

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

MARIA ANGÉLICA DE CAMARGO

**Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico
adotando como modelo o teste rápido para detecção do Hormônio Luteinizante
(LH)**

SÃO CARLOS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico
adotando como modelo o teste rápido para detecção do Hormônio Luteinizante
(LH)**

Maria Angélica de Camargo

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

Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Mestriner

**São Carlos
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C172md

Camargo, Maria Angélica de.

Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico adotando como modelo o teste rápido para detecção do hormônio luteinizante (LH) / Maria Angélica de Camargo. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 147 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Imunologia. 2. Hormônio luteinizante. 3. Teste rápido. 4. Metodologia. 5. Desenvolvimento de produtos. I. Título.

CDD: 616.079 (20ª)



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 Maria Angélica de Camargo, realizada em 22/05/2015:

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
USP

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar

Profa. Dra. Simone Kashima Haddad
USP

À minha mãe, Rosa, que soube o valor da educação e incentivou os filhos a buscarem o conhecimento. Que sabiamente me guiou e me orientou a trilhar meus caminhos através de seu amor, conselhos e orações.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente nas horas de alegria e também naquelas obscuras, onde não conseguimos enxergar com clareza o caminho a seguir, mas depois de um tempo isso se torna claro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann, por ter acreditado e me apoiado nesse projeto, que foge um pouco dos moldes tradicionais.

Ao meu co-orientador, Dr. Carlos Alberto Mestriner, grande incentivador da ciência, que guiou meus passos nesses cinco anos de pesquisa em empresa, pelo conhecimento adquirido e pela amizade.

Ao meu companheiro de vida, William Barcellos, que me apoiou em todos os projetos, que me consolou nas horas mais difíceis, que resolve todos os meus problemas e que me mostrou que a vida é mais simples do que eu faço parecer. Pelo amor, confiança, paciência e compreensão a mim dedicados em todos esses anos.

À minha família, por serem a base de tudo, por me dar suporte em fases cruciais, tornando possível esse momento.

Aos meus sogros, Heleusa e Robson, por me acolherem em sua família e por me apoiarem em meus projetos.

Ao presidente da WAMA, Dr. Wagner Maricondi, e ao gestor comercial, João Carlos Montagnini Jr., profissionais exemplares e líderes por vocação, pelas várias oportunidades oferecidas, pela confiança em mim depositada, pelos conselhos recebidos e pela amizade.

À equipe de pesquisa da WAMA, Lygia, Maria Isabel, Jéssica, Daisy (não mais na equipe, mas sempre presente) e Amarildo, pelas risadas nos momentos de descontração, muitas vezes acompanhados de queijo e cerveja; e pelo apoio em horas difíceis, ouvindo as lamentações ou trabalhando até tarde. Um agradecimento especial à Lygia, cujo trabalho foi essencial no desenvolvimento desse projeto.

Às “meninas do Rápido”, em especial à Roseli, Tia Vânia (também não mais na equipe, mas presente de coração), Josi, Neusinha e Bernadete, pelo incentivo e ajuda nos projetos e pela amizade.

Às AmaZonas e AmaZonos, Flávia, Biscoito, Dani, Lixia, Tchuco (e tchuquinhas Helena e Beatriz), Ana Cláudia, Jú, Vital, Keila, Google, Alícia e Rapha,

pelos melhores anos da minha vida. Obrigada por fazerem parte da minha vida e por compartilharem a vida de vocês comigo.

Aos meus “filhos”, Pretinho e Amy, pelo amor incondicional e por tornarem a vida tão mais leve e simples.

Às minhas amigas de infância, Jenifer e Tina, pela amizade, cumplicidade e pelos momentos de descontração, onde é possível esquecer os problemas do cotidiano e dar boas risadas.

A todos os funcionários da WAMA Diagnóstica, pelo apoio recebido, pelas palavras de motivação e pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto, meu muito obrigada!

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido.”

Albert Einstein

RESUMO

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) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

Apesar do mercado de testes rápidos no Brasil se encontrar em franca expansão, o país ainda não possui a tradição de fabricação desses kits. Por esse motivo é muito difícil encontrar na literatura nacional relatos que norteiem o processo de desenvolvimento. O problema é agravado devido à dificuldade de compreensão e subjetividade das normas e legislações que regulamentam o setor. O objetivo deste trabalho foi descrever a metodologia para o desenvolvimento e validação de um kit diagnóstico seguindo as normas vigentes. Para isso, tomou-se como modelo um kit autodiagnóstico para detecção do Hormônio Luteinizante (LH), semi-quantitativo, utilizando a plataforma de teste rápido e descreveram-se todos os procedimentos requeridos nas etapas de concepção do produto, desde o planejamento, desenvolvimento e validação. O kit desenvolvido atendeu a todos os requisitos de funcionamento estabelecidos e apresentou 97,39% de sensibilidade e 97,92% de especificidade. Os testes de reação cruzada mostraram que o teste sofre interferência de amostras contendo hCG devido à alta similaridade das cadeias β dos hormônios. Apesar disso, o desempenho do teste foi melhor que o kit disponível hoje no mercado. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os procedimentos apresentados seguindo as normas de gestão da ISO 9001:2008 e da ISO 13485:2004 e as boas práticas de fabricação da RDC 16 de 2013 foram eficazes para a obtenção do kit e poderão servir como um modelo para a gestão e desenvolvimento de novos projetos similares em empresas do ramo diagnóstico.

Palavras chave: Hormônio Luteinizante, LH, teste rápido, metodologia de desenvolvimento

ABSTRACT

CAMARGO, M. A. **Development and validation methodology of an immunoassay kit using a rapid test for Luteinizing Hormone (LH) as model.** 2015. 147 f. M. Sc. Thesis – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

Despite the rapid tests market in Brazil being in full expansion, the country does not have a tradition of manufacturing these kits. Therefore, it is very difficult to find, in the national literature, reports to guide the development process of these kits. The lack of published reports is aggravated by the difficulty of understanding the rules and laws governing the sector and by their subjectivity. The aim of this study was to describe a methodology to develop and validate a diagnostic kit, according to prevailing regulations. For this, a self-diagnostic semiquantitative kit for detection of Luteinizing Hormone (LH), using the rapid test platform, was taken as a model and all the procedures required in each stage of the design of the product, including planning, development and validation, have been described. The kit developed complied with all established operating requirements and achieved 97.39% sensitivity and 97.92% specificity. The cross-reaction tests showed that the kit suffers interference from samples containing hCG, due to the high similarity of beta chains of the hormones. Despite this fact, the performance of the test was better than the performance of the kit available in the market today. Based on the results obtained, we conclude that the procedures presented, which comply with the management standards ISO 9001:2008 and ISO 13485:2004 and also with the Good Manufacturing Practices of the RDC 16/2013, were effective in obtaining the kit and may be used as a model for management and development of similar projects within companies operating in the diagnostic market.

Keywords: Luteinizing Hormone, LH, rapid test, development methodology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da composição da tira teste (O'FARRELL, 2013).	21
Figura 2 - Estrutura da placa montada mostrando a sobreposição das diversas membranas.	58
Figura 3 - Placa montada com os adesivos de identificação.	83
Figura 4 - Modelo de rótulo externo do produto.....	85
Figura 5 - Modelo de rótulo interno do produto.....	85
Figura 6 - Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas no estudo de validação do kit Imuno-rápido LH.....	89
Figura 7 - Resultado dos testes de sensibilidade do lote 001-P mostrando um aumento crescente na intensidade da banda teste. O cut-off do teste pode ser visto nas amostras 13 e 14.....	92
Figura 8 - Teste com tiras de LH utilizando amostra de urina proveniente de paciente grávida para análise de reação cruzada entre LH e hCG. 1 – Teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.), 2 – Teste IMUNO-RÁPIDO LH (WAMA).	101
Figura 9 - Alinhamento da sequência de aminoácidos dos hormônios LH e hCG mostrando a alta similaridade entre as cadeias.	102
Figura 10 - Protótipo do kit Imuno-Rápido LH mostrando os principais componentes: sachês de alumínio contendo as tiras imunocromatográficas, tiras teste e frascos coletores de urina.....	106
Figura 11 - Etapas do processo de desenvolvimento de um kit de diagnóstico in vitro (MENEGHISSE, 2007).	109
Figura 12 - Estrutura geral do processo de fabricação do teste imunocromatográfico (O'FARRELL, 2013).	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perigos e Ações Recomendadas levantados durante o Gerenciamento de Risco do teste rápido LH.	75
Tabela 2 - Combinações de anticorpos e conjugado testadas com as membranas A, B, C e D. A melhor combinação de cada membrana se encontra em negrito e o resultado de tal combinação com amostras de baixa, média e alta concentração se encontra no final de cada tabela.	78
Tabela 3 - Legenda dos símbolos utilizados nos rótulos.	86
Tabela 4 - Análise de sensibilidade e especificidade comparando-se o protótipo desenvolvido e o teste padrão-ouro (quimioluminescência).....	90
Tabela 5 - Teste de sensibilidade analítica utilizando padrões diluídos.....	91
Tabela 6 - Resultados do estudo comparativo de desempenho com kit comercial...	93
Tabela 7 - Escala de concordância do Kappa.....	94
Tabela 8 - Análise de sensibilidade e especificidade comparando-se o kit comercial CONFIRME FERTILIDADE e o teste padrão-ouro (quimioluminescência).	95
Tabela 9 - Resultados da análise de reprodutibilidade do kit para detecção de LH..	96
Tabela 10 - Resultados do teste de repetibilidade utilizando 5 amostras diferentes.	98
Tabela 11 - Análise de reação cruzada frente a amostras com alta concentração de FSH, TSH e hCG.....	99
Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade acelerada.	103
Tabela 13 - Comparação das análises de sensibilidade e especificidade entre os kits desenvolvido e o comercial.	112

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BSI: “*The British Standards Institution*” (empresa de auditoria e certificação)
- CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CE: Conformidade Européia
- CG: “*Chorionic gonadotrophin*” (gonadotrofina coriônica)
- C-terminal: Carboxi-terminal
- CV: Coeficiente de Variação
- D.O.: Medida de Absorbância (em densidade óptica)
- DNA: “*Deoxyribonucleic acid*” (ácido desoxirribonucléico)
- ELISA: “*Enzyme Linked Immunossorbent Assay*”
- FSH: “*Follicle Stimulating Hormone*” (hormônio folículo estimulante)
- GMP: “*Good Manufacturing Practices*”
- GnRH: “*Gonadotropin Releasing Hormone*” (hormônio liberador de gonadotrofina)
- hCG: “*human Chorionic Gonadotropin*” (gonadotrofina coriônica humana)
- HIV: “*Human Immunodeficiency Virus*” (vírus da imunodeficiência humana)
- IC: Intervalo de confiança
- IgG: Imunoglobulina G
- IgM: Imunoglobulina M
- INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial
- Internet: Rede mundial de computadores
- ISO: “*International Organization for Standardization*” (Organização Internacional para Padronização)
- IVD: “*in vitro diagnostics*” (diagnóstico *in vitro*)
- LH: “*Luteinizing Hormone*” (hormônio luteinizante)
- MDI: *Advanced Microdevices*
- MEDDEV: Guia de classificação de equipamentos médicos
- MIL STD-Q-9858: Especificação utilizada pelo Departamento de Defesa dos Estados Unidos
- MS Project: “*Microsoft Project*” (programa utilizado para gestão de projetos)
- NBR: Norma brasileira
- OTAN: Organização do Tratado do Atlântico Norte (organização militar)

p24: proteína do capsídeo viral do HIV

PBS: "*Phosphate Buffered Saline*" (tampão fosfato-salino)

pH: potencial Hidrogeniônico

PMBOK: "*Project Management Body of Knowledge*" (guia para gestão de projetos)

PVC: Policloreto de vinil

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RIA: Radioimunoensaio

RNA: "*Ribonucleic acid*" (ácido ribonucleico)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIR: Taxa Interna de Retorno

TRIS: tampão utilizado em técnicas bioquímicas

TSH: "*Thyroid Stimulating Hormone*" (hormônio tireoestimulante)

UI: Unidade Internacional

VPL: Valor Presente Líquido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Normatização para pesquisa e desenvolvimento	16
1.2. Teste Rápido	18
1.3. Hormônio Luteinizante	43
2. OBJETIVO	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Casuística	50
3.2. Planejamento do projeto	51
3.2.1. Requisitos de funcionamento do produto (dados de entrada do projeto)	51
3.2.2. Levantamento das matérias-primas e equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto	52
3.2.3. Análise de viabilidade econômica e financeira	52
3.2.4. Análise da viabilidade técnica	54
3.2.5. Gerenciamento de risco	54
3.2.6. Requisitos estatutários e regulamentares aplicáveis	55
3.2.7. Requisitos essenciais para projeto em desenvolvimento	56
3.3. Desenvolvimento do projeto	57
3.3.1. Produção de modelos buscando alcançar os dados de entrada	57
3.3.2. Avaliação do desempenho do protótipo	59
3.3.3. Análise de embalagem e rotulagem	60
3.4. Validação do protótipo	62
3.4.1. Produção de três lotes pilotos	62
3.4.2. Avaliação dos lotes pilotos	62
3.4.3. Validação externa	68
3.4.4. Oficialização das fichas técnicas de produção	69
3.4.5. Cadastro de matérias-primas e fornecedores	69
3.4.6. Elaboração das Instruções de uso	69
3.4.7. Revisão do Gerenciamento de Risco	69
3.4.8. Elaboração do relatório técnico e registro na ANVISA	70
3.4.9. Lançamento do produto e finalização do projeto	70
4. RESULTADOS	71
4.1. Planejamento do projeto	72

4.1.1.	Requisitos de funcionamento do produto (dados de entrada do projeto).....	72
4.1.2.	Levantamento das matérias-primas e equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto	73
4.1.3.	Análise de viabilidade econômica e financeira	73
4.1.4.	Análise de viabilidade técnica	74
4.1.5.	Gerenciamento de Risco	74
4.1.6.	Requisitos estatutários e regulamentares aplicáveis.....	75
4.1.7.	Requisitos essenciais para projeto em desenvolvimento	76
4.2.	Desenvolvimento do projeto	77
4.2.1.	Produção de modelos buscando alcançar os dados de entrada.....	77
4.2.2.	Avaliação do desempenho do protótipo.....	84
4.2.3.	Análise de embalagem e rotulagem	85
4.3.	Validação do protótipo.....	87
4.3.1.	Produção de três lotes pilotos	87
4.3.2.	Avaliação dos lotes pilotos.....	87
4.3.3.	Validação Externa	104
4.3.4.	Oficialização das fichas técnicas de produção	104
4.3.5.	Cadastro de matérias-primas e fornecedores.....	105
4.3.6.	Elaboração das Instruções de Uso.....	105
4.3.7.	Revisão do Gerenciamento de Risco.....	105
4.3.8.	Elaboração do relatório técnico e registro na ANVISA.....	105
4.3.9.	Lançamento do produto e finalização do projeto.....	106
5.	DISCUSSÃO	107
6.	CONCLUSÃO	115
7.	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	117
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
	APÊNDICES.....	126
	APÊNDICE A – Resultados dos testes comparativos entre o protótipo desenvolvido, o padrão-ouro (quimioluminescência) e um kit similar do mercado (Confirme Fertilidade). 126	
	ANEXOS	143
	ANEXO A – Modelo de procedimento para o desenvolvimento de projetos de kits diagnósticos.	143
	ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	146

1. INTRODUÇÃO

1.1. Normatização para pesquisa e desenvolvimento

O desenvolvimento de produtos com inovação tecnológica é um processo crítico para a sobrevivência de empresas no mercado, pois dele depende a renovação do portfólio de produtos da empresa (FREITAS, 2011; TOLEDO et al., 2008). A demanda por novos produtos está associada às exigências de segmentos do mercado, à incorporação de tecnologias e à adequação a novos padrões e restrições legais (TOLEDO et al., 2008).

O departamento de pesquisa e desenvolvimento de uma empresa é responsável pelos processos de lançamento de novos produtos, melhoria dos já existentes e em alguns casos, pela nacionalização de produtos que antes eram importados para comercialização (TOLEDO et al., 2008). Várias atividades são necessárias para execução desses processos e o sucesso das mesmas dependerá em grande parte da capacidade de gestão dos projetos (PONS, 2012; TOLEDO et al., 2008).

A gestão de projetos pode ser feita utilizando-se diversas ferramentas como o MS Project e o PMBOK de projetos, onde é possível controlar indicadores como custo, *time-to-market* e qualidade (DUARTE JUNIOR, 2013; TOLEDO et al., 2008). Ademais, quando uma empresa pretende submeter seus produtos ao registro na ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, como é o caso de empresas fabricantes de kits diagnósticos, é preciso seguir as normas e documentações exigidas por esse órgão. Além disso, o processo muitas vezes deve seguir as exigências de certificação do sistema de gestão da ISO (por exemplo, ISO 9001) (PMKB, [entre 2006 e 2014]; TOLEDO et al., 2008).

