A aplicação de LFAs em programas de saúde brasileiros tem aumentado nos últimos anos, o que permitiu a inclusão de algumas populações, como trabalhadores itinerantes, profissionais do sexo, usuários de drogas ilícitas e habitantes de locais de difícil acesso ao sistema de saúde, pois possibilitou ao paciente a realização do teste, o conhecimento do resultado, o início da terapêutica e o aconselhamento no mesmo atendimento. Isso é possível pela rapidez do resultado, além da versatilidade da técnica, que dispensa a necessidade de infraestrutura laboratorial e profissionais especializados (BRASIL, 2007; POSTHUMATRUMPIE, KORF E VAN AMERONGEN, 2009).

1.4. Construção de um LFA

A primeira etapa a ser realizada quando se deseja construir um teste imunocromatográfico de fluxo lateral é definir no projeto quais características este produto deve possuir para que ele esteja dentro dos critérios de desempenho mínimos exigidos. Os principais parâmetros para análise de desempenho são sensibilidade e especificidade, tempo necessário para obter o resultado, matrizes de amostra, estabilidade, entre outros. Comumente, uma tira teste LFA é composta por um conjunto de elementos que combinados irão determinar seu desempenho. A maioria desses componentes possui propriedades críticas para o desenvolvimento de um teste eficaz e a alteração ou substituição de um material ou reagente frequentemente afeta o funcionamento dos outros (CAMARGO, 2015).

Por isso, algumas propriedades dos principais componentes de uma tira teste de LFA devem ser consideradas durante seu desenvolvimento. A seguir, destacam-se orientações que podem auxiliar na otimização do protótipo e seleção de reagentes que compõem as bandas teste e controle, o conjugado, bases de conjugado e de amostra, base absorvente e o cassete plástico.

1.4.1. Reagentes de Captura

Os anticorpos e antígenos utilizados no desenvolvimento de um teste rápido precisam ser cuidadosamente projetados e selecionados, pois estes estão muito relacionados às características de sensibilidade e especificidade do produto. É de extrema importância, que seja garantido o consistente fornecimento desses itens com sensibilidade, especificidades, pureza e

estabilidade necessárias para atender aos requisitos de funcionamento do produto final. (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

O desenho do ensaio é quem determina quais reagentes serão utilizados nas bandas teste e controle para captura e no conjugado para detecção. Todavia, independente do reagente escolhido, este sempre deve manter-se reativo e íntegro, desde sua adsorção à superfície da membrana e posterior secagem no processo de produção, até ser reidratado pela amostra durante a execução do teste (MILLIPORE, 2015).

1.4.2. Reagentes Detectores

Diversos tipos de reagentes detectores podem ser usados para a visualização de um sinal. Durante a seleção de um reagente detector para compor o conjugado deve-se levar algumas propriedades em consideração, como, por exemplo, ser estável sob diversas temperaturas e condições, eficiência e reprodutibilidade no processo de conjugação, apresentar processo de conjugação escalonável, possuir baixa reatividade não específica, entre outros (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

As nanopartículas de ouro coloidal são, atualmente, os marcadores mais utilizados em LFAs comerciais e podem ser produzidas *in house* ou adquiridas comercialmente. Outra opção comumente utilizada, são as partículas de látex, que têm a vantagem de serem produzidas com uma grande variedade de cores, característica muito útil para aplicação em testes do tipo multiplex, que requerem discriminação entre várias linhas (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

1.4.3. Membrana

A escolha da membrana é considerada uma das etapas mais críticas do desenvolvimento das tiras de LFA, pois ela determinará o fluxo do líquido pela área de reação e a nitidez do resultado na janela de leitura.

Qualidades físicas e químicas da membrana interferem em suas propriedades de fluxo capilar que, conseqüentemente, alteram as características de deposição de reagente, a sensibilidade e a especificidade do ensaio e a consistência da linha de teste. Por isso, durante a seleção de membrana, é importante observar alguns parâmetros, como sua força capilar, facilidade na imobilização dos componentes das bandas teste e controle, porosidade (que pode ser avaliada através do tempo necessário para o líquido se deslocar e preencher completamente a membrana) e facilidade de manuseio (MILLIPORE, 2015).

A membrana de nitrocelulose é o material mais comumente usado para esta função. (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE, KORF E VAN AMERONGEN, 2009).

1.4.4. Base de Amostra

A base de amostra possui como função promover a distribuição uniforme da amostra e adequá-la para uma eficiente interação com o conjugado e com as bandas teste e controle. Para isso, geralmente, são previamente tratadas com sais, agentes bloqueadores e surfactantes, que auxiliam no controle do fluxo do líquido. A escolha do material da base de amostra é determinante para o tipo de amostra que se deseja utilizar, pois o tamanho de seus poros podem atuar como um filtro, retendo parte do material que não é de interesse na reação (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

1.4.5. Base de Conjugado

A base de conjugado tem como principal função manter o conjugado seco fixo e estável até o momento da interação com a amostra. Para garantir que isso ocorra, é importante desenvolver o tratamento dessa membrana ou do próprio conjugado com soluções tampões, adição de açúcares e um agente ressolubilizante.

O açúcar presente na membrana na qual se aplica o conjugado, quando seco, forma uma camada ao seu redor que o estabiliza, protegendo suas estruturas biológicas. Ao entrar em contato com a amostra, o açúcar instantaneamente se dissolve, carregando os reagentes para a superfície e integrando-os à corrente fluida (MILLIPORE, 2015).

1.4.6. Base Absorvente

O papel da base absorvente é o de auxiliar no fluxo do fluido e absorver o líquido remanescente que percorreu toda a tira teste. Para a escolha da base absorvente é importante considerar o volume de amostra e solução diluente de amostra que se deseja utilizar.

1.4.7. Cassete Plástico

O cassete plástico, feito de material biocompatível, é composto por uma base onde a tira teste deverá ser alocada e uma tampa com cavidades que servirão para recebimento de amostra, janela de leitura e adesivo de identificação (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE, KORF E VAN AMERONGEN, 2009; MILLIPORE, 2015).

A estrutura de um cassete plástico pode variar interna e externamente. Alguns modelos apresentam uma única cavidade onde deposita-se a amostra e a solução diluente enquanto outros, apresentam cavidades separadas. Além disso, também podem ser observadas diferenças no *design* do cassete.

No interior do cassete, são projetados barras e pinos que possuem a função de pressionar as membranas em pontos estratégicos, mantendo-as na posição correta e em contato umas com as outras. Além de garantir a correta sobreposição das membranas, o cassete evita que o usuário aplique a amostra em um local errado (MANSFIELD, 2009; CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi realizar o desenvolvimento e a validação de um teste de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-HCV, denominado Imuno-Rápido HCV.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e padronizar o Imuno-Rápido HCV.
- Avaliar parâmetros de desempenho do kit desenvolvido como sensibilidade e especificidade clínicas, e comparar os resultados obtidos com um teste de ELISA e um kit imunocromatográfico rápido para detecção de anticorpos anti-HCV disponível no mercado;
- Determinar a sensibilidade analítica do kit Imuno-Rápido HCV;
- Realizar a análise de interferentes do kit Imuno-Rápido HCV;
- Realizar testes de reprodutibilidade e repetibilidade do kit, além da análise do desempenho do teste ao longo do tempo, por meio da avaliação da estabilidade em tempo real e acelerada.

3. METODOLOGIA

A primeira fase desse estudo consistiu na busca pela padronização do protótipo do *kit* Imuno-Rápido HCV WAMA. Devido ao fato de se tratar de informações confidenciais relacionadas ao processo de fabricação da empresa WAMA Diagnóstica, todos os nomes dos anticorpos e antígenos, membranas, fornecedores e equipamentos, que foram utilizados no desenvolvimento desse projeto foram mantidos em sigilo e apresentados na forma de códigos.

A segunda etapa compreendeu o estudo de validação do protótipo do Imuno-Rápido HCV objetivando a verificação de seu desempenho.

3.1. Padronização do Protótipo

Nesta etapa do estudo, diferentes combinações dos componentes da tira teste foram avaliadas buscando alcançar um protótipo que atendesse ao desempenho mínimo de funcionamento estabelecido a partir de requisitos para registro do produto nos órgãos competentes (como a ANVISA) e lançamento no mercado.

Para encontrar a combinação de componentes que atendesse aos requisitos de funcionamento, foram realizados ensaios preliminares otimizando-se o modelo e analisando as interações entre esses elementos e os resultados práticos obtidos após cada ajuste.

Os principais componentes analisados com o objetivo de padronização do protótipo foram: membrana de nitrocelulose, concentração dos antígenos e proteínas recombinantes (banda teste) e anticorpos (banda controle) para sensibilização da membrana de nitrocelulose, membrana de fibra de vidro para base de amostra e para aplicação do conjugado, concentração e proporção do conjugado e cassete plástico.

3.1.1. Banda Teste, Banda Controle e Membrana de Nitrocelulose

A primeira etapa do desenvolvimento do protótipo consistiu em selecionar os componentes das bandas teste e controle. Como o objetivo do trabalho era detectar a presença de anticorpos anti-HCV nas amostras de sangue ou soro dos pacientes, optou-se por utilizar um coquetel de proteínas e antígenos recombinantes de HCV para sensibilização da membrana de nitrocelulose na BT. Para a BC foi escolhido um anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (do inglês, *goat anti mouse IgG*, GAM). Ambos os reagentes foram adquiridos comercialmente.

Nesta primeira etapa foram avaliadas também duas diferentes membranas de nitrocelulose para verificar qual seria a mais adequada ao teste, observando-se o fluxo e nitidez do teste.

Para a sensibilização das membranas de nitrocelulose, a impregnação dos antígenos e anticorpos foi realizada utilizando-se um equipamento específico para impregnação. Após sensibilização, as membranas foram secas em estufa a 37°C por no mínimo 8 horas e não ultrapassando o período máximo de 14 horas. Depois de secas, estas foram armazenadas em câmara desumidificadora com umidade relativa do ar inferior a 30%, à temperatura ambiente, até o momento do uso.

3.1.2. Determinação do Volume de Amostra e Tempo de Leitura

Foram avaliados dois diferentes volumes de amostra, sendo 10 µL para amostras de soro e 20 µL para amostras de sangue total, e fixou-se o volume de diluente de amostra em 3 gotas (aproximadamente 90 µL). O tempo de leitura foi fixado em 15 minutos.

3.1.3. Bloqueio da Base do Conjugado

A realização de bloqueio da membrana do conjugado tem como objetivo principal obstar a ocorrência de ligações inespecíficas de outros elementos além do conjugado. Através desse tratamento de membrana também é possível ajustar o fluxo de liberação de conjugado para a membrana de nitrocelulose, utilizando diferentes surfactantes nesse processo.

Neste estudo, foi utilizada uma membrana de fibra de vidro tratada com solução contendo albumina soro bovina (BSA) como agente bloqueador e uma combinação de dois surfactantes como reguladores de fluxo de liberação de conjugado. As membranas foram então secas por um período de 8 a 14 horas em ambiente desumidificado e mantidas em câmara desumidificadora até o momento da aplicação do conjugado.

3.1.4. Conjugado de Ouro Coloidal

Para a composição do conjugado de ouro coloidal foi avaliada uma mistura contendo antígeno HCV e IgG de camundongo, ambos conjugados com ouro coloidal. Para avaliação, essa mistura foi realizada em duas proporções (CGC1 e CGC2) e impregnadas na base de conjugado. A aplicação foi realizada com o auxílio de um aparelho específico para esta finalidade capaz de dispensar o conjugado na forma de *spray*.

As membranas aplicadas foram secas em estufa a 37°C por um período mínimo de 8 horas e máximo de 14 horas. Depois de secas, estas foram armazenadas em câmara desumidificadora com umidade relativa do ar inferior a 30%, à temperatura ambiente, até o momento do uso.

3.1.5. Seleção da Concentração do Conjugado

O volume de conjugado aplicado no teste está relacionado com a promoção do surgimento de linhas coloridas nas áreas BT e BC da tira teste através da interação da amostra com as partículas conjugadas com ouro coloidal, que irão revelar o seu resultado. Por isso, para que o teste tenha um bom desempenho, é necessário estabelecer o volume de conjugado que apresente eficiência na ligação com o analito.