Os sistemas de gestão da qualidade tiveram origem após a Segunda Guerra Mundial em projetos militares, nucleares e de infraestrutura. A primeira norma de sistema de gestão, a norma do Pentágono americano, foi a MIL STD-Q-9858 de 1959 e em seguida, criaram-se regras para o fornecimento de equipamentos para a indústria nuclear e para o fornecimento de equipamentos bélicos para a OTAN. Nos anos 1970s, surgiram regras similares para o fornecimento de equipamentos para a exploração de petróleo no Mar do Norte, hidrelétricas no Canadá e em outros países, inclusive no Brasil, onde a usina de Itaipu foi construída com fornecimentos assegurados pelas normas NBR 8593/94/95/97 de 1983 (DUARTE JUNIOR, 2013).

Estas normas passaram a ser mais utilizadas a partir dos anos 1980s, nas indústrias de produção seriada, como a automotiva e eletroeletrônica, até que surgiram as normas da série ISO 9000 em 1987, abrangendo todo tipo de indústrias e serviços (DUARTE JUNIOR, 2013). Nos anos 1990s viu-se um grande esforço das empresas brasileiras para obtenção da certificação ISO 9000 quando estas foram expostas à abertura do mercado e à globalização, sendo impelidas a rever os seus processos produtivos para melhorar a qualidade de seus produtos (PEINADO; GRAEML, 2007).

A norma ISO 9000 sofreu revisões em 1994, 2000 e 2008, sendo que a revisão de 2000 foi considerada a mais relevante, na qual a norma adotou princípios de gestão mais próprios da chamada “Qualidade Total” (DUARTE JUNIOR, 2013).

A ISO 9001 de 2008 aborda em seu item 7.3 – Projeto e Desenvolvimento, os planejamentos que uma empresa deve seguir para o desenvolvimento de determinado produto ou serviço (FREITAS, 2011). O item em questão é detalhado em sete subitens: Planejamento, Entradas, Saídas, Análise Crítica, Verificação, Validação e Controle de alterações de projeto e desenvolvimento.

Em 2012 ocorreu uma revisão importante da norma, originando a ISO 21500 que integra o gerenciamento de projetos ao sistema de gestão da qualidade (DUARTE JUNIOR, 2013). A norma fornece diretrizes para o gerenciamento de projetos, auxilia a transferência de conhecimentos entre projetos e organizações e pode ser aplicada a qualquer tipo de organização e para qualquer tipo de projeto, independente da duração, tamanho ou complexidade (DE CICCO, 2012; PONS, 2012). Embora esta norma tenha proporcionado grandes avanços no desenvolvimento, até o momento ela não possui requisitos, sendo assim, não certificável (SOTILLE, 2012).

Os processos de gestão e produção desse projeto foram feitos tomando-se como base a ISO 9001 de 2008. Já as boas práticas de fabricação foram elaboradas seguindo-se a RDC 16 de 2013.

1.2. Teste Rápido

Os testes rápidos, também conhecidos como Ensaio de Fluxo Lateral, são fundamentados no método imunocromatográfico. A técnica se baseia na reação entre reagentes secos, fixados em um suporte sólido, e amostras fluidas. Esse tipo de teste é importante para efeito diagnóstico em uma variedade de eventos, por exemplo, testes de identificação de infecção ou contaminação por patógenos específicos, incluindo agentes usados na guerra biológica, medicamentos e drogas de abuso, hormônios e metabólitos. Sua aplicação tem se expandido para além dos diagnósticos clínicos em áreas tão diversas como a veterinária, agricultura, alimentação, saúde, segurança ambiental, ensaios industriais e novas áreas como o diagnóstico molecular (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

O desenvolvimento da tira teste imunocromatográfica é o resultado da convergência de vários segmentos que pode ser rastreada até a década de 1950, quando a maioria dos métodos rápidos de diagnóstico ganhou real valor preditivo (O'FARRELL, 2009).

Tais métodos rápidos surgiram através da união das técnicas de aglutinação em látex, radioimunoensaio, ensaio imunoenzimático e cromatografia clássica (DOURADO et al., 2007; O'FARRELL, 2009).

A base técnica da aglutinação em látex foi desenvolvida em 1956 por Plotz e Singer. Estes descreveram a aglutinação de amostras de soros positivos para artrite reumatóide com uma suspensão de partículas de poliestireno de tamanho uniforme sensibilizadas com gamaglobulina humana em um tampão alcalino.

Em paralelo, a técnica de radioimunoensaio (RIA) foi inventada por Berson e Yalow em 1950 e se baseia na dosagem de componentes presentes no soro em quantidades mínimas a partir de partículas conjugadas com radioisótopos (BERSON; YALOW, 1959; LIMA et al., 1992). As desvantagens desse método foram superadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), que substituiu os radioisótopos por enzimas. Este método, análogo ao RIA, foi descrito inicialmente por Engval e Perlmann na década de 1970, e ocasionou outras melhorias como tempo de reação mais rápido, maior especificidade e maior vida de prateleira (CROWTHER, 1995; ENGVALL; PERLMANN, 1971; LIMA et al., 1992; O'FARRELL, 2009).

A cromatografia clássica é um método físico-químico de separação que foi descrito pela primeira vez por Tsweet em 1906. O princípio do método é a migração dos componentes de uma amostra entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A interação dos componentes da amostra com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, como dipolo induzido, ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals, fazendo ocorrer mecanismos de separação como adsorção, dispersão e troca iônica (ZANELLA, [200-?]). A técnica mostra um bom desempenho para análises quantitativas, porém pode apresentar elevado custo e tempo (WELLER, 2000).

A fusão de todos esses métodos resultou na tecnologia de fluxo lateral e suas aplicações continuaram a evoluir, principalmente como consequência do teste de gravidez humana, que impulsionou o desenvolvimento da tecnologia na década de 1970. Este teste proporcionou inovações tecnológicas na produção de anticorpos e uma melhor compreensão da biologia e detecção da gonadotrofina coriônica humana (hCG), resultante do trabalho realizado por Vaitukaitis, Braunstein e Ross (1972) (O'FARRELL, 2009).

Durante a década de 1980 os princípios básicos da tecnologia continuaram a ser aperfeiçoados. Neste período foi relatada a utilização dos mesmos componentes dos imunoenaios enzimáticos, anticorpos imobilizados em uma fase sólida e o conjugado, nos testes rápidos (LITMAN; HANLON; ULLMAN, 1980). Inicialmente os conjugados eram enzimáticos (PAPPAS; HAJKOWSKI; HOCKMEYER, 1983), e ao longo do tempo foram substituídos por partículas conjugadas, como ouro coloidal, partículas de látex, selênio, carbono e lipossomas (LEUVERING et al., 1980; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

O desenvolvimento de todas essas áreas resultou no depósito de várias patentes que culminou na introdução da tecnologia no mercado no final de 1980 (ABBOTT LABORATORIES, 1990; BECTON DICKINSON AND COMPANY, 1987; BECTON DICKINSON AND COMPANY, 1989; SYVA COMPANY, 1982; SYVA COMPANY, 1983; THYROID DIAGNOSTICS, INC., 1978; UNILEVER PATENT HOLDINGS B. V., 1997; VENTREX LABORATORIES, INC., 1980). A evolução desta técnica se estendeu por toda a década de 1990, alcançando a tecnologia conhecida atualmente (O'FARRELL, 2009).

O desempenho do teste rápido, no início, era insatisfatório quando comparado ao teste ELISA (BRASIL MS, 2007). Atualmente a técnica

imunocromatográfica apresenta alta sensibilidade, especificidade, baixo custo, facilidade de uso e desempenho comparável ao teste ELISA (BRASIL MS, 2007; KETEMA et al., 2001; WHO/UNAIDS, 1999; WILKINSON et al., 1997). Em regra geral, a sensibilidade e a especificidade são alcançadas pela combinação da cromatografia em camada delgada com o uso de anticorpos específicos, no caso de diagnósticos imunológicos; ou seqüências específicas de DNA/RNA, no caso de diagnósticos moleculares (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

No Brasil, a aplicação do teste rápido em programas de saúde tem aumentado progressivamente nos últimos anos. Esse avanço facilitou a inserção de certas populações, como usuários de drogas ilícitas, profissionais do sexo, trabalhadores itinerantes e moradores em 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 (BRASIL MS, 2007). Isso é possível não apenas pela versatilidade da técnica, que dispensa a necessidade de infraestrutura laboratorial e profissionais especializados, mas também pela rapidez do resultado, que pode ser observado entre 10 e 20 minutos (BRASIL MS, 2007; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Uma vantagem significativa do teste rápido é a diminuição da sobrecarga dos laboratórios centrais, visto que a técnica não requer uma infraestrutura laboratorial para sua realização, diminuindo também as despesas relativas ao transporte de amostras e de encaminhamento dos resultados aos laboratórios. Além disso, a disponibilização de testes rápidos em farmácias e drogarias, como os testes para detecção dos hormônios hCG, LH e FSH, possibilita às usuárias um controle maior de seu tratamento e a facilidade de realizar o exame em sua própria casa, sem precisar se deslocar para um laboratório.

Há uma grande demanda para testes rápidos a nível mundial. Até meados de 2010, mais de 100 companhias ao redor do mundo produziam uma variedade de testes com um mercado avaliado em aproximadamente US\$ 3.360 milhões. Entretanto, após sucessivas rodadas de consolidação do mercado e o surgimento da Alere Inc. (Massachusetts, EUA) como o maior vendedor de testes rápidos, estima-se que apenas 27 companhias detinham 94% do mercado mundial de testes rápidos em 2010 (O'FARRELL, 2013).

O segmento médico de testes rápidos é visto como o mais lucrativo porque há uma grande demanda ao redor do mundo para a descentralização de testes diagnósticos (O'FARRELL, 2013). Em 2010 esses testes geraram US\$ 2.990 milhões de receita e representaram 89% do mercado mundial de testes rápidos. Considerando uma taxa de crescimento anual de 7%, estima-se que este segmento deve crescer para US\$ 4.100 milhões em 2015 (O'FARRELL, 2013).

Apesar do mercado de testes rápidos no Brasil se encontrar em franca expansão, o país não possui ainda a tradição de fabricação desses kits. A maioria das empresas que comercializa esses produtos é somente importadora, isto é, apenas revendem o teste com sua marca. São poucas as empresas que fabricam no Brasil e mais raras ainda são as empresas totalmente nacionais que o fazem. O desenvolvimento nacional dessa tecnologia é de suma importância para promover novas soluções para a saúde pública no Brasil, bem como impulsionar avanços tecnológicos no setor, permitindo às empresas brasileiras competirem no mercado com as multinacionais.

1.2.1. Princípios básicos para o desenvolvimento de um teste rápido – Principais componentes

A tira teste é composta por uma série de membranas sobrepostas impregnadas com reagentes secos que interagem entre si gerando bandas coloridas, visíveis a olho nu. A interação entre os diversos componentes irá determinar o desempenho da tira e o correto funcionamento do teste.

A composição básica de um teste rápido pode ser visualizada na figura 1:

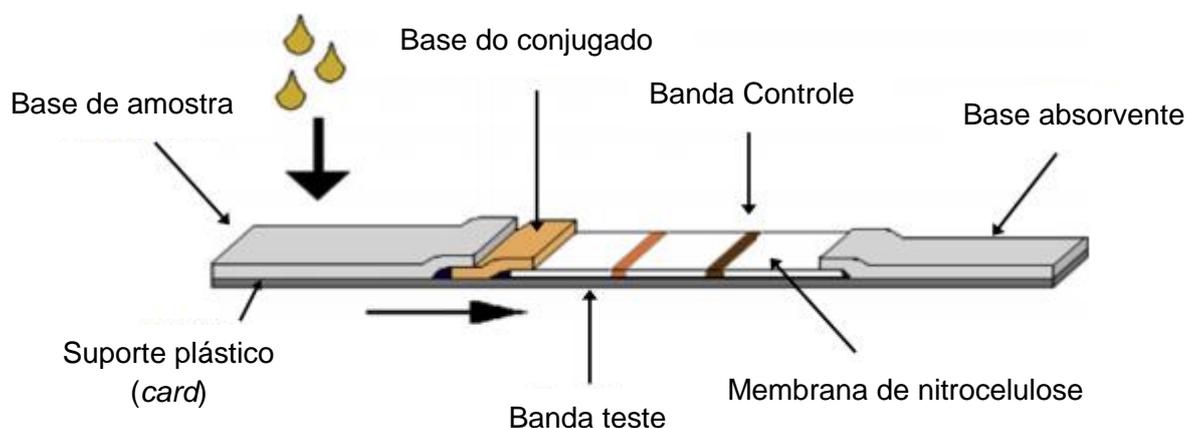


Figura 1 - Desenho esquemático da composição da tira teste (O'FARRELL, 2013).

O desenvolvimento de um teste imunocromatográfico é complexo em função do grande número de componentes críticos combinados para produzir uma tira teste eficaz. A mudança de um material ou reagente tipicamente afeta o desempenho dos outros. Por esse motivo, é necessário entender como cada componente contribui para o desempenho da tira teste (MILLIPORE, c2006).

1.2.1.1. Membrana de nitrocelulose

A membrana de nitrocelulose é a parte central do teste imunocromatográfico (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Ela pode possuir diferentes tamanhos de poros e pode ser adquirida de vários fabricantes como Whatman, Advanced Microdevices (MDI) ou Millipore (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Diversos são os parâmetros críticos para o desempenho da membrana, como o fluxo capilar, a espessura, presença de suporte e a concentração de detergentes e surfactantes. Suas características físicas e químicas afetam o fluxo capilar. Este por sua vez afeta a deposição dos reagentes, sensibilidade do ensaio, especificidade e uniformidade das bandas (MILLIPORE, c2006).

a) Composição da membrana

A membrana deve ligar irreversivelmente os reagentes de captura nas bandas teste e controle. O polímero do qual a membrana é feita determina a maioria das suas características de ligação. Tipicamente as membranas podem ser feitas de nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno, náilon modificado e polietersulfona (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009), sendo que a mais comum e a que foi utilizada neste projeto é a de nitrocelulose.

As membranas de nitrocelulose ligam proteínas eletrostaticamente através da interação dipolo do éster nitrato com as ligações peptídicas da proteína (MILLIPORE, c2006). Na maioria das vezes, a capacidade de ligação de uma proteína é determinada pela área de superfície disponível na membrana para a imobilização. A área de superfície da membrana por sua vez é determinada pelo tamanho do poro, porosidade e espessura (MILLIPORE, c2006).

b) Fluxo capilar

A taxa de fluxo capilar é o parâmetro mais crítico no desempenho de uma membrana e pode ser definida como a velocidade na qual a amostra se move pela membrana. A forma mais fácil de mensurar esse parâmetro é através do tempo de fluxo capilar, ou seja, o tempo necessário para o líquido se mover e preencher completamente uma tira de tamanho definido (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). Esse valor é tipicamente expresso em seg/cm (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Existem três formas com que o fluxo capilar interfere no desempenho do teste. A primeira forma diz respeito à eficiência da ligação do antígeno ao anticorpo. No ensaio de fluxo lateral, o antígeno não consegue se ligar ao anticorpo imobilizado uma vez que já tenha passado por ele porque as tiras teste são projetadas para manter o fluxo em apenas uma direção (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). Sendo assim, a concentração efetiva de antígeno que se liga ao anticorpo de captura diminui conforme o fluxo aumenta. Isto acontece porque com o aumento do fluxo, os componentes do par reativo permanecem pouco tempo próximos um do outro (MILLIPORE, c2006).

A segunda forma diz respeito à localização da banda teste. O fluxo capilar diminui exponencialmente com o aumento da distância da amostra em relação à sua origem (BROWN, 2009; MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). A implicação desse fenômeno é que a posição da banda teste exerce um impacto significativo na busca pela sensibilidade. Quanto mais afastada for a banda teste em relação à origem, menor será a velocidade com que o analito passará pelo reagente de captura e, conseqüentemente, maior será a sensibilidade do teste (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Existe ainda uma terceira forma com que o fluxo capilar afeta o desempenho do ensaio. Quando o fluxo capilar aumenta, os reagentes impregnados nas bandas teste e controle espalham mais pela membrana. Com isso, as bandas aplicadas em membranas de fluxo rápido serão mais largas do que as aplicadas em membranas de fluxo lento. Isso faz com que o sinal de detecção seja disperso nas bandas mais largas, tornando mais difícil a visualização de uma banda fraca (MILLIPORE, c2006).

c) Espessura da membrana

Outra característica que afeta o desempenho do teste é a espessura da membrana. Ela é importante por três razões: causa impacto na largura das bandas teste e controle, impacto na resistência à tração e impacto na visibilidade do sinal (MILLIPORE, c2006).

Em relação ao impacto da espessura na largura das bandas teste e controle, o espalhamento dos reagentes em membranas mais finas é maior que em membranas mais grossas porque há uma menor profundidade para o líquido penetrar. Se um reagente de captura é espalhado por uma área mais larga, este ficará disperso pela membrana, gerando uma intensidade menor de cor e conseqüentemente, menor sensibilidade (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006).

A espessura também influencia na resistência à tração, que pode ser definida como a força mínima que deve ser aplicada à membrana para que esta se quebre. Quanto menor a resistência à tração, mais frágil é a membrana. A resistência à tração diminui proporcionalmente com a diminuição da espessura e com o aumento do tamanho do poro. Membranas que possuem um suporte plástico (*backed membranes*, em inglês) possuem uma boa resistência à tração e são praticamente impossíveis de se romper durante a rotina (MILLIPORE, c2006).

Uma última forma com que a espessura influencia no teste é a visibilidade do sinal, porém de forma discreta. Membranas mais grossas absorvem mais amostra, aumentando dessa maneira a massa de analito que passa pela banda teste. Entretanto, o sinal não aumenta devido a opacidade da membrana, que permite que apenas os reagentes ligados perto da superfície da membrana sejam visualizados (MILLIPORE, c2006).

d) Presença de suporte (*backed e unbacked membranes*)

Outro parâmetro crítico para o desempenho da membrana é a presença ou não de suporte. As membranas de nitrocelulose são fabricadas nos formatos com suporte e sem suporte (*backed e unbacked*, do inglês) (MANSFIELD, 2009). As membranas com suporte são as membranas que vêm anexadas a um filme não poroso e apresentam duas vantagens. Primeiramente, elas são mais fáceis de manusear (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN,

2009). A segunda vantagem é que o filme age como uma barreira contra a contaminação química, proveniente do adesivo que compõem as placas onde serão coladas as membranas durante a fabricação. Embora o adesivo penetre apenas alguns microns nos microporos da membrana, os solventes orgânicos voláteis liberados do adesivo durante um longo tempo de armazenamento podem adsorver à nitrocelulose. Isto pode alterar as propriedades de umedecimento da membrana e prejudicar o fluxo lateral (MILLIPORE, c2006).

e) Detergentes e surfactantes

Por fim, um último parâmetro crítico para o desempenho da membrana que será abordado é a utilização de detergentes e surfactantes. As membranas feitas de nitrocelulose e ligas de nitrocelulose/acetato celulose são naturalmente hidrofóbicas, elas se tornam hidrofílicas porque são tratadas com detergentes e surfactantes durante sua fabricação (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006, O'FARRELL, 2013).

Um aumento na concentração de detergentes e surfactantes, feito pelo fabricante durante a fabricação da membrana de nitrocelulose, um pouco acima do mínimo necessário para tornar a membrana hidrofílica aumenta a consistência da aplicação do reagente e melhora a uniformidade do fluxo capilar (MILLIPORE, c2006). Porém, deve-se tomar cuidado com a concentração desses reagentes ao adicioná-los devido ao impacto causado na adsorção das proteínas. Surfactantes e detergentes podem afetar a adsorção da proteína se forem adicionados na membrana ou no tampão de aplicação dos reagentes. Eles podem diminuir a adsorção das proteínas ligando-se preferencialmente na membrana ou formando um complexo com a molécula da proteína antes dela adsorver (MILLIPORE, c2006).

Os detergentes e surfactantes interferem na largura da banda. Conforme aumenta-se a quantidade desses reagentes na membrana, aumenta-se também a largura das bandas. E, à medida que o espalhamento ocorre, pode haver uma perda do sinal e uma potencial diminuição na sensibilidade do ensaio (MILLIPORE, c2006).

f) Nomenclatura

Cada fabricante difere quanto à nomenclatura da membrana. Alguns fabricantes preferem classificar as membranas pelo tamanho dos poros, como a MDI, nesse caso as membranas trazem em seu nome o tamanho, como 10 μm ou 15 μm . Outros fabricantes preferem classificá-las pelo tempo que a amostra demora para atravessar a membrana, como a Millipore. Nesse caso, o nome da membrana vem acompanhado de um número, como 135 ou 170, indicando que, para determinado comprimento de membrana, a amostra demora cerca de 135 segundos para fazer a travessia. Como já discutido, os dois modos de classificação estão relacionados. Se uma membrana possui um tamanho de poro maior é de se esperar que a amostra passe com mais facilidade pelos seus poros e com isso o tempo de corrida seja diminuído (MANSFIELD, 2009). Por outro lado, se uma membrana possui um tamanho de poro menor, a amostra terá mais dificuldade para atravessar os poros e o tempo de corrida será maior (MANSFIELD, 2009).

O tamanho dos poros também irá influenciar a sensibilidade do teste. Quando se usa membranas com poros pequenos, a amostra flui mais devagar e com isso o analito tem uma chance maior de interagir com os anticorpos ou antígenos impregnados na membrana. Quando uma alta sensibilidade não for necessária, pode-se optar por uma membrana com poros maiores e assim diminuir o tempo de reação e de execução da técnica.

g) Armazenamento

Os fabricantes recomendam que as membranas sejam armazenadas seladas em seus pacotes para prevenir a penetração de pó e sujeira. Para armazenamentos a longo prazo, a temperatura pode variar de 15 a 30°C e a umidade relativa pode variar de 15 a 85% (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Uma vez que os reagentes de captura tenham sido impregnados, a membrana deverá ser mantida em ambiente desumidificado com umidade relativa menor que 15% (MANSFIELD, 2009).

1.2.1.2. Escolha dos reagentes de captura e detecção

Para iniciar os testes é preciso também formular uma estratégia de captura e detecção do analito de interesse. Existem diferentes formatos de testes e estratégias que podem ser adotados para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste.

Reagentes de captura

Os reagentes de captura podem ser antígenos ou anticorpos, dependendo da conformação do teste. Estes devem permanecer reativos após serem adsorvidos na superfície sólida, manter sua integridade estrutural quando completamente secos, e voltar a ser instantaneamente reativos quando reidratados pela amostra (MILLIPORE, c2006).

a) Escolha do antígeno

Se o analito de interesse for um anticorpo, então impregna-se na banda teste um antígeno total ou parte dele (como os antígenos recombinantes) e assim, se o anticorpo estiver presente na amostra, este se ligará ao antígeno fixado na placa, formando uma ponte entre este e o conjugado. Existe uma infinidade de antígenos disponíveis no mercado, e estes podem ser grosseiramente divididos em antígeno total, quando se utiliza o antígeno inteiro, ou recombinante, fabricado a partir de técnicas de biologia molecular, onde apenas um fragmento do antígeno é utilizado ou uma combinação de fragmentos. Obviamente os antígenos recombinantes são mais onerosos que os totais.

b) Escolha do anticorpo

Se por outro lado, o analito de interesse for um antígeno, impregna-se na banda teste o seu anticorpo correspondente (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Sendo assim, se o antígeno estiver presente na amostra, este se ligará ao anticorpo fixado na placa, formando uma ponte entre este e o conjugado (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

A performance do ensaio será afetada pela qualidade do anticorpo escolhido, incluindo sua especificidade e afinidade e também por parâmetros como a taxa constante de ligação e a classe do anticorpo (BROWN, 2009; O'FARRELL, 2013; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Em relação a especificidade e afinidade, alguns fatores devem ser considerados na escolha de anticorpos monoclonais ou policlonais. Anticorpos policlonais são produzidos mais rapidamente em grande quantidade, apresentam um baixo custo e podem apresentar alta afinidade; por outro lado podem sofrer variação entre animais e ao longo do tempo e podem requerer uma extensa purificação (BROWN, 2009; O'FARRELL, 2013). Já os anticorpos monoclonais são reagentes precisos e fáceis de purificar, por outro lado necessitam de um longo tempo para serem produzidos, são mais dispendiosos e podem não fornecer a mais alta afinidade (O'FARRELL, 2013).

c) Cinética de ligação antígeno-anticorpo

Os testes de fluxo lateral necessitam de uma alta afinidade durante a interação do antígeno ao anticorpo (BROWN, 2009). Considerando a cinética do ensaio de fluxo lateral e a taxa constante de ligação do antígeno ao anticorpo, tem-se que a banda teste apresenta tipicamente de 0,5 – 1,0 mm de largura e que o fluxo da amostra varia em torno de 0,1 – 0,7 mm/s, dependendo da membrana de nitrocelulose escolhida. Isso gera um tempo potencial para a ligação do antígeno ao anticorpo na banda teste entre 1 a 6 s na maioria dos sistemas. Por isso a necessidade dos anticorpos apresentarem uma alta taxa de ligação (BROWN, 2009; O'FARRELL, 2013).

d) Determinação do número de bandas teste

O mais comum é termos apenas uma banda teste, indicando a presença ou ausência do analito em questão. Podemos ter também duas bandas testes para detectar dois anticorpos diferentes, como o teste para detecção dos anticorpos IgG e IgM da Dengue (LIMA et al., 2012). É possível encontrar também, uma banda teste para detectar o antígeno e outra para detectar o anticorpo, como os testes rápidos de quarta geração para diagnóstico do HIV, onde uma banda teste detecta o

antígeno p24 e outra banda teste detecta o anticorpo anti-HIV (MASCOTRA et al., 2013; OKU et al., 2001).

e) Formato do ensaio: Competitivo vs Sanduíche

O formato do ensaio onde o aparecimento de banda na região teste indica presença do analito é chamado do tipo “Não competitivo” ou “Ensaio sanduíche” (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). É o tipo mais largamente utilizado, quando temos mais de um epítipo no analito de interesse para, através dele, conseguir fazer a ponte entre o anticorpo impregnado na banda teste e o conjugado. Por outro lado, se o analito de interesse for uma molécula pequena e possuir apenas um epítipo, ou seja, apenas um sítio de ligação, utiliza-se o formato de teste chamado de “Competitivo” (BROWN, 2009; O’FARRELL, 2013; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Neste caso são possíveis duas abordagens: na primeira o anticorpo é impregnado na banda teste e o conjugado seria uma molécula correspondente ao analito, porém ligado ao ouro coloidal, o analito e o conjugado competirão entre si pela ligação ao anticorpo de captura presente na membrana; na segunda uma molécula correspondente ao analito é impregnada na banda teste e o conjugado seria o anticorpo ligado ao ouro coloidal, o analito presente na amostra se ligaria ao conjugado, impedindo que este se ligue à banda teste (BROWN, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Neste formato de ensaio, a ausência de banda na área teste indica um resultado positivo (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

f) Escolha da Banda Controle

Existe ainda uma segunda banda cujo aparecimento é obrigatório para assegurar a funcionalidade do teste: a banda controle (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Na banda controle também é possível utilizar diversas estratégias. O mais comum é utilizar um anticorpo policlonal produzido em carneiro anti-IgG de camundongo. Sendo assim, ele irá se ligar a qualquer anticorpo IgG produzido em camundongo que estiver ligado no conjugado. Dessa maneira é

possível utilizar o mesmo conjugado para se ligar à banda teste e à banda controle. Outra estratégia é optar por dois conjugados diferentes, um direcionado à banda teste e outro direcionado à banda controle. Neste caso, basta impregnar qualquer antígeno ou anticorpo na banda controle e colocar o antígeno ou anticorpo correspondente no conjugado.

g) Tampões para diluição dos reagentes

Os tampões utilizados na diluição dos reagentes que serão aplicados nas bandas teste e controle devem ser cuidadosamente formulados para que a adsorção das proteínas não seja comprometida, a atividade do reagente seja mantida e as propriedades de fluxo da membrana não sejam alteradas. Em última análise, os reagentes de captura devem atender às especificações de sensibilidade, especificidade e estabilidade (MILLIPORE, c2006).

A solução diluente dos reagentes de captura deve ser sempre tamponada para atingir a uniformidade na fabricação e no desempenho da tira teste (MANSFIELD, 2009). No mínimo, o pH de cada lote de reagente deve ser igual, mesmo que este não seja o pH ótimo. Muitos tampões podem ser usados para controlar o pH da solução, incluindo os tampões fosfato, borato, TRIS e carbonato (MILLIPORE, c2006).

É importante lembrar que os reagentes de captura irão secar na membrana na presença dos sais que compõem o tampão. Alguns problemas podem surgir das interações químicas que ocorrem durante a evaporação, quando a concentração desses sais aumenta temporariamente (MILLIPORE, c2006).

h) Fixação dos reagentes

Outro ponto importante na impregnação dos reagentes de captura é a fixação desses reagentes. A secagem é um dos processos mais críticos para atingir uniformidade, estabilidade e sensibilidade nos testes imunocromatográficos (O'FARRELL, 2013). A eficácia e a reprodutibilidade da secagem dependem do controle da temperatura, umidade, fluxo de ar e tempo (MILLIPORE, c2006; O'FARRELL, 2013). O grau de secagem pode ser crítico para o empacotamento das proteínas na sua conformação ativa (O'FARRELL, 2013). Se ocorrer uma falha neste

processo e a membrana não secar completamente pode ocorrer a perda dos reagentes de captura (MILLIPORE, c2006).

Uma vez que as membranas estejam secas, elas devem ser armazenadas entre 4 e 20°C com umidade relativa do ar inferior a 15% para evitar a reidratação dos reagentes de captura (MILLIPORE, c2006).

i) Aplicação dos reagentes

O protocolo para aplicação dos reagentes deve ser estudado e aperfeiçoado para garantir uma otimização do processo produtivo. As variáveis que devem ser consideradas incluem:

- A velocidade de dispensação dos reagentes ($\mu\text{l}/\text{cm}$)
- A concentração dos reagentes que serão aplicados
- O tampão que será utilizado para diluir os reagentes
- A posição da banda teste
- O tempo de secagem

A concentração dos reagentes de captura deve ser fixada quando atingirem uma intensidade de banda desejável, somado a uma sensibilidade e especificidade adequados (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Reagentes de detecção

a) Tipos de conjugados

A escolha do reagente de detecção é outra etapa crucial no processo. O reagente de detecção ou conjugado é um complexo formado por anticorpos ou antígenos ligados a partículas capazes de gerar um sinal, como por exemplo o ouro coloidal e esferas de látex coloridas. O ouro coloidal é o mais comum e possui uma cor vinho arroxeadada, já as partículas de látex estão disponíveis em diversas cores (CHUN, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Outras possibilidades incluem conjugados enzimáticos, outros coloides metálicos, corantes, partículas fluorescentes e partículas magnéticas (CHUN, 2009; MILLIPORE, c2006; O'FARRELL, 2013; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

b) Obtenção do conjugado

Diversas empresas oferecem o conjugado já pronto e ligado a um anticorpo ou antígeno específico e é possível também personalizar o conjugado, caso ele não esteja disponível no mercado (CHUN, 2009). Outra opção é fazer a produção do conjugado “*in house*”. Neste caso primeiramente é feito um processo para a obtenção do ouro coloidal e em seguida conjugam-se essas partículas aos anticorpos ou antígenos de interesse (CHUN, 2009).

c) Seleção dos antígenos e anticorpos para conjugação

A escolha do anticorpo ou antígeno conjugado ao ouro coloidal pode seguir diversas estratégias. O mais comum é optar por um conjugado formado por um anticorpo ou antígeno complementar ao analito de interesse. Nesse caso, se o analito estiver presente na amostra, ele se ligará ao seu antígeno ou anticorpo complementar conjugado ao ouro coloidal. Esse complexo migra através das membranas até encontrar a banda teste que possui anticorpos ou antígenos impregnados que reconhecem o analito e se ligam a ele. O acúmulo de partículas de conjugado nessa região gera um sinal visível de coloração vinho arroxeadada.