As combinações de conjugado foram preparadas e aplicadas nas bases de conjugado utilizando-se três diferentes taxas de dispensação de conjugado em um equipamento próprio para essa finalidade. As taxas de dispensação utilizadas para avaliar cada combinação de conjugado foram 0,20 µL/mm, 0,30 µL/mm e 0,40 µL/mm.

Após a secagem, as bases contendo as linhas de conjugado foram cortadas em tiras de 300 mm e cerca de 6 mm de largura e mantidas em câmaras desumidificadoras até o momento do uso.

3.1.6. Base de Amostra

Para a base de amostra, foram avaliadas duas diferentes marcas de membrana de fibra de vidro tratadas com uma solução tampão contendo agente bloqueador e surfactantes. As bases foram secas *overnight* em temperatura ambiente em sala desumidificada. Após a secagem, as membranas foram cortadas em tiras de 300 mm de comprimento por 17 mm de largura e mantidas em câmaras com umidade abaixo de 30% até o momento de uso.

3.1.7. Cassete Plástico

O cassete é a estrutura que comporta a tira teste e exerce pressão em vários pontos fazendo com que o fluxo ocorra adequadamente. Foram avaliados três diferentes modelos de cassete plástico, sendo dois deles com uma única cavidade para depósito de amostra e solução diluente (M1 e M2) e um com cavidades separadas (M3).

3.1.8. Montagem da Folha Teste e Obtenção das Tiras Individuais

A montagem da folha teste foi feita através da sobreposição das seguintes membranas:

1. Membrana de nitrocelulose impregnada com as linhas teste e controle;
2. Base de conjugado impregnada com o conjugado;
3. Base de amostra previamente tratada;
4. Base absorvente.

A montagem deverá obedecer à sequência esquematizada na Figura 3.



Figura 3: Estrutura da placa montada mostrando a sobreposição das diversas membranas.

Fonte: Adaptado de CAMARGO (2015).

Por último, foram colados adesivos de identificação sobre a base absorvente.

Na sequência, utilizando uma guilhotina automática, a folha teste foi cortada em tiras de 4mm de largura. Finalmente, as tiras foram individualmente alocadas em cassetes plásticos e mantidas em câmara desumidificadora ou sachês de alumínio contendo sílica dessecante até o momento de uso.

3.1.9. Avaliação de Desempenho do Protótipo

Deve-se utilizar um painel de amostras caracterizadas para avaliar as diferentes possibilidades de combinações de reagentes até que se alcance o protótipo final. O protótipo ideal é aquele cuja combinação de componentes promove a obtenção de resultados concordantes com os valores esperados dos controles e a reprodução desses resultados em testes fabricados em diferentes dias e/ou com diferentes lotes de matérias-primas (CAMARGO, 2015).

O protótipo deste trabalho foi testado inicialmente utilizando-se controles adquiridos do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). O teste foi realizado da seguinte maneira: os cassetes contendo as tiras testes em temperatura ambiente foram posicionados sobre uma superfície plana e imediatamente foram adicionados 10 μ L de amostra de soro controle na

cavidade de amostra. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de solução diluente de amostra e o resultado foi lido visualmente em 15 minutos.

Após a obtenção de um modelo que apresentasse boa sensibilidade e especificidade, foram produzidos três pequenos lotes pilotos utilizando-se diferentes lotes de matérias-primas para cada um dos principais componentes da tira teste (antígenos, anticorpos, conjugado, membranas e solução diluente de amostra) e aplicações em dias diferentes. Utilizando esses lotes pilotos, realizou-se o aumento de amostragem para determinação dos valores de sensibilidade e especificidade do produto bem como as demais análises da validação.

3.2. Validação do Protótipo

3.2.1. Aspectos Éticos:

A realização deste estudo de validação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em 25 de abril de 2019, sob Protocolo CAAE nº 02937418.5.0000.5504. Foi solicitado o uso do excedente de amostra aos pacientes dos laboratórios de análises clínicas parceiros que estivessem realizando coleta de sangue para realização de exames sorológicos para diagnóstico da Hepatite C e a autorização de uso foi registrada através da aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todas as amostras foram coletadas e codificadas pela equipe técnica própria do laboratório de forma que a identidade dos sujeitos não fosse revelada à pesquisadora.

3.2.2. Amostras

Foram adquiridas comercialmente 31 amostras-controles do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) e realizada a prospecção de 352 amostras biológicas durante o período de abril a agosto de 2019 nos laboratórios de análises clínicas parceiros nas cidades de São Carlos e Araraquara. Todo o processamento das amostras biológicas foi realizado pela equipe técnica dos próprios laboratórios e, após a realização dos exames particulares, foi disponibilizado o volume excedente para a realização dos testes seguindo os procedimentos específicos de cada *kit* descritos nos itens 3.2.3 a 3.2.5 deste estudo.

3.2.3. Realização dos testes com o *kit* desenvolvido na empresa WAMA Diagnóstica (*Kit* Imuno-Rápido HCV)

Para a execução do teste com amostras de soro e sangue total, foi aplicado o procedimento descrito a seguir:

O volume 10 μL de soro ou 20 μl de sangue total foi pipetado na cavidade da amostra da placa teste. Na sequência, foram adicionadas três gotas de solução diluente de amostra e aguardou-se o tempo de reação de 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura dos resultados foi feita através da observação visual das linhas formadas na janela de leitura da placa teste. Foram considerados testes com resultado positivo aqueles que apresentaram a formação de duas linhas (banda teste e banda controle), testes negativos aqueles que apresentaram a formação de apenas banda controle e inválidos aqueles que apresentaram a formação apenas de banda teste ou nenhuma banda.

3.2.4. Realização dos testes com o *kit* comercial disponível no mercado (Comercial A)

Com a finalidade de manter o sigilo referente ao fabricante do *kit* disponível comercialmente, iremos denominá-lo neste trabalho como *Comercial A*.

Todas as amostras de soro utilizadas no item 3.2.3 foram testadas em paralelo com o *kit Comercial A*, seguindo as instruções de uso apresentadas pelo fabricante: em um tubo de ensaio, foram depositadas quatro gotas de solução diluente de amostra. Em seguida, foram adicionados 10 μL de amostra ao tubo. Após leve homogeneização, colocou-se a tira teste em contato com a amostra e aguardou-se o tempo de reação de 20 minutos em temperatura ambiente.

A leitura dos resultados foi feita através da observação visual das linhas formadas na área de leitura da tira teste. Foram considerados testes com resultado positivo aqueles que apresentaram a formação de duas linhas (banda teste e banda controle), testes negativos aqueles que apresentaram a formação de apenas banda controle e inválidos aqueles que apresentaram a formação apenas de banda teste ou nenhuma linha.

3.2.5. Realização dos Testes com a Técnica ELISA

Todas as amostras utilizadas no item 3.2.3 foram testadas com a técnica ELISA utilizando o *kit* comercial Murex 4.0 anti-HCV (DiaSorin) seguindo as instruções de uso do fabricante. Neste *kit*, uma microplaca com 96 poços revestidos com antígenos HCV sintéticos é utilizada para aplicar uma diluição 1:20 de amostra em solução diluente de amostra. Quando presentes na amostra, anticorpos anti-HCV reconhecem estes antígenos fixados nos poços e ligam-se a eles durante uma incubação de uma hora a 37°C. Após esse período, é realizada uma etapa de lavagem para a remoção do excesso de amostra dos poços e, na sequência, adiciona-se uma solução contendo antigamaglobulina anti-IgG humana conjugada com peroxidase e

incuba-se por 30 minutos a 37°C. Durante a incubação, as antigamaglobulinas ligam-se aos anticorpos anti-HCV presentes nas amostras reagentes e formam um complexo. Terminado o período de incubação, realiza-se uma nova etapa de lavagem para remoção do excesso de reagente e adiciona-se uma solução contendo um substrato para a enzima e um cromógeno que irá reagir com a peroxidase e provocar uma alteração de cor nos poços contendo o complexo antígeno-anticorpo formado anteriormente. Em seguida a reação é interrompida adicionando-se a solução de parada e realiza-se a leitura da absorbância em cada um dos 96 poços utilizando uma leitora de microplacas em comprimento de onda de 450 nm.

3.2.6. Análise Estatística Diagnóstica

Assumindo os resultados obtidos com o teste de metodologia ELISA (padrão ouro) do item 3.2.5 como referencial, realizou-se a análise estatística diagnóstica, com intervalo de confiança (IC) igual a 95%, para determinação de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos dos *kits* Imuno-Rápido HCV e *Comercial A*. O coeficiente *kappa* (*k*) foi calculado para avaliar o nível de concordância entre os testes imunocromatográficos rápidos.

A seguir, são apresentadas as definições:

- Sensibilidade clínica: percentual de resultados positivos obtidos quando o analito está presente na amostra (verdadeiro positivo), ou seja, percentual de testes que reconhecem corretamente a presença de anticorpos anti-HCV.
- Especificidade clínica: percentual de resultados negativos obtidos quando o analito não está presente na amostra, assumindo a inexistência de uma determinada doença ou condição, ou seja, é a capacidade do *kit* em análise de determinar corretamente a ausência de anticorpos anti-HCV na amostra.
- Valor preditivo positivo (VPP): é a proporção de pacientes verdadeiramente doentes entre os resultados positivos pelo teste, ou seja, é a probabilidade de uma amostra com resultado reagente ser de um paciente que verdadeiramente apresenta anticorpos anti-HCV.
- Valor preditivo negativo (VPN): é a proporção de pacientes sadios (sem a doença) entre os testes que apresentaram resultados negativos, ou seja, é probabilidade de uma amostra avaliada e com resultado não reagente ser realmente de um paciente que não apresenta anticorpos anti-HCV.

O coeficiente *kappa* foi calculado segundo método descrito por Cohen (1960) e considerou-se um intervalo de confiança de 95%.

A medição dos parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo foram calculados conforme as fórmulas (FERREIRA e ÁVILA, 2001; FERREIRA, MORAES e BECK, 2007):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{(\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso negativo})}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{(\text{Verdadeiro negativo} + \text{Falso positivo})}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{(\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso positivo})}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{(\text{Verdadeiro negativo} + \text{Falso negativo})}$$

3.2.7. Análise de Repetibilidade

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada nº 36 de 26 de agosto de 2015 (RDC36/2015), a repetibilidade de um teste é determinada pela capacidade do mesmo em apresentar os mesmos resultados em sucessivas medições de um mesmo analito em condições operacionais inalteradas, como lotes, operadores e dia.

Para a realização dessa medição, foram selecionadas dez amostras controles, sendo cinco reagentes e cinco não reagentes para anticorpos anti-HCV, para serem testadas mantendo-se todas as condições (operador, lote e dia).

3.2.8. Análise de Reprodutibilidade

A RDC36/2015 descreve reprodutibilidade de um teste como a capacidade do mesmo de apresentar os mesmos resultados após sucessivas medições de um mesmo analito em condições operacionais distintas (variações de operador, lote, dia, etc). Dessa forma, para determinar a reprodutibilidade do *kit* em análise, foram selecionadas dez amostras controles, sendo cinco reagentes e cinco não reagentes para anticorpos anti-HCV, para serem testadas alterando-se todas as condições (três operadores e três lotes em dias diferentes).

3.2.9. Análise de Estabilidade em Tempo Real e Acelerada

Atualmente, não há normativas bem estabelecidas de estudos de estabilidade para produtos diagnósticos e os relatos na literatura são escassos quando comparado a outros produtos, como os estudos de estabilidade de medicamentos, que são amplamente explorados e possuem normas claras na legislação. Devido a esse fato, os estudos de estabilidade são feitos com base no conhecimento do produto e na troca de experiência com outros fabricantes do setor (MENEGHISSE, 2007; CAMARGO, 2015).

3.2.9.1. Estabilidade Acelerada

Através de estudos prévios realizados pelo Controle de Qualidade da empresa WAMA Diagnóstica, sabe-se que o estresse provocado por uma alta temperatura (56°C) durante o período de 72 horas para placas teste e 7 dias para solução diluente de amostra corresponde ao processo de degradação do *kit* equivalente a pelo menos 18 meses de validade. Dessa forma, para determinar se o *kit* é capaz de manter sua funcionalidade por um período que o torne viável para o mercado, submeteu-se um *kit* contendo 20 placas testes a uma incubação em estufa a 56°C por 72 horas e dois frascos de solução diluente de amostra por 7 dias a 56°C. Seu desempenho foi comparado com um *kit* de 20 testes mantido sob condições ideais de armazenamento (2 a 30°C). Para essa medição foram selecionadas três amostras controles sendo uma reagente, uma fracamente reagente e uma não reagente para anticorpos anti-HCV.