A escolha dos anticorpos para conjugação segue os mesmos princípios dos anticorpos utilizados como reagentes de captura, nas bandas teste e controle. Deve-se avaliar os anticorpos quanto à especificidade e afinidade, taxa constante de ligação e classe do anticorpo (BROWN, 2009; O’FARRELL, 2013). Em relação à taxa constante de ligação, a situação é um pouco mais favorável para o conjugado, que passa um tempo maior em contato com o analito. A reação de ligação “efetiva” começa com a ressolubilização do conjugado e termina depois que o conjugado passa pela banda teste. Esse tempo varia em torno de 10 – 20 s mas pode elevar-se por muitos minutos até que a última partícula seja liberada da base do conjugado (BROWN, 2009; O’FARRELL, 2013).

d) Medidas de concentração do ouro coloidal

As concentrações de ouro coloidal são frequentemente expressas em termos de densidade óptica (D.O.) ou absorvância a 520 nm. Uma solução de ouro de 40

nm na concentração de “1 D.O.” contém 990 bilhões de partículas/mL. A concentração máxima de anticorpo que pode ser ligada a uma partícula de ouro depende da área de superfície da partícula. Por exemplo, em uma partícula de ouro coloidal de 40 nm são utilizadas cerca de 150 moléculas de IgG (O’FARRELL, 2013).

e) Base do conjugado (*conjugate pad*)

A membrana onde será impregnado o conjugado é chamada de base do conjugado (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Ela pode executar diversas tarefas, sendo a principal delas garantir a transferência uniforme do reagente de detecção e da amostra para a membrana de nitrocelulose (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). Quando a amostra flui pela base do conjugado, o reagente de detecção se desprende da membrana, se solubiliza e se move junto com a amostra em direção à membrana de nitrocelulose (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Os materiais comumente usados nas bases de conjugado incluem a fibra de vidro, fibra de celulose, poliéster ou polipropileno tratados (para torná-los hidrofílicos) (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006; O’FARRELL, 2013).

f) Tampão de diluição do conjugado

Para serem aplicados na membrana, os reagentes de detecção precisam ser diluídos em um tampão. O tampão recomendado para diluir as partículas de ouro coloidal é o tampão borato, pH 7, suplementado com 1 a 10% de trealose ou sucrose. A sucrose e a trealose agem como preservativo e como agente solubilizante. Quando os reagentes de detecção são secos na presença do açúcar, estes formam uma camada em torno das partículas que ajuda a estabilizar as estruturas biológicas. Quando a amostra entra em contato com a membrana, as moléculas de açúcar instantaneamente se dissolvem, carregando os reagentes para a superfície e fazendo com que estes adentrem na corrente fluida (MILLIPORE, c2006).

g) Secagem do conjugado

Para maximizar o desempenho dos reagentes de detecção, as membranas impregnadas devem ser secas completamente o mais rápido possível (O'FARRELL, 2013). Isso pode ser feito colocando as membranas aplicadas em uma incubadora a 37°C por 2 horas. A principal razão para evaporar a água rapidamente é minimizar a migração de partículas na membrana. Uma vez que as partículas não estão fixas na superfície do material, não há forças químicas que as mantenham no lugar. Por isso, se o líquido se mover, as partículas também tenderão a se mover (MILLIPORE, c2006).

O processo de tratamento da base do conjugado, impregnação do conjugado e secagem requer múltiplos passos, que podem gerar variabilidade no resultado final do teste. A eficiência da liberação do conjugado da membrana normalmente não é alta e varia dependendo da partícula conjugada. Este é o maior fator contribuinte para o coeficiente de variação padrão (CV) da intensidade de sinal visto nos ensaios de fluxo lateral, que varia de 15 – 30% de tira para tira (O'FARRELL, 2013).

h) Armazenamento

As membranas aplicadas devem ser armazenadas entre 4 e 20°C de temperatura e a uma umidade relativa do ar abaixo de 15%. Se a membrana aplicada ficar exposta a uma umidade alta, a água poderá se complexar com as moléculas de açúcar, convertendo-as em um xarope, retardando a ressolubilização das partículas no momento do ensaio (MILLIPORE, c2006).

1.2.1.3. Base de amostra

A escolha da base de amostra a ser utilizada no desenvolvimento do teste deve ser orientada pelo tipo de amostra que foi escolhida nos dados de entrada do projeto, pelo volume a ser aplicado no teste e pela necessidade de usar tampão de aplicação que, por sua vez, aumenta o volume da amostra a ser aplicado.

a) Tipo de material a ser utilizado como base de amostra

A base de amostra é uma membrana onde a amostra é depositada para em seguida entrar em contato com o conjugado (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Ela pode ser usada para realizar múltiplas funções, entre as quais a de ambientar os diversos tipos de amostras ao teste, como soro, plasma, sangue total, urina, leite e saliva e promover a liberação uniforme e controlada da amostra para a base do conjugado (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Outros papéis desempenhados por ela são a correção do pH da amostra, retenção de impurezas, retenção das hemácias e liberação do plasma (O'FARRELL, 2013).

A escolha da base de amostra dependerá do tipo de amostra que será utilizada no teste e do volume de amostra (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Para cada tipo de amostra é indicado uma base específica, podendo ser basicamente de fibra de vidro, poliéster ou algodão. Para amostras de soro e urina por exemplo, costuma-se utilizar a fibra de vidro ou poliéster; já para amostras de sangue é necessário utilizar uma membrana específica para retenção das hemácias. Essas membranas específicas são capazes de separar as células sanguíneas do soro ou plasma de tal forma que um volume suficiente da amostra é liberado para reagir no teste imunocromatográfico (O'FARRELL, 2013).

b) Definição da estrutura da base em função do volume de amostra

Se o volume de amostra for pequeno pode-se utilizar uma membrana com uma espessura menor, como 0,35 mm; porém, se o volume de amostra for grande a membrana deverá ter uma espessura maior para conseguir absorver esse volume.

c) Necessidade de Tratamento da Base de Amostra

As empresas geralmente oferecem um guia em suas páginas na internet indicando qual a melhor base de amostra para cada situação. Apesar das empresas oferecerem quase os mesmos tipos de membranas, estas diferem em sua composição de um fornecedor para outro. Cada empresa utiliza um determinado tratamento em suas membranas para deixá-las mais hidrofílicas ou serem capazes

de reter hemácias, por exemplo (O'FARRELL, 2013). Embora as bases já venham tratadas de fábrica é muito comum fazer um novo tratamento para acentuar determinada característica.

Quando impregnada com componentes como proteínas, detergentes, intensificadores de viscosidade e sais, a base de amostra também pode ter as seguintes finalidades:

- Aumentar a viscosidade da amostra (modulando o fluxo);
- Aprimorar a habilidade da amostra de solubilizar o reagente de detecção;
- Impedir que o conjugado e o analito se liguem de forma não específica a algum material;
- Modificar a natureza química da amostra para que se torne compatível com a formação do imunocomplexo na banda teste (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Como citado anteriormente, as bases de amostra podem ser impregnadas com uma variedade de agentes químicos designados a tornar a ampla gama de amostras compatível com o funcionamento da tira teste. Alguns testes utilizam amostras que apresentam uma grande variação na composição química. A urina humana, por exemplo, pode apresentar o pH entre 5 e 10. Adicionar um tampão salino na base de amostra pode minimizar a variação, controlando o pH e a força iônica da solução (MILLIPORE, c2006).

Muito dos materiais usados nesses ensaios requer um tempo de permanência prolongado da membrana com a solução de tratamento devido à extrema hidrofobicidade desses materiais, como a fibra de vidro e o poliéster (O'FARRELL, 2013). Uma vez que a membrana tenha sido impregnada com a solução de tratamento, esta deve ser seca e armazenada entre 4 e 20°C de temperatura e a uma umidade relativa do ar abaixo de 15% (MILLIPORE, c2006).

d) Observações de montagem

Depois de seca, alguns cuidados devem ser tomados na colocação da membrana durante a montagem do teste. Deve-se garantir um contato suficiente na sobreposição da base de amostra sobre a base do conjugado. Se não forem

estabelecidos um bom contato e uma compressão adequada da membrana, poderá ocorrer uma não uniformidade ou até mesmo a interrupção do fluxo da amostra da base de amostra para a base de conjugado (MILLIPORE, c2006).

1.2.1.4. Base absorvente

Uma última membrana utilizada no teste é a base absorvente, localizada acima da membrana de nitrocelulose, sobrepondo a mesma, e alinhada à parte de cima do *card* plástico (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

a) Definição da composição, espessura e medidas da base absorvente

A função primária da base absorvente é aumentar o volume total de amostra que poderá ser adicionado à tira teste. O acréscimo no volume é utilizado para lavar os reagentes de detecção não ligados nas bandas teste e controle, diminuindo desse modo a sujeira de fundo e melhorando a sensibilidade do teste (MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009). Outra função é absorver o líquido que já reagiu nas bandas teste e controle e impedir que este líquido retorne, mantendo o fluxo em apenas uma direção (MANSFIELD, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

A maioria das membranas absorventes é composta de filtros de celulose (MILLIPORE, c2006). Pode ser adquirida de diversos fornecedores em rolos de 100 metros de comprimento e na largura desejada. O material deve ser selecionado com base na espessura, compressibilidade e manufaturabilidade (MILLIPORE, c2006). A escolha de uma base absorvente de qualidade é essencial para evitar o contra fluxo de amostra e garantir assim o correto funcionamento do teste.

1.2.1.5. Card plástico

Todas as membranas citadas acima são meticulosamente coladas, sobrepostas umas às outras, durante o processo de fabricação em um cartão plástico, comumente chamado de *card* (do inglês).

O *card* é um cartão rígido impermeável composto por um suporte plástico que possui em uma de suas faces um adesivo protegido por um papel, que geralmente já

possui algumas marcações indicando onde as diversas membranas devem ser coladas durante o processo de fabricação (PONTI, 2009). Os materiais mais comumente utilizados em sua composição são o poliestireno, o policloreto de vinil (PVC) e o poliéster (PONTI, 2009). Pode ser adquirido de diversos fornecedores, sendo oferecido de diferentes tamanhos e, dependendo da composição, pode ser mais rígido ou menos rígido.

Um ponto que deve ser observado na escolha de um *card* é a adesão correta das membranas, o adesivo deve ser forte o suficiente para manter as membranas nos seus lugares. Outro ponto importante é a composição química do adesivo, que não poderá reagir com os anticorpos, antígenos e conjugados impregnados nas membranas interferindo em seu funcionamento. Por fim, um último ponto que deve ser observado é a espessura do *card*. Se a tira for colocada em um cassete plástico, a espessura deve ser uniforme para que as membranas não sejam submetidas a diferentes graus de compressão (MILLIPORE, c2006; PONTI, 2009).

1.2.1.6. Cassete plástico

O cassete plástico, feito de material biocompatível, é composto por uma base onde a tira é acomodada com as membranas já coladas e uma tampa com alguns orifícios, onde é possível visualizar a base de amostra, onde será aplicada a amostra, e a janela de leitura, onde aparecerão as bandas teste e controle (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

a) Definição da estrutura do cassete

Assim como a composição e a espessura das membranas podem variar de um teste para outro, a estrutura do cassete, tanto interna quanto externa, também pode variar. Alguns testes apresentam apenas um orifício para deposição da amostra e do tampão e uma janela de leitura para visualização dos resultados, outros apresentam orifícios diferentes para deposição da amostra e do tampão separadamente, além de outras diferenças. O *design* do cassete é outro ponto que muda de uma empresa para outra e de um teste para outro. Pode-se encontrar cassetes no formato retangular ou de “sabonete” e pode-se encontrá-lo no formato

chamado de “caneta”, como nos testes de gravidez vendidos em drogarias. Além do formato diferenciado, um teste de gravidez no mercado inclui até mesmo um dispositivo eletrônico que mostra a palavra “grávida” em um visor ao invés de necessitar que a usuária procure por uma banda teste positiva (MANSFIELD, 2009).

Além de garantir a correta sobreposição das membranas, o cassete evita que o usuário aplique a amostra em um local errado. Para os testes de urina vendidos em farmácia, os cassetes também servem para proteger a membrana de espirros acidentais de urina (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). Identificações externas no cassete também podem ser usadas para indicar a posição das bandas teste e controle, além de outras informações (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006).

Internamente, o cassete possui diversos pinos e barras de formatos e tamanhos diferentes calculados e distribuídos estrategicamente para manter a tira teste no lugar e pressionar as membranas em lugares específicos, mantendo-as em contato umas com as outras (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). Dessa maneira, assegura-se que a amostra flua por entre as membranas e não sobre elas, reagindo com todos os componentes na sequência correta. Se esses pinos e barras forem muito grandes, as membranas podem sofrer uma pressão acima do tolerado a ponto de bloquear o fluxo lateral (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006).

1.2.1.7. Adesivos (cover tapes)

Os adesivos são películas que podem ser usadas como um substituto ao cassete. São geralmente finos, flexíveis, contendo um adesivo de um lado e uma impressão do outro, que pode ser um símbolo, uma cor ou um texto (PONTI, 2009).

a) Definição das características do adesivo

Os adesivos podem ser usados para:

- Identificar o nome e a marca do teste;
- Indicar a orientação do teste por meio de setas;
- Apontar o limite máximo que a tira pode ser mergulhada em um líquido através de uma linha indicadora;
- Diferenciar o produto durante a fabricação por meio de cores e

- Manter pressionado os componentes frágeis (membranas, por exemplo) (PONTI, 2009).

1.2.1.8. Considerações a respeito do processo de produção

Selecionados os componentes que irão compor o kit, deve-se padronizar o processo de produção. Uma fabricação bem-sucedida requer a integração de materiais, reagentes, processos de tratamento e operações de montagem. O processo inteiro pode ser manual ou automatizado. No mínimo são necessários dois equipamentos: uma máquina para a aplicação precisa dos reagentes e uma guilhotina para cortar a placa em tiras individuais (MILLIPORE, c2006).

Existem duas abordagens possíveis e comumente utilizadas no processo produtivo como um todo: o processo descontínuo (*batch process*, do inglês) que utiliza um alto grau de trabalho manual, e o processo em linha (*in-line* ou *reel-to-reel*, do inglês) que minimiza o trabalho manual (O'FARRELL, 2013). O processo descontínuo permite o uso de equipamentos de baixo custo, mas tem a desvantagem de utilizar o trabalho manual em grande parte do processo, gerando uma baixa repetibilidade e frequentemente alta variabilidade do produto. Esse processo é tipicamente utilizado para volumes pequenos de produção. Já no processo em linha, os materiais são impregnados em rolos contínuos de 50-100 m de comprimento até o final do processo de laminação. Isso resulta em um controle melhor do processo, alto rendimento e baixo processamento manual e variabilidade do produto (O'FARRELL, 2013; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Como o processo em linha requer um alto investimento, muitas empresas optam pelo processo descontínuo. Nesse tipo de processo é necessário controlar os seguintes aspectos:

a) Métodos para impregnação dos reagentes na membrana

Atualmente existem basicamente três métodos para aplicação precisa dos reagentes na membrana. O primeiro método utiliza dispensadores de contato (*contact tip dispensers*, do inglês) para aplicação dos reagentes. Esse tipo de dispensador utiliza uma seringa conectada com uma agulha que se move pela

membrana dispensando os reagentes. Como a agulha entra em contato com a membrana, existe a possibilidade de danificar esse material. Apesar disso, esses dispensadores tendem a ser muito confiáveis, requerem pouca manutenção e apresentam um bom custo benefício. O segundo método utiliza dispensadores do tipo não-contato (*noncontact dispensers*, do inglês) que utiliza uma seringa conectada com um gotejador. Esse método tem a vantagem de eliminar o contato entre a agulha e a membrana, evitando danos nesse material. Entretanto, essa máquina requer uma série de cuidados de manutenção e o custo de implementação é alto. O terceiro método utiliza dispensadores do tipo aerógrafo ou spray. Esse dispensador utiliza uma seringa conectada a um compressor e um spray. Esse tipo de dispensador é utilizado para a impregnação do conjugado em membranas que apresentam superfícies irregulares como a fibra de vidro e o poliéster. Os tradicionais fabricantes de dispensadores são a BioDot Inc., a Kinematic Automation e a Imogene Technology (O'FARRELL, 2013).

b) Métodos de laminação

Um ponto fundamental no processo fabril é a etapa de laminação das membranas. Para a tira teste funcionar corretamente, as membranas devem ser sobrepostas umas às outras para que haja um percurso por onde a amostra passará. Esse processo de sobreposição das membranas é chamado de laminação (MILLIPORE, c2006; O'FARRELL, 2013). Se a sobreposição não for feita de forma correta, a membrana pode aparentemente molhar, porém apresentar áreas onde a amostra não flui apropriadamente. Isto pode gerar problemas significativos na uniformidade do ensaio em função de uma passagem lenta ou variável dos reagentes de detecção para a membrana (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006).

Outro ponto importante na laminação é o grau de contato das membranas com o adesivo do *card*. Se houver um contato insuficiente com o adesivo, a força de cisalhamento no processo de corte na guilhotina pode fazer com que as membranas se desprendam do *card* (MANSFIELD, 2009; MILLIPORE, c2006). O ponto chave no processo de laminação é colar as membranas no adesivo da placa alinhando-as corretamente sem comprimir suas estruturas porosas. Em casos extremos, o fluxo poderá ser totalmente obstruído (MILLIPORE, c2006).