3.2.9.2. Estabilidade em Tempo Real (parcial)

Para a análise em tempo real, foram mantidos 3 *kits* de 20 testes sob condições ideais de armazenamento (2 a 30°C). Foram realizados testes mensais para verificar a capacidade do *kit* em manter sua funcionalidade pelo período mínimo de 18 meses. Para essa medição, foram selecionadas três amostras controles sendo uma reagente forte, uma reagente fraca e uma não reagente para anticorpos anti-HCV.

3.2.10. Análise de Interferentes

Foram testadas amostras e/ou controles comerciais com diagnóstico conhecido para Hepatite C e sabidamente positivos para HIV, Hepatite B ou Dengue a fim de avaliar se essas situações podem interferir no resultado do teste. Além dessas amostras, também foram

avaliadas amostras de gestantes, paciente em hemodiálise, amostras lipêmicas e hemolisadas com o mesmo objetivo.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nas fases de padronização do protótipo Imuno-Rápido HCV e de validação do produto são apresentados a seguir.

4.1. Padronização dos Protótipos

Nesta primeira etapa, buscou-se pelo protótipo do Imuno-Rápido HCV definindo-se os componentes que apresentam melhor desempenho.

4.1.1. Seleção das Bandas Teste e Controle e Membrana de Nitrocelulose

A análise dos componentes das BT e BC foram realizadas em conjunto com a membrana de nitrocelulose.

Durante a impregnação das soluções de BT e BC utilizando equipamento específico para esta finalidade, observou-se o padrão de espalhamento das mesmas sobre a membrana de nitrocelulose e constatou-se que a membrana NC-A permitiu a formação de linhas bem definidas e homogêneas, enquanto que na membrana NC-B, as linhas apresentavam irregularidades (Figura 4). Ao entrar em contato com o fornecedor da NC-B, foi sugerido realizar a aplicação em uma velocidade menor que a usual, porém, mesmo com a redução das irregularidades após esse ajuste, a NC-B foi descartada devido ao fato dessa velocidade ser muito reduzida, o que provocaria atrasos na fabricação de um lote com grande volume de testes, inviabilizando sua utilização.

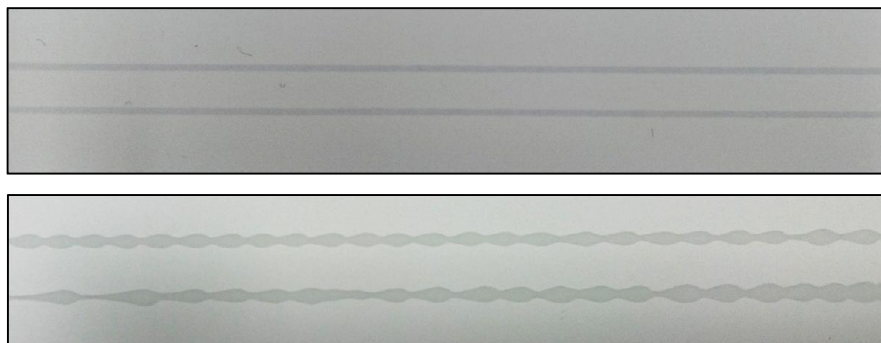


Figura 4: Dispersão das soluções de banda teste e banda controle durante aplicação nas membranas de nitroceluloses NC-A e NC-B. Tanto a linha teste quanto a linha controle apresentaram-se regulares durante todo o comprimento da membrana NC-A. Entretanto, tanto a linha teste quanto a linha controle apresentaram-se irregulares durante todo o comprimento da membrana NC-B.

Fonte: Autora.

Ainda em relação às membranas de nitrocelulose, a membrana NC-A apresentou um fluxo satisfatório durante a realização do teste, ao contrário da membrana NC-B que apresentou um maior tempo para que o fluido percorresse toda a tira teste (Figura 5) suas bandas, como esperado, ficaram irregulares (Figura 6).

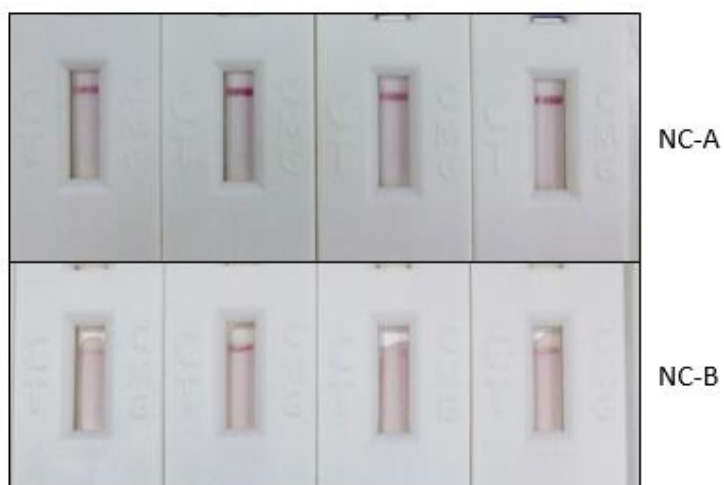


Figura 5: Padrão de corrida das amostras nas membranas de nitrocelulose NC-A (acima) versus NC-B (abaixo) com o mesmo tempo de teste. A membrana de NC-B exige um maior tempo de corrida para preencher toda a membrana com amostra e apresenta um fluxo irregular da mesma, não observado na membrana NC-A.

Fonte: Autora.

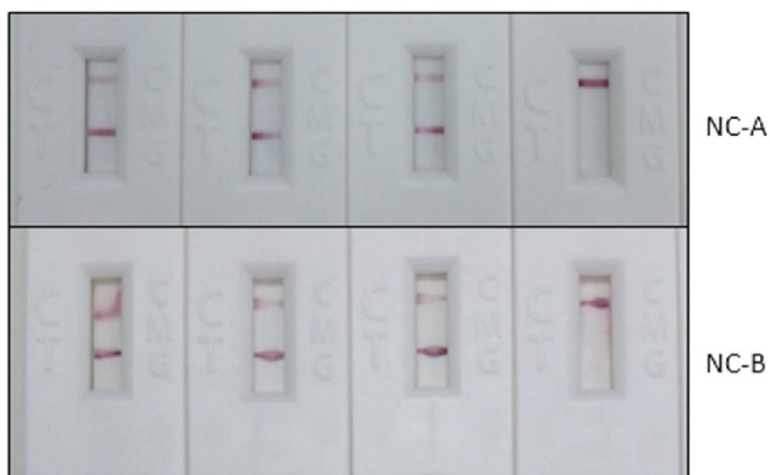


Figura 6: Padrão de formação de BC e BT nas membranas de nitrocelulose NC-A (acima) versus NC-B (abaixo) com o mesmo tempo de teste e mesmas amostras. A membrana NC-B apresentou linhas irregulares e borradas em comparação à membrana NC-A.

Fonte: Autora.

Para avaliação de reagente da banda teste, seguiu-se apenas com a membrana NC-A. Dentre as três concentrações de BT aplicadas, a BT-C3 apresentou bandas de baixa intensidade (sombra) em algumas amostras não-reagentes, ou seja, resultado falso positivo. Tanto a BT-C1 quanto a BT-C2 apresentaram boas intensidades de sinal para amostras reagentes e não foi observado resultado falso positivo (Figura 7). Dessa forma, a BT-C1, de menor concentração, foi selecionada para prosseguir com as análises, uma vez que esta possui um menor custo devido ao fato de utilizar um volume reduzido de solução de antígenos para sua aplicação.

A BC foi mantida em sua concentração em todas as análises e não apresentou diferença significativa em sua intensidade de sinal, demonstrando ser adequada para utilização no teste.

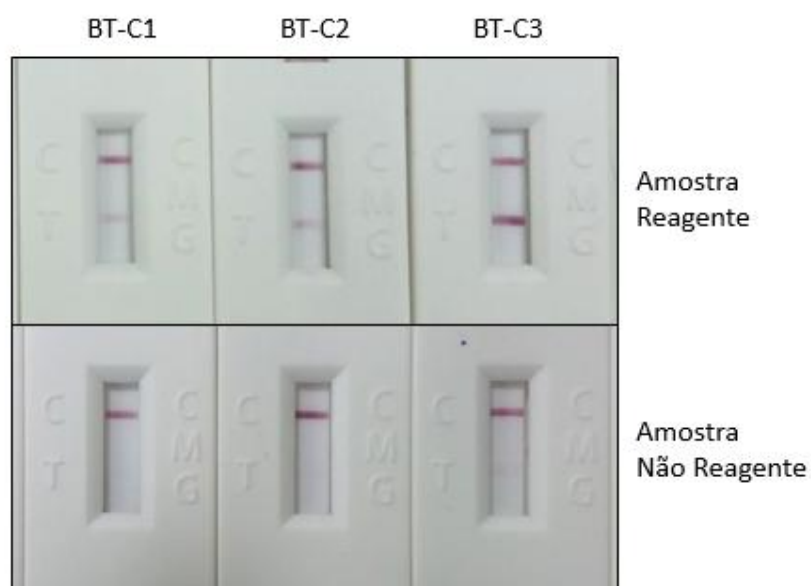


Figura 7: Comparação de três concentrações de BT. Dentre as três concentrações de BT avaliadas, a BT-C3 apresentou resultado falso positivo (sinal de baixa intensidade). As BT-C1 e BT-C2 não apresentaram falsos resultados.

Fonte: Autora.

4.1.2. Seleção do Conjugado

Selecionadas as concentrações de BT e BC, bem como a membrana de nitrocelulose, fixou-se estes componentes para avaliação de três diferentes taxas de dispensação (do inglês *dispenser rate*, DR) das duas combinações de conjugado.

Foram utilizadas as DRs nos valores de 0,20 $\mu\text{L}/\text{mm}$, 0,30 $\mu\text{L}/\text{mm}$ e 0,40 $\mu\text{L}/\text{mm}$. Não foram observados resultados falsos positivos ou falsos negativos em nenhuma das três taxas de dispensação. Entretanto, a DR 0,30 $\mu\text{L}/\text{mm}$ da combinação CGC1 apresentou BC e BT com

melhor definição e intensidade de sinal. Dessa forma, a combinação CGC1-DR 0,30 $\mu\text{L}/\text{mm}$ foi selecionada e prosseguiu-se para a etapa de seleção de base de amostra.

4.1.3. Seleção de Base de Amostra

Foram analisadas duas membranas de fibra de vidro de dois diferentes fabricantes. Ambas foram tratadas com uma solução tampão contendo agente bloqueador e surfactante.

Tanto a base de amostra BA1 quanto a BA2 apresentaram desempenho satisfatório quando foi utilizada amostra de soro, todavia, a BA1 apresentou falhas na retenção de amostra de sangue (Figura 8), provocando a ocorrência de escape de amostra para a janela de leitura do teste, sendo, portanto, desclassificada.

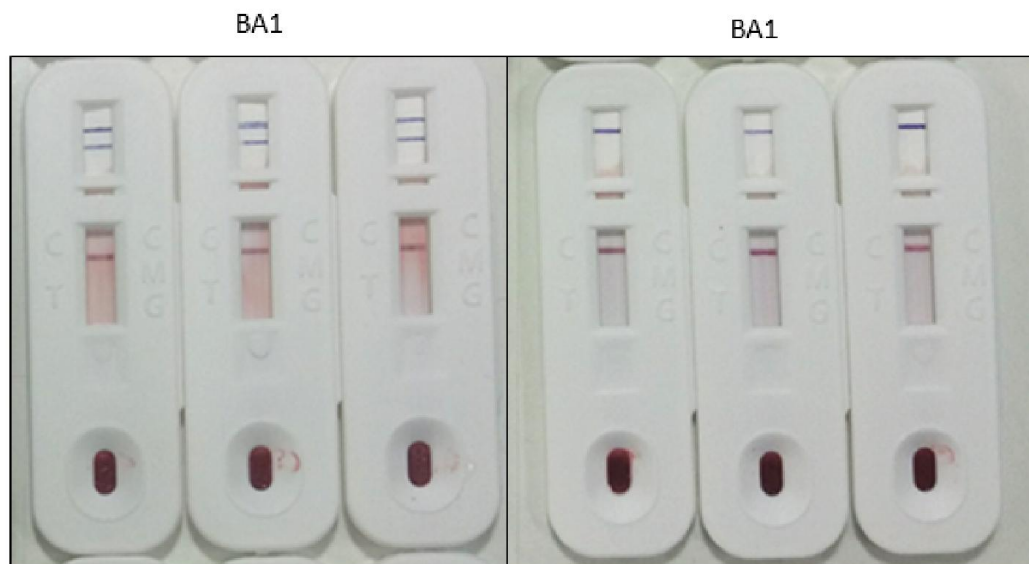


Figura 8: Análise de membrana para base de amostra. As fibras de vidro BA1 e BA2 apresentaram um bom fluxo, entretanto, a BA1 demonstrou falhas na retenção de amostra de sangue.

Fonte: Autora.

4.1.4. Seleção de Cassete Plástico

Todo o processo de padronização do protótipo foi realizado utilizando o modelo de cassete M1 desde o início devido ao fato de ser um modelo disponível e já comumente utilizado dentro da empresa. Além disso, foi dada preferência a este modelo pelo fato do tempo de montagem ser inferior, o que seria vantajoso para uma produção em larga escala.

Entretanto, para fins de análise de desempenho, foram avaliados outros dois diferentes modelos de cassetes plásticos, M2 e M3. Cada cassete foi projetado para apresentar diferentes pontos de pressão e no caso do M3, diferentemente dos outros dois modelos, existe uma

cavidade exclusiva para aplicação de amostra e outra para aplicação do diluente de amostra separadamente.

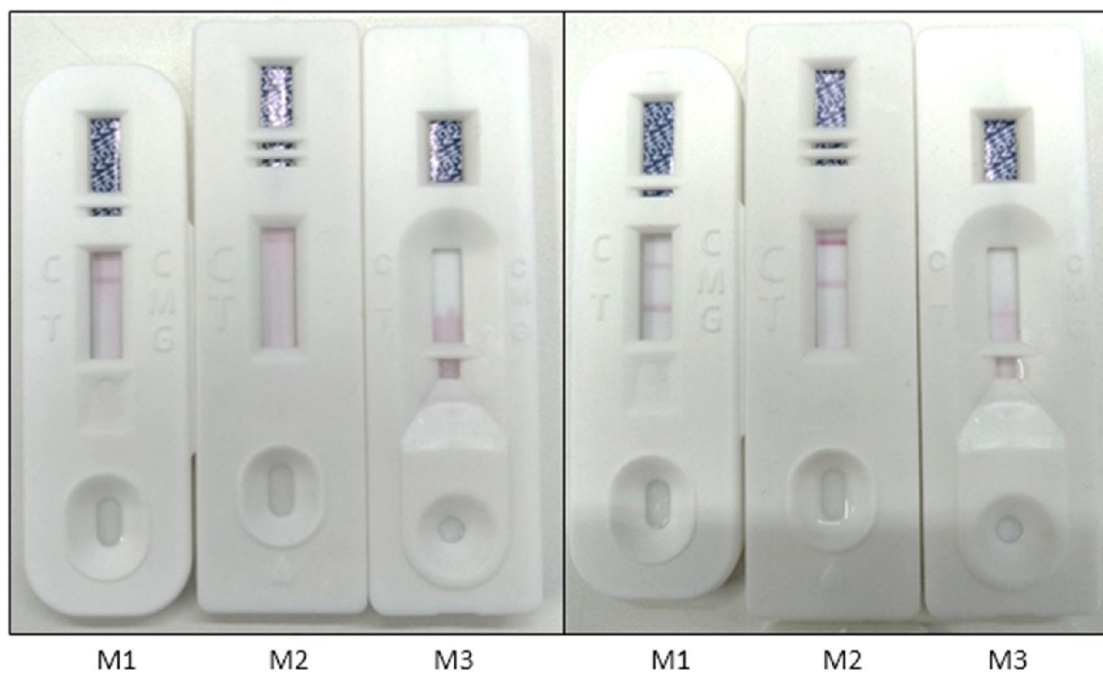


Figura 9: Análise de cassete plástico. O modelo M3 apresentou falhas durante o teste. Os modelos M1 e M2 apresentaram bom desempenho.

Fonte: Autora.

Tanto o modelo M1 quanto o M2 apresentaram desempenho satisfatório, como tempo de liberação de amostra e conjugado dentro do desejado e ausência de falsos resultados. O modelo M3 apresentou atraso ou impedimento na liberação do fluxo, além de invalidação de teste (Figura 9), sendo dessa forma, descartado.

Devido ao fato do cassete plástico M1 exigir menor tempo de montagem e já ser utilizado em outros produtos, optou-se por mantê-lo no protótipo.

4.1.5. Ajuste do Protótipo

Após a seleção de todos os componentes, montou-se o protótipo com as configurações descritas no Quadro 1. Na sequência, foram utilizadas 30 amostras controles do PNCQ para verificar o desempenho do protótipo do Imuno-Rápido HCV composto por este conjunto de elementos.

Componente	Avaliado	Selecionado
Membrana de Nitrocelulose	NC-A NC-B	NC-A
Banda Controle	BC-1	BC-1
Banda Teste	BT-C1 BT-C2 BT-C3	BT-C1
Base de Conjugado	BC	BC
Conjugado	CGC1-DR1 CGC1-DR2 CGC1-DR3 CGC2-DR1 CGC2-DR2 CGC2-DR3	CGC1-DR1
Base de Amostra	BA1 BA2	BA2
Base Absorvente	BAbs	BAbs
Modelo de Cassete	M1 M2 M3	M1
Solução diluente de amostra	WAMA	WAMA
Volume de Amostra	10 µL de soro 20 µL de sangue total	10 µL de soro 20 µL de sangue total
Tempo de Leitura	15 minutos	15 minutos

Quadro 1: Componentes avaliados e selecionados para composição do protótipo Imuno-Rápido HCV.

Ainda que não tenha sido observado resultado falso positivo ou negativo, a partir desse teste, decidiu-se ajustar as concentrações de BC e conjugado para que as bandas apresentassem melhor definição. Dessa forma, foi realizado um aumento de 50% da concentração do anticorpo GAM aplicado na BC e cerca de 15% da taxa de dispensação do conjugado.

Foram então produzidos três lotes pilotos variando-se os lotes de matéria-prima entre eles. Os lotes pilotos foram identificados pelas siglas LP-001, LP-002 e LP-003. Todos os testes foram mantidos embalados individualmente em sachês laminados e selados, contendo sílica dessecante, até o momento de uso.

4.2. Validação do Protótipo

Após a produção dos três lotes pilotos do Imuno-Rápido HCV, foram realizados os testes de validação do produto utilizando amostras de soro e sangue total.

4.2.1. Teste ELISA

Todas as amostras/controles de soro foram testadas utilizando a metodologia ELISA descrita na seção 3.2.5 de Materiais e Métodos. Os resultados obtidos estão caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos para as amostras de soro e controles testados com o padrão ouro (ELISA).

Teste ELISA	
Reagente	69
Não reagente	314
Total	383

De acordo com os resultados obtidos utilizando a metodologia padrão ouro (ELISA), dentre as 383 amostras testadas, 69 (18%) eram reagentes e 314 (82%) eram não-reagentes para anticorpos anti-HCV.

4.2.2. Análise de sensibilidade clínica e especificidade clínica do *kit* Imuno-Rápido HCV

Foram considerados os resultados obtidos com o padrão ouro como referencial para determinar se as amostras eram verdadeiramente positivas ou verdadeiramente negativas para os *kits* imunocromatográficos rápidos em avaliação. Os resultados observados nessa análise estão descritos na Tabela 2 e os valores de sensibilidade clínica, especificidade clínica, VPP e VPN calculados de acordo com o item 2.2.6 de Materiais e Métodos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do *kit* Imuno-Rápido HCV para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro utilizando-se a técnica de ELISA como referência.

Imuno-Rápido HCV Amostras de soro	ELISA (padrão ouro)		
	Reagente	Não Reagente	Total
Reagente	69	1	70
Não Reagente	0	313	313
Total	69	314	383

Tabela 3 – Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Imuno-Rápido HCV utilizando amostras de soro.

Medida de Desempenho	Imuno-Rápido HCV Amostras de soro	IC 95%
Sensibilidade Clínica	100,0%	(100,0%,100,0%)
Especificidade Clínica	99,7%	(99,1%,100,0%)
Valor Preditivo Positivo	98,6%	(95,8%,100,0%)
Valor Preditivo Negativo	100,0%	(100,0%,100,0%)

O *kit* Imuno-Rápido HCV apresentou uma amostra com resultado falso positivo em relação ao padrão ouro, sendo a especificidade clínica medida de 99,7%. Todas as amostras reagentes foram corretamente identificadas, retornando um valor de sensibilidade clínica de 100%. Os valores de VPP e VPN encontrados foram 98,6% e 100%, respectivamente.

Dentre o total de 383 amostras de soro avaliadas nos itens anteriores, 75 possuíam uma amostra correspondente coletada nas mesmas condições na forma de sangue total. Dessa forma, foi possível avaliar a sensibilidade e especificidade clínicas do Imuno-Rápido HCV quando utilizada amostra de sangue total em comparação ao uso de amostra de soro (Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do kit Imuno-Rápido HCV para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de sangue total utilizando-se a técnica de ELISA como referência.

Imuno-Rápido HCV Amostras de Sangue Total	ELISA (padrão ouro)		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	16	0	16
Não Reagente	0	59	59
Total	16	59	75

Tabela 5 – Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Imuno-Rápido HCV com amostras de sangue total.

Medida de Desempenho	Imuno-Rápido HCV Amostras de Sangue Total	IC 95%
Sensibilidade Clínica	100,0%	(100,0%,100,0%)
Especificidade Clínica	100,0%	(100,0%,100,0%)
Valor Preditivo Positivo	100,0%	(100,0%,100,0%)
Valor Preditivo Negativo	100,0%	(100,0%,100,0%)

4.2.3. Análise de sensibilidade clínica e especificidade clínica do kit Comercial A.

Foram considerados os resultados obtidos com o padrão ouro como referencial para determinar se as amostras eram verdadeiramente positivas ou verdadeiramente negativas para os kits imunocromatográficos rápidos em avaliação. Os resultados observados nessa análise estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação da sensibilidade e especificidade clínicas do kit Comercial A para detecção de anticorpos anti-HCV utilizando-se a técnica de ELISA como referência.

Comercial A	ELISA (padrão ouro)		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	69	0	69
Não Reagente	0	314	314
Total	69	314	383

O kit Comercial A foi capaz de identificar corretamente todas as amostras avaliadas de acordo com o padrão ouro, retornando valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN iguais a 100% (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores calculados de sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o kit Comercial A.

<i>Kit Comercial A</i>	
Sensibilidade Clínica	100,0% (100,0%,100,0%)
Especificidade Clínica	100,0% (100,0%,100,0%)
Valor Preditivo Positivo	100,0% (100,0%,100,0%)
Valor Preditivo Negativo	100,0% (100,0%,100,0%)

4.2.4. Comparação entre o *kit* Imuno-Rápido HCV e o *kit* Comercial A

A comparação de desempenho do *kit* Imuno-Rápido HCV em relação ao *kit* Comercial A apresentou os resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparativo de desempenho apresentado pelos *kits* Imuno-Rápido HCV e Comercial A.

<i>Comercial A</i>	Imuno-Rápido HCV		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	69	0	69
Não Reagente	1	313	314
Total	70	313	383

O teste comparativo de desempenho entre os *kits* Imuno-Rápido HCV e Comercial A apresentou concordância de 99,7% e índice *kappa* 0,991 (IC 95%) segundo método descrito por Cohen (1960). Este índice é uma medida de concordância que reflete o quanto as observações se afastam do esperado e é apresentado em valores que variam de “menos 1” a “mais 1”. Quanto menor o valor apresentado, maior é a discordância entre observado e esperado. A Tabela 9 apresenta os valores de *kappa* e suas respectivas interpretações (LANDIS e KOCH, 1977; ANDRADE e ZICKER, 1997).

Tabela 9: Valores de índice *kappa* e suas interpretações.

Valor de <i>kappa</i>	Nível de concordância
<0,00	Não existe concordância
0,00 – 0,20	Concordância mínima
0,21 – 0,40	Concordância razoável
0,41 – 0,60	Concordância moderada
0,61 – 0,80	Concordância substancial
0,81 – 1,00	Concordância perfeita

Fonte: Adaptado de LANDIS e KOCH (1977).