Na fabricação de um lote, a laminação pode ser feita usando um dispositivo conhecido como laminador ou pode ser feita totalmente à mão (O'FARRELL, 2013; PONTI, 2009). Nesse último caso, o fator crítico tende a ser a uniformidade com a qual o operador alinha os materiais no adesivo e a pressão que é aplicada nos mesmos. O deslocamento de um milímetro ou menos e diferentes graus de compressão podem ser imperceptíveis visualmente e ainda assim causar uma variação inaceitável no fluxo da corrida (MILLIPORE, c2006).

Os defeitos na laminação aparecem de diversas formas e podem alterar o fluxo da amostra. Uma compressão maior na base de amostra, base de conjugado ou na membrana de nitrocelulose aparece como um fluxo mais lento ou até mesmo ausência de fluxo. Outro defeito facilmente detectável é a passagem inadequada da amostra da base do conjugado para a membrana de nitrocelulose, onde a frente do fluxo aparece de forma irregular ou o conjugado forma listras ao longo da membrana de nitrocelulose (MILLIPORE, c2006).

c) Método de produção das tiras (corte dos cards)

Após a laminação das placas, estas precisam ser cortadas em tiras individuais para serem colocadas no cassete, quando for o caso, e embaladas (O'FARRELL, 2013). A lâmina da guilhotina deve ser capaz de cortar o *card* plástico sem danificar as membranas, que são extremamente frágeis (MILLIPORE, c2006).

Existem basicamente dois tipos de cortadores. Um mais simples que corta as tiras individualmente e tem capacidade de processar cerca de 150 *cards* por hora. E outro mais robusto que corta todas as tiras de uma vez por meio de um rolo cortador, capaz de processar cerca de 1200 *cards* por hora.

A manutenção do equipamento é fundamental para garantir o corte preciso da placa e evitar perdas no processo. O equipamento deve ser limpo frequentemente para retirar o acúmulo de adesivos nas lâminas. Se o acúmulo for grande, o adesivo pode colar nas membranas durante o corte, causando o descolamento das mesmas (MILLIPORE, c2006).

1.3. Hormônio Luteinizante

A família dos hormônios glicoproteicos é constituída por três gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH, da sigla em inglês), o hormônio folículo estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica (CG), e um quarto membro não-gonadotrófico, o hormônio tireoestimulante (TSH) (JIANG; DIAS; HE, 2014). O LH, o FSH e o TSH são secretados pela glândula pituitária anterior, enquanto a CG é secretada pela placenta. Os membros dessa família são proteínas heterodímeras relativamente grandes (30-40 kDa) formadas por uma associação não covalente de uma subunidade α , que é comum para todos os membros da família e uma subunidade β que determina a atividade específica de cada hormônio (HALLAST, 2009; JIANG; DIAS; HE, 2014; PIERCE; PARSONS, 1981).

A subunidade α do LH é codificada por um único gene, localizado no cromossomo 6q21.1-23 e o gene que codifica a subunidade β está situado no cromossomo 19q13.32, próximo aos genes que codificam a subunidade β do hCG (HALLAST, 2009; RYAN¹ et al., 1987 apud RESENDE, 2010, p. 28). A interação não covalente entre as subunidades α e β é estabilizada por um segmento da subunidade β que se estende como um “cinto de segurança” ao redor da subunidade α e é “travado” por uma ponte dissulfeto (HALLAST, 2009).

Os hormônios glicoproteicos LH, FSH e CG exercem funções essenciais no sistema reprodutivo, controlando a produção dos gametas feminino e masculino e dos hormônios esteróides sexuais (HALLAST, 2009). O hormônio luteinizante age no ovário promovendo a ovulação e luteinização dos folículos de Graaf maduros e estimulando a esteroidogênese nas células intersticiais e tecais. Em humanos, o LH também mantém a produção de progesterona do corpo lúteo e exerce um importante papel na formação do estrógeno folicular, agindo sinergicamente com o FSH. Nos homens, esses hormônios agem na manutenção da qualidade e quantidade normal do esperma nos testículos e no desenvolvimento das características sexuais secundárias (HALLAST, 2009; JIANG; DIAS; HE, 2014).

Entre os papéis exercidos pelo LH, destaca-se a maturação dos folículos ovarianos durante o ciclo menstrual. Este é realizado por uma ação conjunta dos hormônios FSH e LH. A liberação desses hormônios é controlada pelo hormônio

¹ RYAN, R. J.; KEUTMANN, H. T.; CHARLESWORTH, M. C. et al. Structure-function relationships of gonadotropins. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 43, p. 383-429, 1987.

liberador de gonadotrofina (GnRH, da sigla em inglês) que é, por sua vez, produzido pelo hipotálamo de forma pulsátil. O ciclo menstrual apresenta em média 28 dias e pode ser dividido em três fases, a fase folicular, que começa no primeiro dia da menstruação e dura em média 12 dias, a fase ovulatória, que apresenta em média 8 dias de duração e um pico de LH no 14º dia, e a fase lútea que dura em média 10 dias e prepara o útero para o início da próxima menstruação (DIREITO et al., 2013; MOGHISSI, 2008; PARK et al., 2007).

No início da fase folicular, os níveis de FSH e LH começam a elevar concomitantemente com o crescimento do folículo e, no fim desta fase, os níveis de FSH declinam, mas os de LH continuam a subir de forma gradual. A segunda fase do ciclo, a fase ovulatória, é caracterizada por um rápido e significativo aumento do LH, culminando em um pico desse hormônio. A ovulação ocorre geralmente 24-48 horas após o pico. O FSH também aumenta no meio do ciclo, mas em menor grau. Após a ovulação, ocorre a terceira fase do ciclo, a fase lútea, onde o folículo se torna altamente vascularizado e o corpo lúteo é formado. Ambos os níveis de LH e FSH mostram um progressivo declínio durante esta fase (MOGHISSI, 2008; PARK et al. 2007).

Diversos métodos são utilizados com o intuito de prever o momento exato da ovulação. Estes são utilizados principalmente por casais que possuem algum problema de fertilidade, que utilizam os métodos para determinar o melhor dia para se estabelecer relações sexuais desprotegidas a fim de aumentarem as chances de gravidez. Os médicos especialistas em fertilidade também empregam essas técnicas para indicar qual o melhor dia para realizar procedimentos como a inseminação artificial (MOGHISSI, 2008). Entre os métodos empregados para determinar a ovulação, utilizam-se as medições diárias dos hormônios no soro ou urina, registro da temperatura corporal basal, observação do mucus cervical e ultrassom do ovário (DIREITO et al., 2013).

Uma forma precisa de se prever a ovulação é a detecção do aumento dos níveis de LH no meio do ciclo, já que este aumento antecede a mesma (PARK et al., 2007). A determinação dos níveis deste hormônio pode ser realizada através da sua quantificação no soro em laboratórios de análises clínicas. O teste exige a coleta diária de amostras de sangue no meio do ciclo para detectar o aumento do LH. Entretanto, retirar amostras de sangue diariamente é incômodo e pouco aceitável para a maioria das pacientes. Por isso, os testes de LH utilizando urina como

amostra são mais aceitos por serem mais simples, não invasivos e, além disso, não sofrem as flutuações da secreção pulsátil do hormônio como o soro (MOGHISSI, 2008; PARK et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram que os níveis de gonadotrofinas no soro e na urina são similares e por isso, os valores encontrados na urina podem ser usados como um reflexo dos mesmos no soro (DIREITO et al., 2013; PARK et al., 2007).

Com o desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais, diversos kits para a determinação rápida do LH se tornaram disponíveis. Estes são baseados em técnicas de imunoensaios e são desenvolvidos para serem utilizados pela paciente em casa, uma ou duas vezes por dia (de manhã e à noite), começando aproximadamente 4 dias antes da suposta ovulação (MOGHISSI, 2008).

A avaliação desses kits foi realizada por diversos grupos e entre os ensaios realizados, destacam-se os testes comparativos utilizando os imunoensaios rápidos com urina e ultrassonografia. O objetivo destes estudos era verificar se a ovulação realmente ocorria após a detecção do pico de LH pelos imunoensaios através da verificação do colapso folicular utilizando ultrassonografia. Como resultado, eles confirmaram que os colapsos foliculares realmente ocorriam entre 24 e 48 horas após o pico de LH (BEHRE et al., 2000; DIREITO et al., 2013; KAWANO; MATSUURA; HONDA, 1992; MILLER; SOULES, 1996; PEARLSTONE; SURREY, 1994). Segundo dados da literatura, os imunoensaios rápidos possuem uma acurácia maior que 90% (MOGHISSI, 2008).

Sendo assim, os kits de detecção de LH na urina se consolidaram como uma ferramenta simples e confiável para prever a ovulação em casa. Esses kits são amplamente recomendados por médicos no tratamento de casais inférteis para se estabelecer a melhor hora da relação sexual e inseminação artificial (MOGHISSI, 2008).

O mercado consumidor para este teste é grande devido ao número crescente de casais que sofrem com a infertilidade. Esta é tipicamente definida como a incapacidade de engravidar após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e atinge cerca de 30% dos casais em idade fértil (FARIA; GRIECO; BARROS, 2012; THOMA et al., 2013). Dentre as causas para o problema, estima-se que 35% são causados por fatores femininos, 35% são causados por fatores masculinos, 20% são causados por uma combinação de fatores femininos e masculinos e 10% são por causas inexplicáveis (FARIA; GRIECO; BARROS, 2012).

Apesar do mercado ser expressivo, há apenas cinco produtos utilizando a metodologia de testes rápidos registrados na ANVISA e apenas um sendo efetivamente comercializado, o CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.). Vale a pena ressaltar que nenhum dos produtos registrados é fabricado no Brasil. Com isso, a oportunidade de inserção de um produto nacional para a detecção desse hormônio é muito boa tanto do ponto de vista comercial da empresa, que terá um mercado grande a ser explorado, quanto para às usuárias, que terão maior acesso ao kit e também a uma assessoria técnica nacional.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é descrever a metodologia para o desenvolvimento e validação de um kit imunocromatográfico seguindo as normas de gestão da ISO 9001:2008 e da ISO 13485:2003 e as boas práticas de fabricação da RDC 16 de 2013. Para isso, tomamos como modelo o desenvolvimento de um kit para detecção do hormônio luteinizante utilizando a plataforma de teste rápido, adotando a mesma estratégia de Meneghisse (2007). Este estudo serve como suporte para a gestão e desenvolvimento de novos projetos em empresas do ramo diagnóstico. Além disso, a obtenção desta tecnologia beneficia a saúde pública nacional por proporcionar avanços tecnológicos no setor. Como resultado, disponibiliza à sociedade brasileira uma ferramenta simples para determinação do pico de LH e consequente ovulação, auxiliando o tratamento de casais com problemas de fertilidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística:

A parte experimental do trabalho foi realizada na WAMA Produtos para Laboratório Ltda., pioneira no desenvolvimento de testes rápidos no Brasil, cujos processos atendem aos padrões internacionais de gestão da qualidade. A empresa é certificada pela BSI (*British Standards Institution*) nas normas ISO 13485 e ISO 9001, pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na GMP (Boas Práticas de Fabricação para Kits Diagnósticos *in vitro* e Equipamentos para Laboratórios), e possui marcações CE na maioria de seus produtos. A empresa forneceu todos os reagentes e infraestrutura necessários para o desenvolvimento desse projeto.

Para a validação do protótipo foram analisadas amostras de urina de mulheres não grávidas, pertencentes à coleção de amostras da empresa ou doadas por um laboratório clínico da cidade. As amostras foram testadas inicialmente com o protótipo de teste rápido desenvolvido neste projeto para pesquisa do hormônio LH. Em paralelo, as amostras foram testadas com um kit comercial disponível no mercado que utiliza a mesma metodologia e também pelo método de quimioluminescência que foi utilizado como padrão ouro nesta análise.

O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos em 23 de fevereiro de 2015, sob Protocolo CAAE nº 38507414.7.0000.5504 (Anexo B). As amostras de urina utilizadas foram previamente coletadas e codificadas pelo laboratório clínico de forma que a identidade dos sujeitos não foi revelada à pesquisadora. Dessa forma, aprovou-se a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os procedimentos foram elaborados com base na legislação brasileira vigente para boas práticas de fabricação, como a RDC 16/2013. Além disso, foram utilizadas as normas ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004/ EN 13485:2012.

O desenvolvimento deste kit não é impedido por nenhuma patente registrada conforme pesquisa realizada à base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

3.2. Planejamento do projeto

3.2.1. Requisitos de funcionamento do produto (dados de entrada do projeto)

A primeira etapa para o desenvolvimento de um kit diagnóstico é a definição dos requisitos de funcionamento do produto que se deseja desenvolver. Esta definição é baseada em uma extensa pesquisa bibliográfica e de mercado, onde é possível conhecer melhor os aspectos clínicos da doença, ou alteração hormonal neste caso, bem como conhecer os produtos que já estão sendo comercializado para este fim. Com isso objetiva-se atender às características existentes e, se possível, aprimorá-las trazendo inovações ao produto que melhorem o diagnóstico ou algum aspecto do seu uso, como maior facilidade ou redução de custo, por exemplo.

A definição das características de funcionamento do produto é de fundamental importância, pois deve nortear a condução dos experimentos de desenvolvimento visando alcançá-las.

Neste documento faz-se um levantamento de todas as características que o kit deve apresentar para nortear a execução dos experimentos na fase de desenvolvimento até que as características aqui definidas sejam alcançadas.

Os dados de entrada que devem ser considerados no planejamento de um teste rápido são:

- 1) Definição da amostra a ser utilizada no teste;
- 2) Volume de amostra a ser utilizado;
- 3) Necessidade do uso de tampão de corrida;
- 4) Número de bandas teste;
- 5) Desenho do teste: sanduíche ou competição;
- 6) Princípio do teste;
- 7) Tempo de leitura;
- 8) Formato do teste: tira ou cassete;
- 9) Sensibilidade clínica e analítica;
- 10) Especificidade;
- 11) Limite de detecção;
- 12) Validade do teste e

13)Custo.

3.2.2. Levantamento das matérias-primas e equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto

Nesta etapa faz-se uma lista de todos os reagentes e equipamentos que serão utilizados no desenvolvimento do projeto e os custos correspondentes. São feitas a identificação e qualificação de fornecedores, buscando aqueles que possuam melhor qualidade de reagente, reprodutibilidade lote a lote, fidelidade ao prazo de entrega, custo acessível e fácil relação comercial.

Alguns passos que devem ser seguidos neste levantamento são:

- 1) Identificação das matérias-primas;
- 2) Identificação dos equipamentos;
- 3) Escolha de fornecedores: nacionais ou estrangeiros;
- 4) Cotação de todos os itens;
- 5) Estimativa do tempo de entrega e
- 6) Pedido de amostra do produto, quando for o caso.

3.2.3. Análise de viabilidade econômica e financeira

Uma etapa importante no planejamento do projeto é a análise de viabilidade econômica e financeira. Na análise econômica são levantados o valor de investimento no projeto, baseados nos custos das matérias-primas, equipamentos e demais despesas necessárias para o desenvolvimento; o preço médio de venda de kits concorrentes, obtido através de uma análise de mercado; preço pretendido de venda e estimativa dos custos de fabricação. Com base na análise econômica é possível estimar se o custo de produção acrescido de uma margem de lucro resultará em um produto com preço competitivo no mercado. Caso o valor seja favorável, a execução do projeto é considerada economicamente viável. Se por outro lado, o valor for desfavorável, a execução do projeto é considerada economicamente inviável e o projeto é interrompido ou reformulado.

Na análise financeira faz-se uma estimativa da quantidade anual de venda do produto, do crescimento de venda anual, das despesas de venda e do capital de giro necessário para a fabricação do produto. Baseado nessas informações é

possível construir o Fluxo de Caixa, onde é possível estimar em quantos anos o investimento no projeto será pago pelas vendas do produto e quando a empresa começará a ter lucro com elas.

Outro parâmetro utilizado na análise financeira é o Valor Presente Líquido (VPL), que é uma função utilizada na análise da viabilidade de um projeto e calculado a partir da soma dos valores do fluxo de caixa descontado. O resultado encontrado na análise é o valor atual (presente) de pagamentos futuros, descontados a uma taxa de juros apropriada, deduzido o custo do investimento inicial (BORGES, [2013?]). Caso o VPL encontrado no cálculo seja negativo, o retorno do projeto será menor que o investimento inicial, sugerindo que o projeto será inviável. Caso ele seja positivo, o lucro obtido com o projeto pagará o investimento inicial, tornando-o viável.

Por fim, uma última função importante para a análise financeira é a Taxa Interna de Retorno (TIR). A TIR é a taxa de desconto que zera o VPL de um projeto. É a taxa necessária para igualar o valor de um investimento (valor presente) com os seus respectivos retornos futuros ou saldos de caixa. Em suma, significa a taxa de retorno de um projeto. Caso a TIR encontrada seja maior que a Taxa Mínima de Atratividade estabelecida pela empresa, o investimento é economicamente atrativo.