Dessa forma, os *kits* Imuno-Rápido HCV e *Comercial A* apresentaram perfeita concordância.

4.2.5. Análise de Repetibilidade

Os testes foram realizados seguindo os procedimentos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.7 de Materiais e Métodos. Foram avaliadas dez repetições para cinco amostras reagentes e cinco amostras não reagentes para anticorpos anti-HCV pertencentes ao PNCQ. Todas as repetições foram executadas mantendo-se o operador, dia, lote e pipeta.

Tabela 10 - Resultado do teste de repetibilidade do kit Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica).

Amostra	Resultado ELISA	Repetição									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AHCV0672	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BSI1/MR05	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AHCV0272	R	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}
AHCV0480	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
HCV0370	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AHCV0114	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AHCV0150	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI1/MNR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI2/MRN	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI3/MNR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Nota: NR = Não reagente; R = Reagente; R_{fraco} = Fracamente reagente

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, o *kit* Imuno-Rápido HCV repetiu seu desempenho de forma satisfatória para todas as amostras analisadas, não sendo

observadas alterações em intensidade de sinal das linhas resultantes mesmo em casos de amostras fracamente reagente.

4.2.6. Análise de Reprodutibilidade

A avaliação da reprodutibilidade do *kit* Imuno-Rápido HCV foi realizada de acordo com os procedimentos descritos em 3.2.3 e 3.2.8 de Materiais e Métodos e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultado do teste de reprodutibilidade do kit Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica).

Amostra	Resultado ELISA	Operador 1 – Dia 1			Operador 2 – Dia 2			Operador 3 – Dia 2		
		Lote	Lote	Lote	Lote	Lote	Lote	Lote	Lote	Lote
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
AHCV0114	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AHCV0150	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI1/MNR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI2/MRN	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BSI3/MNR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AHCV0672	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BSI1/MR05	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AHCV0272	R	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}
AHCV0480	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
HCV0370	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Nota: NR = Não reagente; R = Reagente; R_{fraco} = Fracamente reagente

Todas as repetições realizadas sob todas as condições testadas apresentaram concordância em seus resultados, dessa forma o *kit* Imuno-Rápido HCV mostrou-se capaz de reproduzir seu desempenho de forma satisfatória ainda que alteradas as condições de realização do teste.

4.2.7. Análise de Estabilidade

4.2.7.1. Análise de Estabilidade Acelerada

A estabilidade acelerada foi analisada de acordo com a experiência prévia de estudos realizados pelo setor de Controle de Qualidade (CQ) da empresa WAMA Diagnóstica para todos os produtos comercializados pertencentes a linha Imuno-Rápido, onde a degradação do *kit* e seu decaimento equivalente ao tempo de 18 meses de fabricação podem ser simulados através de estresse de temperatura (incubação a 56°C durante três dias).

Tabela 12 – Resultado do estudo de estabilidade acelerada

Amostra	Resultado ELISA	Kit Controle (2 – 30°C)	Kit 3º dia a 56°C
AHCV0672	R	R	R
AHCV0272	R	R _{fraco}	R _{fraco}
AHCV0150	NR	NR	NR

Nota: NR = Não reagente; R = Reagente; R_{fraco} = Fracamente reagente

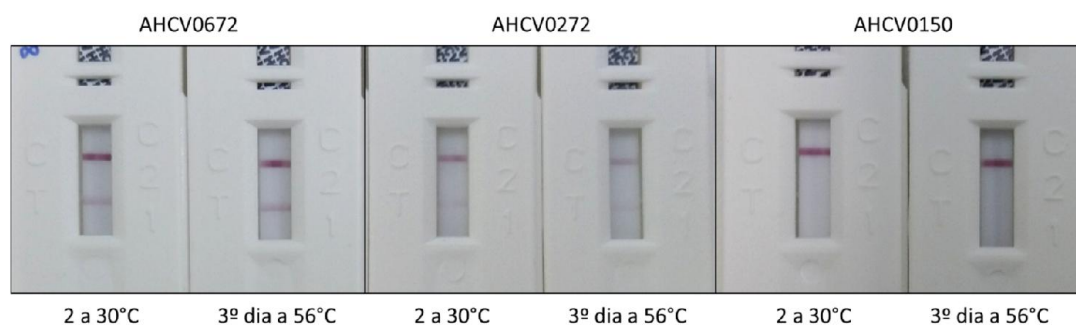


Figura 10: Resultado do teste de estabilidade acelerada utilizando três amostras do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) com diferentes reatividades para anticorpos anti-HCV (sendo AHCV0672 reagente, AHCV0272 fracamente reagente e AHCV0150). À direita de cada amostra está o teste com o kit mantido sob condições ideais de armazenamento (2 a 30°C) e à esquerda de cada amostra está o teste com o kit mantido sob estresse de temperatura por 3 dias.

Fonte: Autora.

Como esperado, foi observada a diminuição da intensidade de sinal das bandas teste e controle dos testes submetidos ao estresse de temperatura. Entretanto, como pode ser observado na Tabela 12 e na Figura 10, não houve alteração na leitura dos resultados obtidos com o produto armazenado sob condições ideais e sob estresse de temperatura, visto que amostras não

reagentes e reagentes continuaram a apresentar resultados negativos e positivos, respectivamente. Tal resultado sugere que o *kit* Imuno-Rápido HCV é estável por pelo menos 18 meses.

4.2.7.2. Análise de Estabilidade em Tempo Real (Parcial)

O teste de estabilidade em tempo real tem a finalidade de avaliar o tempo mínimo pelo qual o produto é capaz de manter seu funcionamento adequado. Os testes foram executados seguindo o protocolo descrito no item 3.2.3 da seção de Materiais e Métodos utilizando três amostras do PNCQ em placas testes após um dia de fabricação e repetidos mensalmente durante 8 meses. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11 e na Tabela 13.

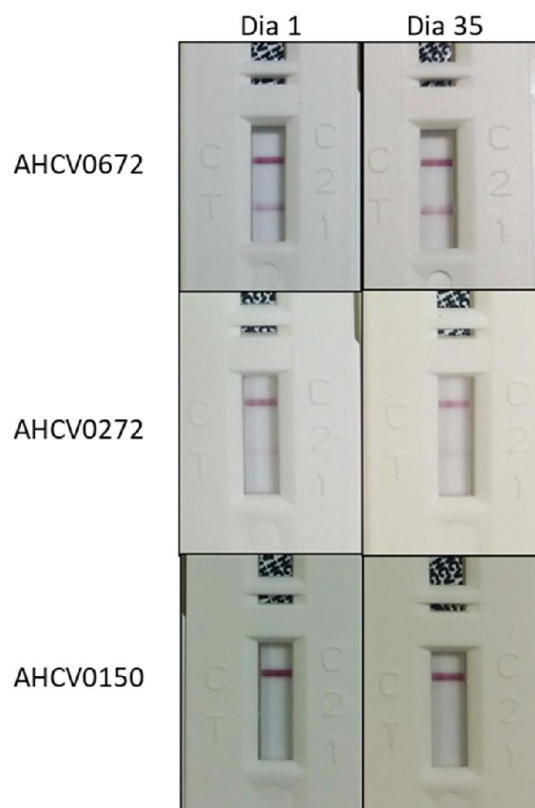


Figura 11: Resultado do teste de estabilidade em tempo real (parcial) utilizando três amostras do PNCQ com diferentes reatividades para anticorpos anti-HCV (sendo AHCV0672 reagente, AHCV0272 fracamente reagente e AHCV0150 não reagente). A esquerda de cada amostra está o teste realizado no primeiro dia após a fabricação do kit e à direita está o teste realizado com 35 dias de fabricação.

Fonte: Autora.

Tabela 13 – Resultado do estudo de estabilidade em tempo real (parcial).

Amostra	Resultado ELISA	Mês									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
AHCV0672	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AHCV0272	R	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}	R _{fraco}
AHCV0150	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Nota: NR = Não reagente; R = Reagente; R_{fraco} = Fracamente reagente

Não foi observada nenhuma alteração de resultado entre os testes que indicasse decaimento no funcionamento do produto com 8 meses, demonstrando assim, sua estabilidade garantida dentro desse período. O estudo de estabilidade em tempo real deverá ser continuado por no mínimo 18 meses (validade do produto).

4.2.8. Análise de Interferentes

Foram testadas amostras e/ou controles comerciais com diagnóstico conhecido para Hepatite C e sabidamente positivos para HIV, Hepatite B, Dengue ou Fator Reumatoide (FR) a fim de avaliar se essas situações podem interferir no resultado do teste. Além dessas amostras, também foram avaliadas amostras de gestantes, amostras lipêmicas e hemolisadas com o mesmo objetivo. A síntese dos resultados obtidos é apresentada pelo Quadro 2.

Característica da Amostra	Histórico HCV	Resultado Imuno-Rápido HCV
HIV Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HIV Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HIV Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HIV Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HIV Reagente	Não Reagente	Não Reagente
Gestante	Não Reagente	Não Reagente
Gestante	Não Reagente	Sombra

Gestante	Não Reagente	Não Reagente
Gestante	Não Reagente	Não Reagente
Gestante	Não Reagente	Não Reagente
Gestante	Não Reagente	Não Reagente
HBsAg Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HBsAg Reagente	Não Reagente	Não Reagente
HBsAg Reagente	Não Reagente	Não Reagente
Dengue Reagente	Não Reagente	Não Reagente
Dengue Reagente	Não Reagente	Não Reagente
Fator Reumatoide	Não Reagente	Não Reagente
Fator Reumatoide Reagente	Não Reagente	Não Reagente
Hemodiálise	Reagente	Reagente
Amostra hemolisada Reagente	Não Reagente	Não Reagente (membrana manchada)
Amostra hemolisada	Reagente	Reagente (membrana manchada)
Amostra hemolisada	Não Reagente	Não Reagente (membrana manchada)
Amostra hemolisada	Não Reagente	Não Reagente
Amostra lipêmica	Não Reagente	Não Reagente
Amostra lipêmica	Reagente	Reagente

Quadro 2 - Relação de interferentes avaliados e resultados observados.

Apenas uma amostra pertencente a uma paciente gestante e sabidamente não reagente para anticorpos anti-HCV apresentou resultado falso positivo (intensidade de banda baixa). Dentre as quatro amostras hemolisadas, três apresentaram escape de amostra para a janela de leitura, porém não apresentaram falso resultado.

Não foram observados falsos resultados para as demais condições analisadas.

5. DISCUSSÃO

A Hepatite C é uma doença geralmente silenciosa e assintomática, fazendo com que um grande número dos indivíduos desconheça o fato de albergar o vírus da Hepatite C (HCV) até que atinja um estágio avançado de doença hepática. Estima-se que entre 60 a 80% dos indivíduos infectados pelo HCV irão evoluir para um quadro de infecção crônica, onde o risco de desenvolvimento de cirrose hepática é de 15 a 30% em 20 anos. Dessa forma, o diagnóstico precoce é uma importante ferramenta de prevenção à problemas de saúde associados à Hepatite C e à transmissão do vírus (WHO, 2016).

Em um estudo comparativo entre as taxas de detecção da Hepatite C em populações de áreas urbanas e rurais da França, Monnet e colaboradores (2006) observaram que as taxas de detecção da Hepatite C eram menores em áreas rurais do que em áreas urbanas e eram reduzidas à medida que aumentava a distância entre paciente e atendimento médico, demonstrando o acesso geográfico como uma barreira para a realização do diagnóstico da Hepatite C. Além disso, observou-se também que o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular no diagnóstico da infecção era duas vezes maior em pacientes rurais do que em urbanos.

De acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde – Brasil) em 2018, a Hepatite C é a principal causa de óbitos associados às hepatites virais no país, sendo ainda a terceira maior causa de transplantes hepáticos. Entretanto, através da inclusão de novas terapias para o tratamento da Hepatite C no Sistema Único de Saúde (SUS), esse cenário tem sofrido alterações positivas. Objetivando dar continuidade aos avanços e melhorias na solução deste problema de saúde pública, o Brasil assinou o documento lançado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 intitulado “*Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021: Towards Ending Viral Hepatitis*” onde foram estabelecidas estratégias globais que visam a eliminação das hepatites virais da lista de problemas de saúde pública até o ano de 2030 por meio da simplificação do diagnóstico, ampliação da testagem e fortalecimento do atendimento e com isso, reduzir em 90% os novos casos e em 65% a mortalidade relacionada as hepatites virais (BRASIL, 2018).

Os testes diagnósticos rápidos (TDRs) representam uma atraente alternativa para a triagem e diagnóstico precoce da infecção pelo HCV, uma vez que podem ser apresentados na modalidade POC e em sua maioria possibilitam o uso de diferentes tipos de amostra como soro, plasma, sangue total por punção digital e saliva, por exemplo (CHEVALIEZ et al., 2016).

Os testes POC oferecem grandes vantagens como simplicidade na execução, dispensando a necessidade de equipe altamente treinada, tempo reduzido de leitura de resultado, armazenamento e uso em temperatura ambiente e possibilidade de realização de testes em áreas de difícil acesso e sem estrutura laboratorial (CHEVALIEZ et al, 2016; SHARAFI et al., 2019). Apesar de sua simplicidade, os TDRs possuem desempenho similar ou até mesmo superior aos métodos convencionais.

Durante a primeira fase deste estudo, buscou-se o desenvolvimento de um protótipo de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral com alto desempenho, capaz de auxiliar no diagnóstico precoce da Hepatite C. Foram definidos os elementos para composição do LFA, como membranas, cassete e reagentes de captura através de análises de desempenho e chegou-se a uma composição final selecionada para a validação com uma maior amostragem.

A segunda etapa objetivou a validação do protótipo alcançado do teste imunocromatográfico rápido para detecção de anticorpos anti-HCV, denominado Imuno-Rápido HCV. O desempenho deste *kit* foi comparado ao de um teste comercial de mesma metodologia, denominado neste estudo de *Comercial A*, e com a técnica padrão ouro, ELISA.

Para análise de sensibilidade e especificidade clínica do *kit* Imuno-Rápido HCV, foram testadas 383 amostras de soro e 75 amostras de sangue total. De acordo com os testes realizados, a sensibilidade e especificidade clínicas do *kit* Imuno-Rápido HCV para amostras de soro são 100% e 99,7%, respectivamente, enquanto que para as amostras de sangue total, o *kit* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. O valor preditivo positivo encontrado foi de 98,6%, indicando que a cada 100 testes positivos, 98,6 seriam de pacientes acometidos pela Hepatite C. Por outro lado, o valor preditivo negativo foi de 100,0%, isto é, a cada 100 testes negativos, 100 seriam de pacientes saudáveis.

Devido ao fato do *kit* Imuno-Rápido HCV detectar uma amostra não reagente como reagente, ou seja, um resultado falso positivo, o VPP foi inferior a 100%. Entretanto, considerando o valor total de amostra não reagentes testadas, acredita-se que o problema seja pontual desta amostra.

Em relação ao uso de amostras de sangue total, os valores de sensibilidade e especificidade clínicas, VPP e VPN encontrados foram diferentes dos valores para amostras de soro, entretanto, é importante ressaltar que a amostragem de sangue total foi realizada com um número menor de amostras devido a disponibilidade das mesmas. A amostra de sangue total correspondente ao mesmo paciente de origem da amostra de soro que apresentou resultado falso positivo não pode ser incluída nessa análise.

O *kit Comercial A* utilizado para comparação de desempenho com mesma metodologia apresentou valores de sensibilidade e especificidade clínicas, VPP e VPN de 100% (IC 95%). A concordância entre os dois *kits* imunocromatográficos rápidos foi de 99,7% e índice *kappa* 0,991 (IC 95%), demonstrando correlação perfeita entre seus resultados.

Outros autores realizaram estudos com o objetivo de avaliar o desempenho de testes do tipo LFA para o diagnóstico da Hepatite C. Na literatura, podem ser encontrados trabalhos como o de Mane e colaboradores (2019), onde foram avaliados cinco diferentes testes rápidos, encontrando o valor de especificidade de 100% para todos os *kits* e os valores de sensibilidade variaram de 86,2% a 99,4% quando comparados aos resultados obtidos com a metodologia ELISA. Em outro estudo, Chevaliez e colaboradores (2016) avaliaram três diferentes testes imunocromatográficos utilizando sangue total de punção digital como amostra, onde foi observado um alto valor de especificidade (>98,8%) para os três produtos, porém um deles apresentou baixa sensibilidade (63,1%) enquanto que para os demais os valores encontrados foram de 99,4% e 95,8%.

Em estudo publicado em 2013, Kant e colaboradores avaliaram um *kit* imunocromatográfico rápido para diagnóstico de Hepatite C com 189 amostras de soro, onde foram medidos os parâmetros de sensibilidade e especificidade (99% e 88%, respectivamente, em relação à metodologia ELISA), além disso, foi realizado um teste comparativo de desempenho utilizando 52 amostras de sangue total, no qual todos os resultados foram concordantes com o uso de soro como amostra. A mesma concordância foi observada no presente estudo, onde 75 amostras de sangue total e soro do mesmo paciente apresentaram os mesmos resultados, mostrando que o produto foi capaz de manter seu desempenho mesmo alterando a matriz da amostra.

As medidas de desempenho observadas para o Imuno-Rápido HCV são similares às descritas pelos autores anteriormente citados e encontram-se acima dos valores mínimos estabelecidos como critério de aceitação de desempenho de testes rápidos pela OMS (sensibilidade $\geq 98\%$; especificidade $\geq 97\%$) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (sensibilidade e especificidade $\geq 99,4\%$) (BRASIL, 2018b).

Durante as análises de repetibilidade e reprodutibilidade do *kit* Imuno-Rápido HCV, não foi observada nenhuma variação de resultado, apresentando resultados concordantes em 100% das execuções. Dessa forma, o protótipo apresenta potencial de se tornar um produto, pois estes resultados corroboram com a hipótese de que seu desempenho será mantido lote-a-lote e em diferentes situações de uso.

O *kit* Imuno-Rápido HCV manteve sua funcionalidade após estresse de temperatura por 72 horas para a placa teste e sete dias para o diluente de amostra, o que neste estudo corresponde a um tempo mínimo de 18 meses de validade. A análise de estabilidade em tempo real foi realizada pelo período parcial de 8 meses e não houve alteração de resultado que apontasse decaimento da funcionalidade do produto até o momento, indicando sua estabilidade. O teste de estabilidade em tempo real deverá ser continuado por pelo menos 18 meses, para que se confirme sua validade dentro desse período.

Durante as análises de interferentes, uma amostra pertencente a uma paciente gestante apresentou resultado falso positivo e não foi possível determinar a causa do resultado errôneo, entretanto, reações falso positivas em testes comerciais para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de mulheres grávidas também foram observadas por Zachary et al.(2005). Não foram observados resultados falsos para as amostras de Hepatite B, Dengue, Fator Reumatoide, paciente em hemodiálise ou amostras fora das condições ideais (lipêmicas ou hemolisadas). Sabe-se que indivíduos imunocomprometidos, como renais crônicos e portadores de HIV, podem ser incapazes de expressar anticorpos em níveis detectáveis mesmo quando acometidos por uma infecção crônica de HCV, ocasionando resultado falso negativo (CONSTANCIO, 2019). Lamentavelmente, não foi possível incluir neste estudo amostras pertencentes a pacientes com coinfeção HIV-HCV.

O protótipo Imuno-Rápido HCV desenvolvido apresentou um custo final bastante competitivo. Atualmente, a maioria dos LFA para detecção de anticorpos anti-HCV comercializados no Brasil é importada e o desenvolvimento de um produto nacional auxilia na ruptura da dependência de produtos estrangeiros e promove o avanço tecnológico e a entrada de empresas nacionais no mercado de forma competitiva.

Devido aos resultados obtidos até o momento neste estudo, acredita-se que o Imuno-Rápido HCV seja uma alternativa a ser aplicada na triagem sorológica da Hepatite C, pois apresentou ótimo desempenho e obtenção rápida de resultado, o que possibilita a discussão imediata do resultado do agente de saúde com o paciente, diminuindo a evasão de pacientes devido à necessidade de visitas de acompanhamento e promovendo a acessibilidade ao tratamento adequado.

6. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido, dentro de uma empresa brasileira, um teste rápido baseado em imunocromatografia de fluxo lateral que permite a detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro e sangue total sendo seu desempenho comparável ao de outros testes disponíveis comercialmente que utilizam mesma metodologia.

O Imuno-Rápido HCV apresentou bons valores de sensibilidade e especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade e boa estabilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTER, H. J. et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. **The Lancet**, v. 306, n. 7940, p.838-841, 1975.
- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F. **Métodos de investigação epidemiológicas em doenças transmissíveis**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, v. 1, 1997.
- BARBOSA, V.S.; SILVA, N. A.; MARTINS, R. M. B.. Soroprevalência e genótipos do vírus da hepatite C em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em Goiânia, Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 45, n.4, p. 201-205, 2005.
- BOSTAN, N.; MAHMOOD, T.. An overview about hepatitis C: A devastating virus. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p.91-133, 2010.
- BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A.; EMER, L. F..Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Rev Panam Salud Publica** . v. 9, n. 3, p.161-168, 2001.
- BRANSON, B.M. Point-of-care Rapid Tests for HIV Antibodies. **J Lab Med**, v. 27 (7/8), p. 288-295. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Teste Rápido - porque não? Estudos que contribuíram para a política de ampliação da testagem para o HIV no Brasil.** p. 29-30, 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2011/teste_rapido_pq_nao2_pdf_29374.pdf>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento /** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008. 60p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_virais_brasil_atento_3ed.pdf>. Acesso em: 08 de maio de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso**. 8ª ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 444p., 2010. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/janeiro/23/doen-infecciosas-guia-bolso-8ed.pdf>>. Acesso em: 06 de julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids**. Ano IV nº 1, 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2015>>. Acesso em: 15 de junho de 2019.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. Estabelece a classificação de risco, os regimes de controle de registro e cadastro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 164, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2018**. Ano VI nº 1, Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018>>. Acesso em: 25 de maio de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**, 2 eds. Brasília: Ministério da Saúde, 2018b. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/manual-tecnico-para-o-diagnostico-das-hepatites-virais-e-atualizado>>. Acesso em: 25 de maio de 2019.

CAMARGO, M.A. **Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico adotando como modelo o teste rápido para detecção do Hormônio Luteinizante (LH)**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res** , v. 38, n. 1, p.41-49, 2005.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, editor. **Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology**. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; Cap. 1. 2006.

CHEVALIEZ, S. et al. Prospective assessment of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus, a tool for improving access to care. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 22, n. 5, p. 459.e1–459.e6, 2016.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p.359-362, 1989.

COHEN, J. **A coefficient agreement for nominal scales**. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 37-46, 1960.

CONSTANCIO, N. S. et al . Hepatite C nas Unidades de Hemodiálise: diagnóstico e abordagem terapêutica. **J. Bras. Nefrol.** V.41,p. 1-11, 2019.

CONTE, V. P. Hepatite crônica por vírus C: Parte 1. Considerações gerais. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo , v. 37, n. 3, p. 187-193, 2000a .

CONTE, V. P. Hepatite crônica por vírus C. Parte 2. Tratamento. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 235-242, 2000b.

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.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Rev. bras. epidemiol**, v. 7, n. 4, p.473-487, 2004.

JOHN, A.S.; PRICE, C.P. Economic Evidence and Point-of-Care Testing. **Clin Biochem Rev**. v.34, p.61-74, 2013.

KANT, J. et al. Evaluation of a rapid on-site anti-HCV test as a screening tool for hepatitis C virus infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 25, n. 4, p. 416-420, 2013.

KHURROO, M. S.; KHURROO, N. S.; KHURROO, M. S. Diagnostic Accuracy of Point-of-Care Tests for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p.226-240, 2015.

KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays Biochem**, v. 60, n. 1, p. 111-120, 2016.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LOPES, C. L. R. et al. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev. Saúde Públ** , São Paulo , v. 43, supl.1, p. 43-50, 2009.

MANE, A. et al. Evaluation of five rapid diagnostic tests for detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV): A step towards scale-up of HCV screening efforts in India. **PLoS One**, v. 14, n. 1, 2019.

MANSFIELD, M. A. Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays: A Technical Treatise. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 95-113, 2009.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J.L.; SCHIAVON, L. L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 57, n. 1, p.107-112, 2011.