Com base em todos os índices calculados na análise financeira, conclui-se se a execução do projeto é viável do ponto de vista financeiro.

Resumidamente, os parâmetros que devem ser considerados para realizar a análise de viabilidade econômica e financeira são:

- 1) Definição do tempo de duração do projeto;
- 2) Definição dos investimentos no projeto;
- 3) Levantamento do custo do produto;
- 4) Estimativa do preço de venda;
- 5) Estimativa da demanda potencial do produto;
- 6) Estimativa do crescimento anual de venda do produto;
- 7) Análise do fluxo de caixa;
- 8) Análise do tempo de retorno do investimento e
- 9) Análise do VPL e TIR para conclusão da viabilidade econômica.

3.2.4. Análise da viabilidade técnica

Na análise de viabilidade técnica são avaliados três pontos principais:

- 1) Análise das necessidades de infraestrutura;
- 2) Identificação da existência de conhecimento técnico para o desenvolvimento do projeto ou a necessidade de aquisição deste conhecimento:
 - a. Treinamentos,
 - b. Transferências de tecnologia,
 - c. Desenvolvimento empírico do conhecimento,
- 3) Análise das necessidades de recursos humanos.

Em primeiro lugar avalia-se se serão necessárias mudanças de infraestrutura devido ao projeto e se o laboratório comporta em espaço e tecnologia os procedimentos que serão empregados. Caso seja necessária alguma mudança, estas deverão ser apontadas juntamente com os custos correspondentes.

Outro aspecto a ser considerado é se o projeto a ser iniciado conta com profissionais disponíveis e com conhecimento adequado para o desenvolvimento do mesmo. Do contrário, é avaliada a contratação de pessoal e aquisição de tecnologia ou treinamento dos profissionais para este fim. Evidentemente, os custos desta etapa devem ser considerados na análise da viabilidade econômica e financeira descrita no item anterior.

Por fim, ainda nesta fase, a ideia proposta no projeto deve ser avaliada através da realização de alguns testes iniciais para verificar se os resultados obtidos indicam que o desenvolvimento do protótipo é viável.

3.2.5. Gerenciamento de risco

O objetivo do gerenciamento de risco é estudar o produto, presumir todos os perigos relacionados ao processo de fabricação do produto e ao seu uso pelo cliente e procurar por meio de medidas e instruções de uso eliminar ou minimizar a ocorrência dos mesmos.

Para fazer o gerenciamento de risco do produto reúne-se todas as equipes envolvidas no projeto e na futura produção do produto e discute-se todos os riscos e

perigos associados a eles. O Gerenciamento de Risco segue as normas da NBR ISO 14971:2009 e pode ser dividido em quatro etapas:

- 1) Plano de Gerenciamento de Risco;
- 2) Relatório de Identificação de Uso e Finalidade;
- 3) Análise de Modo e Efeito de Falha e
- 4) Relatório de Gerenciamento de Risco.

No Plano de Gerenciamento de Risco são delineadas todas as atividades que serão realizadas no Gerenciamento de Risco e definição da equipe responsável.

No Relatório de Identificação de Uso e Finalidade estuda-se o produto, verificando as características relacionadas à segurança do mesmo. Este relatório é produzido respondendo-se uma série de perguntas pré-definidas sobre o assunto.

Na Análise de Modo e Efeito de Falha verificam-se os perigos conhecidos e previsíveis relacionados aos produtos e processos, os riscos de cada perigo, a necessidade de reduzir os riscos para cada perigo identificado, averigua-se se os riscos-benefícios se sobrepõem ao risco residual, se as medidas de controle foram implementadas, se outros perigos foram introduzidos após as medidas de controle a serem implementadas, se todos os perigos identificados foram avaliados e por fim, se o risco residual total é aceitável.

Para finalizar essa etapa redige-se o Relatório de Gerenciamento de Risco, visando deixar claras as ações tomadas mesmo antes da implantação das atividades de produção.

3.2.6. Requisitos estatutários e regulamentares aplicáveis

Nesta etapa do plano de projeto é necessário determinar os seguintes parâmetros:

- 1) Definição do mercado a ser explorado com o produto e
- 2) Definição dos requisitos estatutários e regulamentares que atendem estes mercados.

Nesta fase é importante ter definido claramente qual é o mercado que se pretende atingir com o produto a ser desenvolvido. Se o objetivo é, além de explorar

o mercado nacional, também exportar o produto, se faz necessário conhecer os requisitos estatutários e regulamentares dos países estrangeiros para que durante o desenvolvimento do produto tais requisitos sejam atendidos. Do contrário, o produto poderá enfrentar barreiras e ser impedido de comercializar nestes países resultando em grandes prejuízos para a empresa.

No que diz respeito ao mercado nacional, este documento faz a classificação do produto baseada na classificação de risco da ANVISA, na classificação de risco CE e na certificação do produto. Além disso, listam-se todas as normas aplicáveis e regulamentações às quais o produto está submetido, como o registro do produto na ANVISA, as boas práticas de fabricação, os processos de gestão e produção, o gerenciamento de risco, as rotulagens e informações aos usuários, o descarte de resíduos e o sistema de vigilância.

3.2.7. Requisitos essenciais para projeto em desenvolvimento

Para fazer o levantamento dos Requisitos Essenciais do projeto faz-se uma reunião com o departamento de Gestão de Qualidade e elenca-se os requisitos que o produto deve obedecer e os procedimentos que serão utilizados para isso. Os requisitos essenciais podem ser divididos em:

- 1) Requisitos gerais e
- 2) Requisitos de concepção e fabricação.

Os Requisitos Gerais tratam da segurança do cliente no uso do kit, da preservação do produto durante a data de validade estabelecida e da garantia do comportamento funcional declarado pelo fabricante. Já nos Requisitos de Concepção e Fabricação são analisadas as propriedades químicas e físicas do produto e do processo de fabricação, possível infecção e contaminação microbiana, propriedades relativas à fabricação e ao ambiente, condições de dispositivos que constituem instrumentos ou aparelhos de medição, proteção contra radiações, requisitos de dispositivos médicos ligados numa fonte de energia, condições de dispositivos de autodiagnóstico e informações fornecidas pelo fabricante.

3.3. Desenvolvimento do projeto

3.3.1. Produção de modelos buscando alcançar os dados de entrada

Nesta etapa são testados uma série de materiais para cada componente do kit até se obter uma combinação que atenda aos requisitos de funcionamento do produto previamente estabelecidos. De maneira geral, são estudados e testados reagentes que compõem a banda teste e controle, o conjugado e a base de amostra e como esses componentes interagem para formar a tira de teste rápido.

Para facilitar os ensaios com os protótipos durante o desenvolvimento do produto foram montados alguns painéis compostos por amostras de urina contendo diferentes concentrações do hormônio LH, quantificadas pelo método de quimioluminescência. Outra estratégia utilizada para aumentar a diversidade de amostras foi contaminar amostras de urina contendo originalmente baixa concentração do hormônio com um controle positivo contendo alta concentração, 300 mUI/mL (ARISTA BIOLOGICALS INC.).

Após a caracterização das amostras, estas foram alíquotadas e congeladas a -20°C até o momento do uso. Para conservar a integridade das amostras durante o congelamento adicionou-se glicerol a 7% (v/v) (PARK et al., 2007). Após o descongelamento as amostras ficaram armazenadas em geladeira durante a execução dos testes, sendo congeladas novamente após esse período, que não ultrapassou quatro dias. Evitou-se o congelamento e descongelamento das amostras para não alterar suas propriedades.

3.3.1.1. Banda teste e controle

Tipicamente, no desenvolvimento de um teste rápido, testa-se primeiramente diferentes combinações de anticorpos nas bandas teste e controle. Nesta primeira etapa é possível testar também diversas membranas de nitrocelulose para verificar qual é a mais indicada para esse teste.

Os anticorpos utilizados inicialmente para impregnação da banda teste e controle foram o anticorpo de cabra anti- α LH e o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo, respectivamente. Ambos os anticorpos foram impregnados em uma membrana de nitrocelulose com o auxílio de um equipamento específico para

impregnação. Os nomes dos anticorpos, membranas, fornecedores e equipamentos que foram utilizados no desenvolvimento desse projeto serão mantidos em sigilo por se tratarem de informações confidenciais da WAMA Diagnóstica.

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

3.3.1.2. Conjugado de ouro coloidal

Utilizou-se inicialmente uma solução de ouro coloidal conjugada com anticorpos anti- β LH. O conjugado foi impregnado na membrana de fibra de vidro utilizando um aparelho específico para esta finalidade.

As membranas aplicadas foram secas em estufa a 37°C, por um 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.

3.3.1.3. Laminação da placa

A montagem ou laminação da placa foi feita através da sobreposição das seguintes membranas:

- Membrana de nitrocelulose impregnada com a banda teste e controle;
- Membrana de fibra de vidro impregnada com o conjugado;
- Base de amostra de fibra de vidro previamente tratada;
- Base absorvente.

A montagem deverá obedecer à sequência esquematizada na Figura 2:

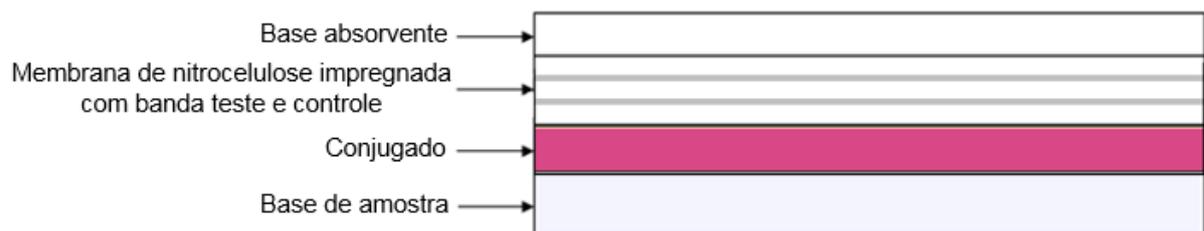


Figura 2 - Estrutura da placa montada mostrando a sobreposição das diversas membranas.

Por último, foram colados adesivos de identificação cobrindo o conjugado, a base de amostra e a base absorvente.

3.3.1.4. Corte da placa em tiras individuais

A placa foi cortada com o auxílio de uma guilhotina rotativa, ajustando-a para tiras de 4mm. As tiras permaneceram guardadas em câmara desumidificadora, à temperatura ambiente, até o momento do uso.

3.3.2. Avaliação do desempenho do protótipo

As diversas combinações de reagentes devem ser testadas com um painel de amostras conhecidas até a obtenção do protótipo final. A combinação ideal do protótipo é encontrada quando se observa um resultado concordante com os valores esperados dos controles, e quando se consegue a reprodução desses resultados em testes fabricados em dias diferentes e/ou com lotes de matérias-primas diferentes.

A reprodução dos resultados é importante para simular uma condição real de produção do teste, onde o kit desenvolvido deve apresentar sempre os mesmos resultados independente do dia que foi fabricado ou do lote de matérias-primas utilizados. Para isso é necessário também que os fornecedores tenham uma constância na qualidade de seus reagentes para não prejudicar a fabricação do produto final. Isso ressalta a importância de se qualificar os fornecedores ainda na fase de desenvolvimento do produto.

O protótipo deste trabalho foi testado inicialmente utilizando-se o controle LH Standard (ARISTA BIOLOGICALS) que possui uma alta concentração do hormônio LH. O controle foi diluído para simular diversas concentrações do hormônio na urina, conforme descrito no item 3.3.1.

O teste foi realizado da seguinte maneira: as tiras foram mergulhadas verticalmente nos controles até a posição indicada no adesivo de identificação por 10-15 segundos. Em seguida, as tiras foram colocadas em uma superfície plana, não absorvente. Com o auxílio de um cronômetro, o resultado foi lido em 10 minutos, onde apareceram uma ou duas linhas coloridas. Não foram considerados resultados gerados após 10 minutos de reação.

3.3.3. Análise de embalagem e rotulagem

Obtido o protótipo, inicia-se a análise de embalagem e rotulagem do produto. Nesta fase são definidas as apresentações do kit, os rótulos que serão utilizados nos sachês que conterão as placas e na caixa seguindo as normas vigentes RDC 206/2006, NBR ISO 15223-1:2010/ EN 15223-1:2012 e NBR ISO 15223-2:2013 e a embalagem final do produto. Essas decisões são tomadas conjuntamente pelas equipes de desenvolvimento, embalagem, gestão da qualidade, produção e comercial em uma reunião onde são considerados o público alvo do produto, a legislação vigente e o custo da embalagem.

Outra possibilidade é a embalagem ser determinada pelo distribuidor do produto, que venderá o kit com sua marca e por isso poderá solicitar uma embalagem diferenciada.

Cada dispositivo deve ser acompanhado das informações necessárias para a sua utilização correta e com segurança, tendo em conta a formação e os conhecimentos dos potenciais usuários. Essas informações estão contidas nos rótulos e instruções de uso do produto. As instruções de uso devem ser incluídas nas embalagens dos dispositivos conforme as normas RDC 206/2006, RDC 16/2013, NBR ISO 13485:2004/ EN 13485:2012 e NBR ISO 14971:2009.

Em relação ao rótulo, segundo as normas vigentes RDC 206/2006, NBR ISO 15223-1:2010/ EN 15223-1:2012 e NBR ISO 15223-2:2013, o rótulo deve conter as seguintes informações, as quais, se adequado, podem ser representadas por símbolos:

- Nome do fabricante;
- Informações estritamente necessárias para que os usuários possam identificar de forma inequívoca o dispositivo e o conteúdo da embalagem;
- Se adequado, a menção "esterilizado";
- O código do lote;
- Se necessário, a data-limite de uso, sem degradação do seu comportamento funcional, expressa pela ordem do ano, do mês e, se relevante, do dia;
- Se aplicável, a indicação de que se trata de um dispositivo para utilização *in vitro*;
- Quaisquer condições especiais de armazenamento e/ou manipulação;
- Se adequado, quaisquer instruções de uso especial;

- Quaisquer advertências e/ou precauções e
- Se se tratar de dispositivo de autodiagnóstico, a menção clara desse fato.

3.4. Validação do protótipo

Terminado o desenvolvimento do produto inicia-se a fase de validação cujos objetivos são avaliar o desempenho do kit, garantir que as instruções de uso estejam bem definidas, avaliar a dimensão dos erros aleatórios e sistemáticos, estabelecer condições ideais de uso e desenvolver um plano de controle de qualidade para validar sua eficiência prospectivamente (MENEGHISSE, 2007).

Segundo a RDC 16/2013, a validação é a confirmação por análise e evidência objetiva que um procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema, realmente conduzem aos resultados esperados.

Esta fase é composta pelos estudos de estabilidade, sensibilidade e especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade, testes clínicos, entre outros.

Os estudos a serem realizados estão descritos abaixo.

3.4.1. Produção de três lotes pilotos

Estabelecido um protótipo, faz-se a produção de três lotes pilotos utilizando matérias-primas de lotes diferentes e dias de fabricação diferentes para simular uma futura produção comercial. Nesta etapa é possível verificar a clareza e eficiência dos procedimentos descritos e propor melhorias no processo.

3.4.2. Avaliação dos lotes pilotos

Após a fabricação dos lotes pilotos inicia-se a fase de avaliação dos mesmos, testando-os com as amostras escolhidas na fase de planejamento do projeto. Os resultados são comparados com o teste considerado padrão-ouro para aquela doença e com um teste que utiliza a mesma metodologia do protótipo. A partir dessas comparações é possível determinar parâmetros como sensibilidade e especificidade, que servirão para avaliar o desempenho do protótipo.

3.4.2.1. Testes com o kit desenvolvido – IMUNO-RÁPIDO LH

As amostras de urina a serem testadas seguiram o procedimento descrito no item 3.3.2.

3.4.2.2. Teste de Sensibilidade e Especificidade

Para os testes de sensibilidade e especificidade, compararam-se os resultados obtidos com o uso do kit em desenvolvimento com um teste considerado padrão ouro. Para isso, as amostras foram testadas com a técnica de quimioluminescência utilizando o aparelho Beckman Unicel Dxl800 (BECKMAN COULTER).

O teste de LH da BECKMAN COULTER é um ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche. A amostra contendo LH é adicionada ao tubo de reação, juntamente com partículas paramagnéticas ligadas com anticorpos de carneiro anti-camundongo, anticorpos de camundongo anti-LH e tampão Tris com proteína. O LH da amostra se liga aos anticorpos de camundongo anti-LH, que por sua vez se ligam às partículas paramagnéticas ligadas com anticorpos de carneiro anti-camundongo. Aplica-se então, um campo magnético que separa os componentes ligados às partículas paramagnéticas dos não ligados. As substâncias que não se ligaram são removidas através de uma lavagem. Em seguida, adiciona-se o anticorpo de carneiro anti-LH conjugado com fosfatase alcalina que se liga ao LH da amostra previamente ligado ao anticorpo de camundongo anti-LH e às partículas paramagnéticas conjugadas com anticorpos de carneiro anti-camundongo. Uma segunda etapa de separação e lavagem remove as substâncias não ligadas. Um substrato quimioluminescente, Lumi-Phos[®] 530, é adicionado ao tubo de reação e a luz gerada pela reação entre o substrato e a fosfatase alcalina é mensurada com um luminômetro. A produção de fótons é proporcional à quantidade de LH na amostra. A quantidade do analito na amostra é determinada através de uma curva de calibração armazenada no aparelho (POWERS, 2011).

Com base nos resultados obtidos através da comparação entre o teste desenvolvido e o teste de quimioluminescência, faz-se uma análise utilizando cálculos estatísticos diagnósticos, onde são determinadas a sensibilidade e a especificidade do kit desenvolvido.

3.4.2.3. Teste de Sensibilidade Analítica

Segundo a RDC 206 de 2006 o teste de Sensibilidade Analítica é feito com o intuito de detectar a menor quantidade do analito em uma reação. Para isso, faz-se uma série de diluições do analito de interesse em concentrações próximas e investiga-se até qual concentração o teste diagnóstico é capaz de detectar com determinado nível de confiança.

No caso do teste rápido desenvolvido, a análise de sensibilidade analítica investiga se o teste é capaz de diferenciar amostras diluídas em concentrações acima e abaixo do *cut-off* estabelecido e a partir de qual concentração ele passa a identificar a amostra como Reagente.

3.4.2.4. Estudo comparativo de desempenho com kit comercial

O teste tem por finalidade demonstrar que o produto desenvolvido apresenta desempenho igual ou superior aos kits existentes no mercado. Esse tipo de comprovação é solicitada para o registro do produto, já que não é de interesse do mercado lançar um kit com qualidade inferior aos já existentes.

No caso do teste rápido LH, as amostras de urina devem ser testadas com um kit similar disponível no mercado, o CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.), seguindo as recomendações do fabricante:

O envelope contendo a tira é aberto e a tira Confirme Fertilidade é retirada pelo suporte verde indicado na figura contida na bula do produto. Coloca-se a ponta absorvente, verticalmente, dentro do recipiente com urina durante trinta segundos, tomando o cuidado para não ultrapassar o limite máximo indicado pelo adesivo de identificação. Coloca-se a tira sobre uma superfície plana, limpa, seca e não absorvente. Aguarda-se pelo menos cinco minutos para ler o resultado.

O teste é considerado como positivo quando a intensidade da linha da área teste for igual ou mais forte que a da área controle. Este resultado indica que a concentração de LH na urina está no seu pico (acima de 35 mUI/mL – *cut-off* adotado pelo teste), ou seja, provavelmente ocorrerá o processo de ovulação (CONFIRME FERTILIDADE, 2013).

O teste é lido como negativo quando a intensidade da linha da área teste for menor que a da área controle ou se a linha aparecer somente na área controle, o que indica que a concentração de LH na urina está no seu nível basal (nível normal).

Por fim o teste é considerado inválido quando não houver o aparecimento de nenhuma linha na área controle.

Nesta análise serão testadas 292 amostras de urina e o teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.) será considerado padrão ouro. A partir dessa comparação será possível calcular o índice kappa (κ) que indica o grau de concordância entre os testes (BLAS, c2006). Todas as amostras serão quantificadas pela técnica de quimioluminescência.

Teste de sensibilidade e especificidade – CONFIRME FERTILIDADE

Nesta fase também será feita uma segunda análise, comparando-se desta vez o teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.) e o teste de quimioluminescência automatizado Beckman Unicel Dxl800 (BECKMAN COULTER), utilizado como padrão-ouro nessa análise.

O teste tem por objetivo determinar a sensibilidade e a especificidade do teste comercial e comparar seu desempenho com o teste desenvolvido nesse trabalho.

3.4.2.5. Teste de Reprodutibilidade

O teste de Reprodutibilidade avalia a habilidade do teste em produzir resultados consistentes quando realizados independentemente (operador, dia e lotes diferentes) e sob as mesmas condições (mesmas amostras) (ANDRADE; ZICKER, 1997).

Para isso, seleciona-se uma variedade de amostras, sendo algumas positivas e outras negativas. Essas amostras são testadas com lotes, operadores e dias diferentes e devem gerar sempre os mesmos resultados.

3.4.2.6. Teste de Repetibilidade

O teste de Repetibilidade tem por finalidade determinar se o kit desenvolvido repete seus resultados quando testado várias vezes sob as mesmas condições (mesmo dia, mesmo operador, mesmas amostras e mesmo conjunto de pipetas).

Para isso, seleciona-se uma variedade de amostras, sendo algumas positivas e outras negativas. Essas amostras são testadas com o mesmo lote, mesmo operador e mesmo dia e devem gerar sempre os mesmos resultados.

3.4.2.7. Análise de Interferentes

Esta análise tem como objetivo identificar os interferentes, que podem ser definidos como qualquer substância presente na amostra capaz de alterar a concentração do analito ou a ligação do anticorpo em um imunoenensaio (HERMES PARDINI, 2010; TATE; WARD, 2004). Podem ser divididos em duas classes: dependente do analito e não dependente do analito (HERMES PARDINI, 2010; TATE; WARD, 2004).

A primeira se refere à interação entre constituintes da amostra e um ou mais anticorpos reagentes. Como exemplo desse tipo de interferente podemos citar a reação cruzada do anticorpo do ensaio com outros compostos quimicamente diferentes, mas estruturalmente similares, anticorpos heterofílicos, anticorpos humanos anti-animal, fator reumatóide, autoanticorpos e outras proteínas, como a albumina, complemento e lisozimas (HERMES PARDINI, 2010; TATE; WARD, 2004).

Já a interferência não dependente do analito é oriunda de fatores pré-analíticos como tipo de amostra, armazenamento inadequado da amostra, hemólise, lipemia e uso de anticoagulantes (HERMES PARDINI, 2010; TATE; WARD, 2004).

A RDC 206 de 2006 preconiza que as Instruções de Uso de produtos para autoteste devem conter orientações sobre os fatores interferentes que contra indiquem o uso da amostra, bem como os efeitos decorrentes da presença de proteínas, lipídeos, hemólise e outros interferentes.

No caso do teste IMUNO-RÁPIDO LH, utilizam-se nos testes de interferentes amostras sabidamente negativas para o hormônio LH, mas que apresentam uma

alta concentração dos hormônios FSH, TSH e hCG e avalia-se se estas substâncias interferem no resultado esperado do teste.

3.4.2.8. Análise de estabilidade em tempo real e acelerada

Os testes de estabilidade são feitos para garantir que o kit desenvolvido mantém suas características e funcione corretamente durante todo o prazo de validade do produto sob condições ideais de armazenamento. Para isso, o kit é submetido a testes de “Estabilidade em Tempo Real” e “Estabilidade Acelerada”.

3.4.2.8.1. Teste de Estabilidade Acelerada

Nos testes de “Estabilidade Acelerada” o kit é submetido a altas temperaturas para acelerar a degradação até que este atinja limites estabelecidos previamente que tornem o uso do produto inaceitável. A degradação do produto armazenado em condições adversas é comparada à degradação do produto armazenado em condições ideais e é possível estabelecer uma correlação entre elas que irá indicar, por exemplo, que a degradação do produto armazenado 7 dias em estufa a 65°C corresponde à degradação de 2 anos quando este é armazenado em condições ideais. Sendo assim, se o produto mantiver suas características e bom desempenho após 7 dias em estufa a 65°C, assegura-se que ele manterá suas características durante 2 anos armazenado em condições ideais. Portanto, é possível estabelecer de forma rápida a validade do produto, tornando viável a produção do kit.

Espera-se que, com a perda da estabilidade, ocorra uma queda na reatividade das amostras, indicado pela perda de reatividade das amostras positivas. As amostras negativas são testadas como controle para verificar se a degradação do kit não afeta a negatividade das mesmas (MENEGHISSE, 2007).

É importante ressaltar que essa relação muda de um produto para outro e até mesmo de um componente do kit para outro. Por isso, é necessário realizar um estudo minucioso para conseguir estabelecer esse tipo de relação.

É recomendado que o controle de qualidade faça a estabilidade acelerada de cada lote produzido para verificar se o lote se manterá estável pelo prazo de validade estipulado. A perda da estabilidade de um kit é observada quando um dos

critérios de aceitação da Instrução de Uso do kit não for atendido (MENEGHISSE, 2007). Recomenda-se também que seja feita a estabilidade em tempo real dos primeiros lotes produzidos para verificar se a correlação entre as estabilidades reais e acelerada estão corretas (MENEGHISSE, 2007).

Os estudos de estabilidade específicos para kits diagnósticos são escassos na literatura e não possuem normativas bem estabelecidas como outros produtos, como por exemplo, os estudos de estabilidade de medicamentos, que são amplamente estudados e possuem normas claras na legislação (MENEGHISSE, 2007). Por isso, os testes de estabilidade são feitos com base no conhecimento do produto e na troca de experiência com outros fabricantes do setor.

3.4.2.8.2. Teste de estabilidade em tempo real

Nos testes de “Estabilidade em Tempo Real” o produto é armazenado em condições ideais de armazenamento e são realizados testes periódicos ao longo do prazo de validade para avaliar se o kit mantém sua especificidade e sensibilidade apesar da degradação natural do produto. É natural que haja uma queda na reatividade do kit ao longo de seu período de validade em função da degradação natural dos componentes. Todavia, não é aceitável que esse decaimento altere os parâmetros de sensibilidade e especificidade do kit (MENEGHISSE, 2007).

3.4.3. Validação externa

Além da validação interna do produto, é necessária também uma validação externa do kit. Na validação externa os testes são enviados a um laboratório clínico para serem avaliados. Neste laboratório ele será avaliado nos seguintes aspectos:

- a) Eficácia,
- b) Facilidade de uso,
- c) Compreensão das instruções de uso e
- d) Avaliação geral de um cliente final.

Ao final da avaliação será gerado um relatório ou parecer que deverá ser anexado à documentação do projeto.

3.4.4. Oficialização das fichas técnicas de produção

Terminada a fase de avaliação dos lotes piloto, fazem-se a elaboração e oficialização das fichas técnicas de fabricação, fichas técnicas de embalagem e fichas técnicas de repartição no sistema da empresa. As fichas são redigidas e avaliadas quanto à clareza das instruções de fabricação do produto.

3.4.5. Cadastro de matérias-primas e fornecedores

Nesta fase todas as matérias-primas e fornecedores que foram validados para a fabricação do produto são cadastrados no sistema de qualidade e no sistema computacional da empresa.

3.4.6. Elaboração das Instruções de uso

Confirmada a funcionalidade do produto redigem-se as instruções de uso que acompanham o kit. Nela são apresentados uma breve explicação clínica, o uso pretendido do teste, os reagentes contidos no kit, as precauções de uso, as informações de armazenamento e estabilidade, as instruções para coleta e preparo da amostra, os materiais fornecidos, os materiais necessários mas não fornecidos, as instruções de uso, a interpretação dos resultados, as limitações do teste, os interferentes e as características de desempenho.

3.4.7. Revisão do Gerenciamento de Risco

Nesta etapa faz-se uma revisão do Gerenciamento de Risco incluindo os perigos identificados nas fases de desenvolvimento e validação do protótipo, bem como as ações tomadas para mitigar os riscos. Uma nova revisão das atividades de gerenciamento de risco ocorre quando há informações de mau funcionamento, de mau uso, de acidentes com usuários ou pacientes; quando ocorrem alterações de projetos ou processos; quando ocorrem reclamações de clientes, não conformidades que interfiram no processo ou projeto dos produtos e quando há alterações na infraestrutura da empresa, a qual interfira no processo de produção do produto.

3.4.8. Elaboração do relatório técnico e registro na ANVISA

Nesta etapa é redigido um relatório técnico que é encaminhado à ANVISA para registro do produto. Esse dossiê é encaminhado juntamente com o comprovante de pagamento das taxas aplicadas, uma cópia da licença de funcionamento do estabelecimento, um modelo de rótulos, um modelo das instruções de uso, o certificado de boas práticas de fabricação e controle, além de outros documentos referentes à comercialização do produto. A obrigatoriedade desses documentos difere quanto ao tipo de fornecedor, fabricante ou importador, e quanto à classe de risco do produto.

3.4.9. Lançamento do produto e finalização do projeto

Após a aprovação do registro pela ANVISA, o produto pode ser fabricado em escala comercial e a empresa faz o lançamento do produto por meio de diferentes mídias, como televisão, revistas, páginas de internet e redes sociais. A partir desse momento considera-se o projeto como finalizado.

É importante ressaltar que mesmo após o lançamento do produto o kit continua sendo avaliado no mercado. Qualquer falha no desempenho do kit ou mesmo uma perda da estabilidade deve ser reportado imediatamente à empresa que deverá recolher o kit do mercado e fazer testes para descobrir o que causou a falha. É comum que alguns aspectos no desempenho do teste ou mesmo alguns interferentes sejam identificados após o lançamento do produto, com o uso do kit sendo feito por um público maior e mais diversificado que o utilizado na etapa de validação. Por isso, o kit deve ser sempre monitorado e constantemente melhorado para atender as normas de boas práticas de fabricação e de garantia de qualidade.

4. RESULTADOS

4.1. Planejamento do projeto

4.1.1. Requisitos de funcionamento do produto (dados de entrada do projeto)

Os requisitos de funcionamento propostos para esse projeto foram:

O teste imunocromatográfico LH será composto por uma série de membranas sobrepostas por onde a amostra de urina fluirá verticalmente reagindo com os componentes secos impregnados nas membranas. A primeira membrana que a amostra entrará em contato será a base de amostra composta usualmente por uma fibra de vidro tratada com um tampão, cuja função é ajustar o pH da amostra e possibilitar que esta flua com facilidade.

A próxima membrana é a base do conjugado, impregnada com ouro coloidal conjugado com anticorpos monoclonais anti- β LH. O LH presente na amostra se ligará ao ouro coloidal conjugado com anticorpos monoclonais anti- β LH. Esse complexo migra para a membrana de nitrocelulose onde irá interagir primeiramente com os anticorpos anti- α LH impregnados na banda teste. O LH presente na amostra, previamente ligado ao ouro coloidal, irá se ligar nessa região e o acúmulo de conjugado gerará um sinal visível de coloração vinho arroxeadada. O excesso de conjugado não ligado continuará a migrar pela membrana de nitrocelulose e encontrará a banda controle composta por um anticorpo anti-IgG de camundongo, que irá reconhecer o anticorpo anti- β LH produzido em camundongo. O acúmulo de conjugado nessa área gerará uma segunda banda de coloração vinho arroxeadada, validando o teste.

A quantidade de LH na amostra será estimada através da comparação da intensidade das cores das bandas teste e controle. Se a cor da banda teste for mais clara que a cor da banda controle, significará que a concentração de LH na amostra está abaixo de 30 mUI/mL. Se a cor da banda teste for igual à cor da banda controle, significará que a concentração de LH na amostra é igual a 30 mUI/mL. Por fim, se a coloração da banda teste for mais forte que a banda controle, significará que a concentração de LH na amostra está acima de 30 mUI/mL.

O kit deverá ser composto por 5 tiras que deverão ser utilizadas uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, tomando-se a precaução de diminuir a ingestão de

líquidos e não urinar por 2 horas antes da coleta para haver a uniformização do hormônio na urina.

Seguindo os parâmetros utilizados pelos testes disponíveis no mercado, o kit deverá apresentar sensibilidade analítica de 30 mUI/mL (BEHRE et al., 2000; STRAUSS e BARBIERI, 2009c), sensibilidade clínica de 97% e especificidade de 97%. Além disso, é necessário que todos os reagentes tenham estabilidade de pelo menos um ano para viabilizar a comercialização do mesmo.

4.1.2. Levantamento das matérias-primas e equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto

Elaborou-se inicialmente uma lista de reagentes necessários para início dos experimentos. Essa lista foi então classificada considerando os produtos já existentes na empresa e aqueles ainda não utilizados. Em relação aos últimos reagentes, foi realizada uma pesquisa na internet buscando fornecedores potenciais, os quais foram contatados para obtenção de cotações dos respectivos reagentes.

Foram encontrados apenas fornecedores estrangeiros para os principais reagentes, como os anticorpos anti- α LH e anti- β LH conjugado ao ouro coloidal, assim como as diferentes membranas definidas para uso no teste. A eles foram solicitadas amostras para avaliação.