MELÃO, R; AGUIAR, Z.N; RIBEIRO, M.C.S. Hepatites Virais. In: AGUIAR, Z. N. / SOARES, M.C (Org.) **Vigilância e Controle das Doenças Transmissíveis**. 3ª edição. São Paulo: Martinari, p. 177-186, 2009.

MENEGHISSE, C. S. **Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e Produção de kit Imunodiagnóstico**. 2007. 159 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MILLIPORE. **Design Considerations for Lateral Flow Test Strips**. Estados Unidos, 2015.

MOHD, H.K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of agespecific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatol**, v. 57, n. 4, p. 1333–1342, 2013.

MONNET, E. et al. Place of residence and distance to medical care influence the diagnosis of hepatitis C: a population-based study. **J. Hepatol.**, v. 44, n. 3, p. 499–506, 2006.

NOUROZ, F. et al. An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. **Egypt. J. Med. Hum. Genet.**, v. 16, n. 4, p.291-298, 2015.

O’FARRELL, B. Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 1-2, 2009.

O'FARRELL, B. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In: WILD, D. G. (ed.). **The Immunoassay Handbook**. 4. ed. New York: Elsevier, cap. 2,4, p. 89-107, 2013.

PONCE, C. et al. Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. **J. of Clin. Microb.**, v. 43, p. 5065-5068, 2005.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 569-582, 2009.

SAJID, M.; KAWDE, A.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **J Saudi Chem Soc**, v. 19, n. 6, p.689-705, 2015.

SHARAFI, H. et al. Performance of a rapid diagnostic test for screening of Hepatitis C in a real-life prison setting. **J. Clin. Virol.**, v. 113, p. 20-23, 2019.

SHARMA, S. et al Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. **Biosensors**, v. 5, p. 577-601, 2015.

SILVA, L.K. et al. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 5, p. 595-602, 2006

SILVA, A. L. et al..Hepatitis virais: B, C e D: atualização. **Rev Bras de Clin Med**. v.10, p. 206-218, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. **Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil**. v. 88, p. 53-58, 1999.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v.34, n.1, 2001.

GLOBAL BURDEN OF HEPATITIS C WORKING GROUP. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, n. 1, p.20-29, 2004.

TOMEI, L. et al. HCV antiviral resistance: the impact of in vitro studies on the development of antiviral agents targeting the viral NS5B polymerase. **Antivir Chem Chemother.**, v. 16, p. 225-245, 2005.

WHO (World Health Organization). **Issuing updated guidelines for treatment of hepatitis C infection.** Barcelona, Spain, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/hepatitis/newsevents/hepatitis-c-guidelines-2016-story/en/>>. Acesso em: 15 de julho de 2019.

WHO (World Health Organization). Hepatitis C. **Fact Sheet Updated**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 15 de julho de 2019.

WHO (World Health Organization). Department of HIV/Aids. **Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection - Updated version, 2016.** Disponível em: <<https://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2016/en/>>. Acesso em: 28 de maio de 2019.

ZACHARY, P. et al. Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays under the conditions of a clinical virology laboratory. **J Clin Virol**, v. 34, n. 3, p.207-210, 2005.

8. APÊNDICE

APÊNDICE A – Resultados dos testes comparativos entre o protótipo desenvolvido, o padrão-ouro (ELISA) e um kit similar do mercado (*Comercial A*).

Amostra	Código de Registro	ELISA	<i>Comercial A</i>	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
1	PNCQ1	NR	NR	NR	N/A
2	PNCQ2	NR	NR	NR	N/A
3	PNCQ3	NR	NR	NR	N/A
4	PNCQ4	NR	NR	NR	N/A
5	PNCQ5	Reag	Reag	Reag	N/A
6	PNCQ6	NR	NR	NR	N/A
7	PNCQ7	Reag	Reag	Reag	N/A
8	PNCQ8	Reag	Reag	Reag	N/A
9	PNCQ9	Reag	Reag	Reag	N/A
10	PNCQ10	NR	NR	NR	N/A
11	PNCQ11	NR	NR	NR	N/A
12	PNCQ12	NR	NR	NR	N/A
13	PNCQ13	Reag	Reag	Reag	N/A
14	PNCQ14	Reag	Reag	Reag	N/A
15	PNCQ15	Reag	Reag	Reag	N/A
16	PNCQ16	Reag	Reag	Reag	N/A
17	PNCQ17	NR	NR	NR	N/A
18	PNCQ18	NR	NR	NR	N/A
19	PNCQ19	NR	NR	NR	N/A
20	PNCQ20	NR	NR	NR	N/A
21	PNCQ21	Reag	Reag	Reag	N/A
22	PNCQ22	NR	NR	NR	N/A
23	PNCQ23	NR	NR	NR	N/A
24	PNCQ24	NR	NR	NR	N/A
25	PNCQ25	NR	NR	NR	N/A
26	PNCQ26	Reag	Reag	Reag	N/A
27	PNCQ27	NR	NR	NR	N/A
28	PNCQ28	Reag	Reag	Reag	N/A
29	PNCQ29	Reag	Reag	Reag	N/A
30	PNCQ30	Reag	Reag	Reag	N/A
31	PNCQ31	NR	NR	NR	N/A
32	20054	NR	NR	NR	N/A
33	27173	NR	NR	NR	N/A
34	20067	NR	NR	NR	N/A
35	53171	Reag	Reag	Reag	N/A
36	118270	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
37	14524	NR	NR	NR	N/A
38	22109	NR	NR	Reag	N/A
39	20064	NR	NR	NR	N/A
40	165364	NR	NR	NR	N/A
41	22075	NR	NR	NR	N/A
42	57326	Reag	Reag	Reag	N/A
43	29013	NR	NR	NR	N/A
44	183370	NR	NR	NR	N/A
45	27010	NR	NR	NR	N/A
46	28551	NR	NR	NR	N/A
47	132121	NR	NR	NR	N/A
48	28016	NR	NR	NR	NR
49	24523	NR	NR	NR	N/A
50	21534	NR	NR	NR	N/A
51	20024	NR	NR	NR	N/A
52	54556	Reag	Reag	Reag	N/A
53	104419	NR	NR	NR	N/A
54	67022	Reag	Reag	Reag	N/A
55	194451	NR	NR	NR	N/A
56	79488	Reag	Reag	Reag	N/A
57	26634	NR	NR	NR	N/A
58	22001	NR	NR	NR	N/A
59	18751	NR	NR	NR	N/A
60	33779	Reag	Reag	Reag	N/A
61	22087	NR	NR	NR	N/A
62	20005	NR	NR	NR	N/A
63	22047	NR	NR	NR	N/A
64	20021	NR	NR	NR	N/A
65	20041	NR	NR	NR	N/A
66	28065	NR	NR	NR	N/A
67	27014	NR	NR	NR	N/A
68	105804	NR	NR	NR	N/A
69	22076	NR	NR	NR	N/A
70	32394	Reag	Reag	Reag	N/A
71	31009	NR	NR	NR	NR
72	130736	NR	NR	NR	NR
73	28050	NR	NR	NR	N/A
74	20052	NR	NR	NR	NR
75	20018	NR	NR	NR	NR
76	22048	NR	NR	NR	NR
77	136277	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
78	121041	NR	NR	NR	N/A
79	163979	NR	NR	NR	N/A
80	20458	NR	NR	NR	N/A
81	29002	NR	NR	NR	N/A
82	15321	NR	NR	NR	N/A
83	202761	NR	NR	NR	NR
84	125196	NR	NR	NR	NR
85	26301	NR	NR	NR	NR
86	76717	Reag	Reag	Reag	N/A
87	28551	NR	NR	NR	N/A
88	176445	NR	NR	NR	N/A
89	22036	NR	NR	NR	N/A
90	145972	NR	NR	NR	N/A
91	26054	NR	NR	NR	NR
92	20047	NR	NR	NR	NR
93	22058	NR	NR	NR	N/A
94	27027	NR	NR	NR	NR
95	22163	NR	NR	NR	NR
96	20063	NR	NR	NR	N/A
97	29006	NR	NR	NR	NR
98	187525	Reag	Reag	Reag	N/A
99	22141	NR	NR	NR	N/A
100	20064	NR	NR	NR	N/A
101	20060	Reag	Reag	Reag	N/A
102	35164	NR	NR	NR	N/A
103	37935	Reag	Reag	Reag	N/A
104	75332	NR	NR	NR	N/A
105	20045	Reag	Reag	Reag	N/A
106	20010	NR	NR	NR	N/A
107	20007	NR	NR	NR	N/A
108	173674	NR	NR	NR	N/A
109	20070	NR	NR	NR	N/A
110	20058	Reag	Reag	Reag	N/A
111	22011	NR	NR	NR	N/A
112	27175	NR	NR	NR	N/A
113	210013	NR	NR	NR	N/A
114	26854	Reag	Reag	Reag	N/A
115	20037	NR	NR	NR	N/A
116	20062	NR	NR	NR	N/A
117	20051	NR	NR	NR	N/A
118	29009	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
119	97494	Reag	Reag	Reag	N/A
120	27035	NR	NR	NR	NR
121	16548	NR	NR	NR	NR
122	170904	NR	NR	NR	NR
123	28551	NR	NR	NR	N/A
124	205532	NR	NR	NR	N/A
125	20014	Reag	Reag	Reag	N/A
126	216612	NR	NR	NR	N/A
127	15847	NR	NR	NR	N/A
128	161208	NR	NR	NR	N/A
129	20025	NR	NR	NR	N/A
130	20008	NR	NR	NR	N/A
131	20044	NR	NR	NR	N/A
132	198606	NR	NR	NR	N/A
133	22051	NR	NR	NR	NR
134	28551	NR	NR	NR	N/A
135	22022	NR	NR	NR	NR
136	152898	NR	NR	NR	N/A
137	26087	NR	NR	NR	NR
138	188910	NR	NR	NR	NR
139	22051	NR	NR	NR	NR
140	119655	NR	NR	NR	N/A
141	26348	NR	NR	NR	N/A
142	22023	NR	NR	NR	N/A
143	22108	Reag	Reag	Reag	N/A
144	22125	NR	NR	NR	N/A
145	22082	NR	NR	NR	NR
146	22029	NR	NR	NR	NR
147	22061	NR	NR	NR	N/A
148	22083	NR	NR	NR	N/A
149	186140	NR	NR	NR	N/A
150	15645	NR	NR	NR	N/A
151	22062	NR	NR	NR	N/A
152	29015	NR	NR	NR	N/A
153	42090	Reag	Reag	Reag	N/A
154	72562	Reag	Reag	Reag	N/A
155	22032	NR	NR	NR	N/A
156	22064	NR	NR	NR	N/A
157	55941	Reag	Reag	Reag	N/A
158	191681	NR	NR	NR	N/A
159	212457	NR	NR	NR	NR

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
160	137662	NR	NR	NR	NR
161	134892	NR	NR	NR	N/A
162	193066	NR	NR	NR	N/A
163	139047	NR	NR	NR	NR
164	22028	NR	NR	NR	NR
165	86413	Reag	Reag	Reag	N/A
166	20026	NR	NR	NR	N/A
167	94724	Reag	Reag	Reag	N/A
168	27005	NR	NR	NR	N/A
169	20032	NR	NR	NR	NR
170	20036	NR	NR	NR	NR
171	27002	NR	NR	NR	NR
172	40705	Reag	Reag	Reag	N/A
173	22084	NR	NR	NR	N/A
174	22005	NR	NR	NR	N/A
175	208302	NR	NR	NR	N/A
176	29008	NR	NR	NR	N/A
177	19874	NR	NR	NR	N/A
178	22031	NR	NR	NR	N/A
179	20076	NR	NR	NR	N/A
180	22043	NR	NR	NR	N/A
181	29005	NR	NR	NR	N/A
182	116885	Reag	Reag	Reag	N/A
183	20356	NR	NR	NR	N/A
184	159823	NR	NR	NR	N/A
185	25527	NR	NR	NR	N/A
186	29009	NR	NR	NR	N/A
187	22053	NR	NR	NR	N/A
188	22094	NR	NR	NR	N/A
189	14583	NR	NR	NR	N/A
190	29002	NR	NR	NR	N/A
191	27172	Reag	Reag	Reag	N/A
192	27017	NR	NR	NR	N/A
193	22166	NR	NR	NR	N/A
194	20016	NR	NR	NR	N/A
195	93339	Reag	Reag	Reag	N/A
196	51786	Reag	Reag	Reag	N/A
197	22025	NR	NR	NR	N/A
198	190295	NR	NR	NR	NR
199	22056	NR	NR	NR	N/A
200	29004	NR	NR	NR	NR

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
201	28554	NR	NR	NR	NR
202	22085	NR	NR	NR	N/A
203	108575	NR	NR	NR	N/A
204	20039	Reag	Reag	Reag	N/A
205	18955	NR	NR	NR	N/A
206	22024	NR	NR	NR	N/A
207	22104	NR	NR	NR	N/A
208	20065	NR	NR	NR	N/A
209	29624	Reag	Reag	Reag	N/A
210	20030	NR	NR	NR	N/A
211	27015	Reag	Reag	Reag	N/A
212	17965	NR	NR	NR	N/A
213	19643	NR	NR	NR	N/A
214	28239	Reag	Reag	Reag	N/A
215	20554	NR	NR	NR	N/A
216	20069	NR	NR	NR	N/A
217	13546	NR	NR	NR	N/A
218	141817	NR	NR	NR	N/A
219	22081	Reag	Reag	Reag	N/A
220	22134	NR	NR	NR	N/A
221	140432	NR	NR	NR	NR
222	22018	NR	NR	NR	NR
223	27018	NR	NR	NR	NR
224	20055	NR	NR	NR	NR
225	215227	NR	NR	NR	N/A
226	211072	NR	NR	NR	NR
227	22123	NR	NR	NR	NR
228	22074	NR	NR	NR	NR
229	151513	NR	NR	NR	NR
230	22117	NR	NR	NR	N/A
231	22053	NR	NR	NR	N/A
232	80873	Reag	Reag	Reag	N/A
233	20009	NR	NR	NR	N/A
234	181985	NR	NR	NR	N/A
235	147357	NR	NR	NR	N/A
236	22086	NR	NR	NR	N/A
237	27020	NR	NR	NR	N/A
238	20050	NR	NR	NR	N/A
239	22078	NR	NR	NR	N/A
240	22026	NR	NR	NR	N/A
241	22064	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
242	22072	NR	NR	NR	N/A
243	168134	NR	NR	NR	N/A
244	98879	Reag	Reag	Reag	N/A
245	27170	NR	NR	NR	N/A
246	22086	NR	NR	NR	N/A
247	129351	NR	NR	NR	N/A
248	123811	Reag	Reag	Reag	N/A
249	22059	NR	NR	NR	NR
250	22067	NR	NR	NR	NR
251	126581	NR	NR	NR	NR
252	22072	NR	NR	NR	NR
253	20027	NR	NR	NR	NR
254	111345	NR	NR	NR	NR
255	20028	NR	NR	NR	NR
256	22009	NR	NR	NR	NR
257	29007	NR	NR	NR	NR
258	184755	NR	NR	NR	NR
259	22013	NR	NR	NR	NR
260	20029	NR	NR	NR	NR
261	22083	NR	NR	NR	NR
262	204146	NR	NR	NR	NR
263	22010	NR	NR	NR	NR
264	61481	Reag	Reag	Reag	N/A
265	22033	NR	NR	NR	N/A
266	68407	Reag	Reag	Reag	N/A
267	17936	NR	NR	NR	N/A
268	90568	Reag	Reag	Reag	N/A
269	27019	NR	NR	NR	N/A
270	13256	NR	NR	NR	N/A
271	28551	NR	NR	NR	N/A
272	179215	NR	NR	NR	N/A
273	201376	NR	NR	NR	N/A
274	83643	Reag	Reag	Reag	N/A
275	22003	NR	NR	NR	N/A
276	27172	NR	NR	NR	N/A
277	20066	NR	NR	NR	N/A
278	19996	NR	NR	NR	N/A
279	180600	NR	NR	NR	N/A
280	28064	NR	NR	NR	N/A
281	69792	Reag	Reag	Reag	N/A
282	20011	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
283	29015	NR	NR	NR	N/A
284	22073	NR	NR	NR	N/A
285	158438	NR	NR	NR	N/A
286	22027	NR	NR	NR	N/A
287	22082	NR	NR	NR	N/A
288	46245	Reag	Reag	Reag	N/A
289	175059	NR	NR	NR	N/A
290	20061	NR	NR	NR	N/A
291	89183	NR	NR	NR	N/A
292	27003	NR	NR	NR	N/A
293	20135	NR	NR	NR	N/A
294	144587	NR	NR	NR	N/A
295	20023	NR	NR	NR	N/A
296	26266	NR	NR	NR	N/A
297	122426	NR	NR	NR	N/A
298	23345	NR	NR	NR	N/A
299	169519	NR	NR	NR	N/A
300	12521	NR	NR	NR	N/A
301	22069	NR	NR	NR	N/A
302	22068	NR	NR	NR	N/A
303	148743	NR	NR	NR	N/A
304	22002	NR	NR	NR	N/A
305	58711	NR	NR	NR	N/A
306	22088	NR	NR	NR	N/A
307	65637	Reag	Reag	Reag	N/A
308	20020	NR	NR	NR	NR
309	20035	NR	NR	NR	NR
310	22051	NR	NR	NR	NR
311	20077	NR	NR	NR	NR
312	133506	NR	NR	NR	N/A
313	166749	NR	NR	NR	N/A
314	22176	NR	NR	NR	N/A
315	22096	NR	NR	NR	N/A
316	20054	NR	NR	NR	N/A
317	50400	NR	NR	NR	N/A
318	22081	Reag	Reag	Reag	N/A
319	36549	Reag	Reag	Reag	N/A
320	20034	NR	NR	NR	N/A
321	22006	NR	NR	NR	N/A
322	20071	NR	NR	NR	N/A
323	29004	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
324	22030	NR	NR	NR	N/A
325	107190	NR	NR	NR	N/A
326	96109	Reag	Reag	Reag	N/A
327	20043	NR	NR	NR	N/A
328	21563	NR	NR	NR	N/A
329	47630	Reag	Reag	Reag	N/A
330	21563	NR	NR	NR	N/A
331	197221	NR	NR	NR	NR
332	20033	NR	NR	NR	NR
333	28066	NR	NR	NR	NR
334	22070	NR	NR	NR	NR
335	20022	NR	NR	NR	NR
336	22084	NR	NR	NR	NR
337	17954	NR	NR	NR	N/A
338	78102	Reag	Reag	Reag	N/A
339	100264	NR	NR	NR	N/A
340	195836	NR	NR	NR	N/A
341	20017	NR	NR	NR	N/A
342	29011	NR	NR	NR	N/A
343	20006	NR	NR	NR	N/A
344	82258	Reag	Reag	Reag	N/A
345	22015	NR	NR	NR	N/A
346	12354	NR	NR	NR	N/A
347	44860	Reag	Reag	Reag	N/A
348	29015	NR	NR	NR	N/A
349	177830	NR	NR	NR	N/A
350	27170	Reag	Reag	Reag	N/A
351	150128	NR	NR	NR	NR
352	109960	NR	NR	NR	NR
353	22008	NR	NR	NR	NR
354	157053	NR	NR	NR	NR
355	155668	NR	NR	NR	NR
356	213842	NR	NR	NR	NR
357	87798	Reag	Reag	Reag	N/A
358	22053	NR	NR	NR	N/A
359	20013	NR	NR	NR	N/A
360	20045	NR	NR	NR	N/A
361	20056	NR	NR	NR	N/A
362	20015	NR	NR	NR	N/A
363	269714	Reag	Reag	Reag	N/A
364	20012	NR	NR	NR	N/A

Amostra	Código de Registro	ELISA	Comercial A	Imuno-Rápido HCV - Soro	Imuno-Rápido HCV – Sangue Total
365	22037	NR	NR	NR	N/A
366	20031	NR	NR	NR	N/A
367	22031	NR	NR	NR	N/A
368	27174	NR	NR	NR	N/A
369	172289	NR	NR	NR	N/A
370	71177	Reag	Reag	Reag	N/A
371	39320	NR	NR	NR	N/A
372	91953	NR	NR	NR	N/A
373	103034	NR	NR	NR	N/A
374	28553	Reag	Reag	Reag	N/A
375	22179	NR	NR	NR	N/A
376	20042	NR	NR	NR	NR
377	85028	Reag	Reag	Reag	N/A
378	22019	NR	NR	NR	N/A
379	22061	NR	NR	NR	N/A
380	115500	NR	NR	NR	N/A
381	60096	Reag	Reag	Reag	N/A
382	20060	NR	NR	NR	N/A
383	209687	NR	NR	NR	N/A

Nota: NR = Não reagente; Reag = Reagente; N/A = Não Aplicável

9. ANEXOS

ANEXO A – Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VALIDAÇÃO DE KIT IMUNOCROMATOGRAFICO RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C

Pesquisador: JESSICA CALDEIRA DE LIMA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 02937418.5.0000.5504

Instituição Proponente: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: WAMA PRODUTOS PARA LABORATORIO LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.284.045

Apresentação do Projeto:

Serão utilizadas amostras de sangue e soro de humanos e/ou controles comerciais para validação de kit de diagnóstico para o vírus da Hepatite C. As amostras de soro e sangue serão utilizadas em parceria com o laboratório de análises clínicas, mediante autorização do paciente voluntário por meio do preenchimento do TCLE e sem retenção de qualquer volume da amostra para estudos posteriores. Todas as amostras não terão identificação do paciente, todos seus dados estarão codificados e não estarão disponíveis para acesso aos pesquisadores desse projeto. Essas amostras de soro e sangue serão utilizadas para a validação do kit Imunocromatográfico para detecção de hepatite da marca WAMA Diagnóstica e com teste padrão ouro (ELISA) e teste comparativo com kit Imunocromatográfico disponível no mercado sob supervisão dos funcionários do laboratório e sem retenção das mesmas para estudos posteriores. Através desses resultados, estudaremos os valores de sensibilidade e especificidade do kit, bem como sua estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Realizar a validação de um teste Imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-Vírus da Hepatite C desenvolvido pela empresa WAMA Diagnóstica.

Objetivo Secundário: Avaliar a sensibilidade e especificidade clínicas do teste desenvolvido pela empresa WAMA Diagnóstica, bem como analisar interferentes do teste. Comparar os resultados

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
 Bairro: JARDIM GUANABARA CEP: 13.565-905
 UF: SP Município: SAO CARLOS
 Telefone: (16)3351-9683 E-mail: cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 3.284.046

obtidos do teste rápido com um teste ELISA e com um kit de diagnóstico rápido para Hepatite C disponível no mercado; Analisar a reprodutibilidade e repetibilidade do teste frente aos resultados obtidos utilizando o kit comercial; Analisar o desempenho do kit ao longo do tempo, realizando estudos de estabilidade em tempo real e acelerada do teste.

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São apresentados os riscos e benefícios de forma adequada.

 Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante para a área de pesquisa e trará grande contribuição.

 Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado possui os elementos necessários requeridos pela Resolução 466/2012.

 Recomendações:

Nada a declarar

 Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

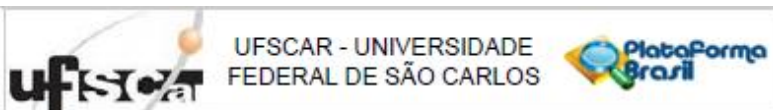
A versão atual do projeto contempla os questionamentos apresentados na versão anterior.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1212779.pdf	18/04/2019 20:30:30		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_COMPLETO.pdf	18/04/2019 20:23:27	JESSICA CALDEIRA DE LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autorizacao_labB.pdf	18/04/2019 20:22:57	JESSICA CALDEIRA DE LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_autorizacao_labM.pdf	18/04/2019 20:22:20	JESSICA CALDEIRA DE LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Modelo_de_TCLE.pdf	18/04/2019 20:21:54	JESSICA CALDEIRA DE LIMA	Aceito

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
 Bairro: JARDIM GUANABARA CEP: 13.565-905
 UF: SP Município: SÃO CARLOS
 Telefone: (16)3351-0683 E-mail: cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 3.284.048

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	27/10/2016 10:36:32	JESSICA CALDEIRA DE LIMA	Acelto
----------------	--------------------	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO CARLOS, 25 de Abril de 2019

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador(a))

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
 Bairro: JARDIM GUANABARA CEP: 13.565-905
 UF: SP Município: SAO CARLOS
 Telefone: (16)3351-0683 E-mail: cephumanos@ufscar.br