Os nomes das matérias-primas, fornecedores e equipamentos utilizados foram mantidos em sigilo por se tratarem de informações confidenciais da WAMA Diagnóstica.

4.1.3. Análise de viabilidade econômica e financeira

De acordo com a análise econômica, observou-se que o custo de fabricação estimado para a fabricação do kit com 5 testes é muito inferior ao custo variável máximo calculado. Em relação à análise financeira, fez-se o fluxo de caixa, baseado na quantidade anual de venda, crescimento anual e preço de venda do produto e calculou-se o Valor Presente Líquido (VPL) e a Taxa Interna de Retorno (TIR). O Fluxo de Caixa acumulado mostrou que o investimento no projeto seria pago em dois anos, o valor de VPL encontrado foi de +R\$ 35.971,00 e o TIR foi de 52,218%, que é maior que a Taxa Mínima de Atratividade estabelecida pela empresa (10%).

Com base em todos os índices calculados concluiu-se que a execução do projeto era viável do ponto de vista econômico e financeiro.

4.1.4. Análise de viabilidade técnica

A análise da viabilidade técnica mostrou que não seriam necessárias mudanças de infraestrutura devido ao projeto, uma vez que o laboratório existente na empresa comportava em espaço e tecnologia tais procedimentos. Não foi necessária a contratação de profissionais para esse fim, pois a equipe contava com um pesquisador disponível. O conhecimento técnico foi desenvolvido com o auxílio de treinamentos e transferência de tecnologia fora do país.

Nesta etapa também foram feitos alguns testes iniciais que indicaram que o desenvolvimento do protótipo seria viável.

4.1.5. Gerenciamento de Risco

Fez-se o gerenciamento de risco do projeto em uma reunião com as equipes de Pesquisa e Desenvolvimento, Gestão da Qualidade, Controle de Qualidade, Produção e Embalagem. Nesta reunião previram-se os riscos e perigos associados à produção e ao uso do produto. Avaliaram-se todos os perigos identificados e criaram-se medidas de controle a serem implementadas.

Nas fases de desenvolvimento e validação do produto foram feitas revisões do Gerenciamento de Risco, acrescentando novos riscos encontrados durante o contato constante com o produto. Tais riscos não são possíveis de serem previstos na fase de planejamento do projeto. Alguns perigos levantados e as respectivas medidas de controle adotadas podem ser conferidas na tabela 1.

Tabela 1 - Perigos e Ações Recomendadas levantados durante o Gerenciamento de Risco do teste rápido LH.

Tipo de perigo	Modo Potencial de Falha	Causa	Efeito Potencial da Falha	Ações Recomendadas
Rotulagem inadequada	Troca de Identificação do produto	Erro do operador	Diagnóstico errado	Criar procedimentos de inspeção e monitoramento do processo.
Instrução de uso inadequada	Texto pouco explicativo ou mal escrito	Processo documental falho	Uso incorreto do produto	Realizar inspeções e descrever uma sistemática de revisão de bulas - atualização das regulamentações pertinentes.
Preparação das amostras	Amostras inadequadas	Amostras com hCG	Falso positivo	Incluir orientações na bula.
Falha no processo de fabricação	Erro de diluição de antígenos/ anticorpos	Erro do operador	Resultado inespecífico	Criar procedimentos de inspeção e monitoramento do processo e produto.
Pós-Venda	Intensidade da Banda Teste	Dúvida de resultado	Dúvida na interpretação	Melhorar a descritiva na bula.
Quantidade Incorreta	Quantidade de testes diferente da apresentação	Erro do operador	Reposição do material/ reclamação de cliente	Criar procedimentos de inspeção e monitoramento do processo e produto.
Medição Incorreta	Tempo de Leitura	Erro do usuário	Diagnóstico errado	Criar uma sistemática de pós-venda.
Lote não-homogêneo	Variação de resultados	Falha no processo produtivo	Resultados inconsistentes	Criar procedimentos de inspeção e monitoramento do processo e produto.
Problemas de estabilidade	Armazenamento inadequado	Armazenamento fora de temperatura/ umidade	Perda de estabilidade	Incluir orientações na bula.

4.1.6. Requisitos estatutários e regulamentares aplicáveis

Fez-se um levantamento de todas as normas que seriam aplicáveis a esse projeto. O registro do produto seguirá a RDC 206 de 11/2006 e a RDC 16 de 03/2013; as boas práticas de fabricação seguiram a RDC 16 de 03/2013, os processos de gestão e produção seguiram entre outras normas, a NBR ISO 9001:2008 e a NBR ISO 13485:2004/ EN 13485:2012; o gerenciamento de risco seguiu a NBR ISO 14971:2009; as rotulagens e informações aos usuários

obedeceram a NBR ISO 15223-1:2010 e a 15223-2:2013; o descarte de resíduos seguiu a RDC 306 de 12/2004 e por fim, o sistema de vigilância CE obedeceu a MEDDEV 2.12-1 – ver.8.

4.1.7. Requisitos essenciais para projeto em desenvolvimento

Os requisitos essenciais desse projeto seguiram a Diretiva 98/79 IVD. Fez-se o levantamento das condições que o teste deveria apresentar e as normas que seriam seguidas para atender essas condições.

Como exemplo, pode-se citar a condição: “Os dispositivos de autodiagnóstico devem ser concebidos e fabricados de forma a garantir que o dispositivo seja de fácil utilização em todas as fases do seu manuseio e a reduzir tanto quanto possível os riscos dos usuários em cometer erros na manipulação do dispositivo e na interpretação dos resultados”. Para atender tal condição foram colocados procedimentos claros nas Instruções de Uso do produto, seguindo as normas NBR ISO 15223-1:2010/ EM 15223-1:2012, NBR ISO 15223-2:2013, RDC 206/2006 e NBR ISO 14971:2009.

Outra condição levantada foi: “Os dispositivos devem demonstrar os comportamentos funcionais declarados pelo fabricante em termos de sensibilidade analítica, sensibilidade de diagnóstico, especificidade analítica, especificidade de diagnóstico, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, incluindo interferentes e limites de detecção.”. A condição é atendida através do Relatório Técnico, de acordo com a norma NBR ISO 13485:2004/ EN 13485:2012.

4.2. Desenvolvimento do projeto

4.2.1. Produção de modelos buscando alcançar os dados de entrada

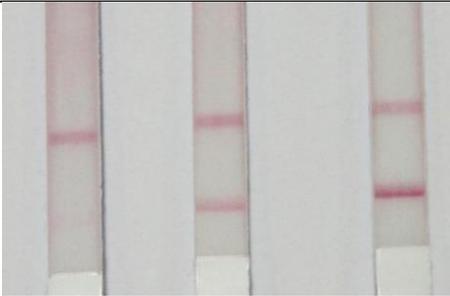
A tira teste é composta por uma série de membranas sobrepostas impregnadas com reagentes secos que interagem entre si gerando bandas coloridas, visíveis a olho nu. A interação entre os diversos componentes irá determinar o desempenho da tira e o correto funcionamento do teste. Por esse motivo, foram testadas várias opções de reagente para cada componente do kit.

4.2.1.1. Membrana de nitrocelulose

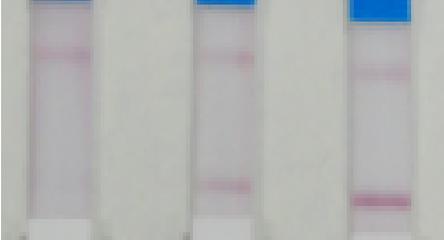
Utilizou-se no início dos testes uma membrana de nitrocelulose cuja qualidade já havia sido comprovada através de projetos anteriores, apesar do alto custo. Fixada a membrana, variaram-se os outros componentes até alcançar uma combinação ideal, onde o *cut-off* do teste ficasse em 30 mUI/mL e as bandas ficassem com uma boa intensidade de cor no tempo de leitura indicado, de 10 minutos. Encontrada a combinação ideal variou-se a membrana de nitrocelulose. Testaram-se diferentes marcas e diferentes especificações até encontrar uma que apresentasse um bom desempenho e custo acessível. Após a seleção da membrana, foram necessários alguns ajustes finos nos demais componentes do teste.

As combinações de anticorpos e conjugado testadas com as quatro membranas utilizadas são mostradas na tabela 2. Para manter o sigilo dos dados, a membranas foram codificadas como A, B, C e D.

Tabela 2 - Combinações de anticorpos e conjugado testadas com as membranas A, B, C e D. A melhor combinação de cada membrana se encontra em negrito e o resultado de tal combinação com amostras de baixa, média e alta concentração se encontra no final de cada tabela.

Membrana A		
Componente	Nome	Concentração
Banda teste	Monoclonal Anti-α LH 1*	0,3 mg/mL
		0,4 mg/mL
		0,5 mg/mL
	0,7 mg/mL*	1,0 mg/mL
Banda teste	Monoclonal Anti- α LH 2	0,5 mg/mL
		0,7 mg/mL
		1 mg/mL
Banda teste	Anticorpo policlonal de cabra anti- α LH	1 mg/mL
		1,25 mg/mL
		1,5 mg/mL
		2 mg/mL
		2,5 mg/mL
Banda Controle	Anticorpo de cabra anti-IgG camundongo	0,2 mg/mL
		0,3 mg/mL*
		0,4 mg/mL
		0,5 mg/mL
Conjugado	Anti- β LH conjugado com ouro coloidal	0,175 μ l/mm
		0,225 μl/mm*
Melhor Combinação		
		
	1,65 mUI/mL	22,3 mUI/mL
		69,5 mUI/mL

Membrana B			
Componente	Nome	Concentração	
Banda teste	Monoclonal Anti- α LH 1*	0,3 mg/mL	
		0,4 mg/mL	
		0,5 mg/mL	
	0,7 mg/mL*	1,0 mg/mL	
	Monoclonal Anti- α LH 2	0,5 mg/mL	
		0,7 mg/mL	
		1 mg/mL	
	Anticorpo policlonal de cabra anti- α LH	1,25 mg/mL	
		1,5 mg/mL	
		2 mg/mL	
		2,5 mg/mL	
Banda Controle	Anticorpo de cabra anti-IgG camundongo	0,15 mg/mL	
		0,2 mg/mL	
		0,25 mg/mL	
		0,3 mg/mL*	
		0,4 mg/mL	
		0,5 mg/mL	
Conjugado	Anti- β LH conjugado com ouro coloidal	0,225 μl/mm*	
Melhor Combinação			
			
	1,65 mUI/mL	22,3 mUI/mL	69,5 mUI/mL

Membrana C		
Componente	Nome	Concentração
Banda teste	Monoclonal Anti-α LH 1*	0,7 mg/mL 1,0 mg/mL*
	Anticorpo policlonal de cabra anti- α LH	1 mg/mL 1,25 mg/mL 1,5 mg/mL
Banda Controle	Anticorpo de cabra anti-IgG camundongo	0,2 mg/mL* 0,3 mg/mL 0,4 mg/mL 0,5 mg/mL
Conjugado	Anti- β LH conjugado com ouro coloidal	0,225 μl/mm* 0,25 μ l/mm 0,275 μ l/mm
Melhor Combinação		
		
1,65 22,3 69,5 mUI/mL mUI/mL mUI/mL		

Membrana D		
Componente	Nome	Concentração
Banda teste	Monoclonal Anti-α LH 1*	0,7 mg/mL*
Banda Controle	Anticorpo de cabra anti-IgG camundongo	0,2 mg/mL 0,3 mg/mL 0,4 mg/mL*
Conjugado	Anti- β LH conjugado com ouro coloidal	0,225 μl/mm* 0,25 μ l/mm 0,275 μ l/mm
Melhor Combinação		
		
1,65 22,3 69,5 mUI/mL mUI/mL mUI/mL		

A tabela 2 mostra os quatro tipos de membrana utilizadas e as combinações de reagentes utilizadas com cada uma delas. A melhor combinação de cada membrana está destacada em negrito. Cada combinação foi testada com padrões diluídos do Hormônio Luteinizante e com algumas amostras de urina quantificadas pelo método de quimioluminescência. O resultado das melhores combinações utilizando os padrões diluídos nas concentrações alta, média e baixa do hormônio pode ser visto no final de cada tabela.

Fez-se a comparação dos melhores resultados de cada membrana e optou-se pela membrana D impregnada com o anticorpo Monoclonal Anti- α LH 1 na banda teste na concentração de 0,7 mg/mL, o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG camundongo na banda controle impregnado na concentração de 0,4 mg/mL e o anticorpo Anti- β LH conjugado com ouro coloidal na concentração de 0,225 μ /mm. Essa combinação gerou bandas de coloração semelhantes no *cut-off* desejado de 30 mUI/mL, bandas teste e controle fortes e homogêneas, fluxo de amostra adequado e custo condizente com o planejado.

4.2.1.2. Escolha dos reagentes de captura e detecção

Foram feitos diversos experimentos até encontrar a concentração ideal dos reagentes de captura e detecção, conforme as combinações apresentadas na tabela 2. A determinação da concentração dos reagentes no desenvolvimento deste teste rápido em particular foge um pouco do padrão adotado no desenvolvimento da maioria dos testes rápidos, onde o aparecimento de uma banda de qualquer intensidade na área teste indica um resultado positivo. Este teste, por se tratar de um teste semi-quantitativo, utiliza a intensidade das cores das bandas teste e controle para determinar qual a concentração aproximada da amostra.

Testou-se na banda teste dois anticorpos monoclonais, Monoclonal Anti- α LH 1 e 2 e um anticorpo policlonal, o anticorpo Policlonal de cabra anti- α LH. Porém, em todas as membranas testadas, o anticorpo Monoclonal Anti- α LH 1 mostrou melhores resultados, com bandas mais fortes e homogêneas. Testamos apenas um tipo de anticorpo na banda controle, o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG camundongo, por se tratar de um reagente conhecido anteriormente no desenvolvimento de outros testes e por apresentar bons resultados e ter baixo custo. No conjugado também testamos apenas um tipo de reagente, o anticorpo

monoclonal Anti- β LH conjugado com ouro coloidal, por apresentar bons resultados desde o início dos testes.

Portanto, neste projeto optou-se por utilizar um anticorpo monoclonal na banda teste direcionado à detecção das cadeias alfa não específicas do hormônio luteinizante, um anticorpo de carneiro anti- IgG de camundongo na banda controle e partículas de ouro coloidal conjugadas a anticorpos monoclonais direcionados à detecção da subunidade beta específica do hormônio. Como diluente dos reagentes de captura optou-se por usar o tampão PBS em pH 7,4.

Os reagentes utilizados e fornecedores serão mantidos em sigilo por se tratarem de informações confidenciais da WAMA Diagnóstica.

4.2.1.3. Base de amostra

Como a amostra utilizada no kit desenvolvido neste projeto é urina, optou-se por utilizar uma base de amostra composta por fibra de vidro. Tratou-se a membrana com um tampão contendo detergente, sais e intensificadores de viscosidade para aumentar a hidrofiliabilidade da membrana, corrigir o pH e aumentar a viscosidade da amostra. As membranas foram tratadas e secas por um período de 12 horas em sala desumidificada. Os resultados obtidos mostraram uma ótima performance com as amostras de urina.

4.2.1.4. Base absorvente

A membrana absorvente utilizada neste projeto é constituída por um filtro de celulose de 0,45 mm de espessura, adquirida em rolo de 100 m de comprimento e na largura apropriada para o teste.

4.2.1.5. Card plástico

Todas as membranas citadas acima foram meticulosamente coladas sobrepostas umas às outras durante o processo de fabricação em um cartão plástico, comumente chamado de *card* (do inglês).

O *card* utilizado neste kit foi escolhido com base na capacidade do adesivo fixar as membranas e ao mesmo tempo ser inerte aos reagentes impregnados nas

mesmas, não reagindo com eles, e com base na rigidez do plástico, que deveria ser firme o suficiente para facilitar o manuseio do operador durante o uso do produto.

4.2.1.6. *Cassete plástico*

Para o teste apresentado neste trabalho dispensou-se o uso do cassete. O kit foi composto apenas pela tira teste com as membranas aderidas. Adesivos de identificação foram utilizados para proteger as membranas e facilitar o entendimento da usuária no momento do uso.

4.2.1.7. *Adesivos (cover tapes)*

Utilizou-se nesse projeto o mesmo adesivo que era empregado na empresa para a produção do teste rápido para detecção de hCG (teste de gravidez), que satisfazia as funções principais necessárias para esse componente, como indicar a orientação do teste por meio de setas, apontar o limite máximo que a tira pode ser mergulhada em um líquido através de uma linha indicadora e manter pressionado os componentes frágeis. Uma foto de uma parte de uma placa montada e ainda não cortada em tiras com os adesivos de identificação colados pode ser visto na figura 3.

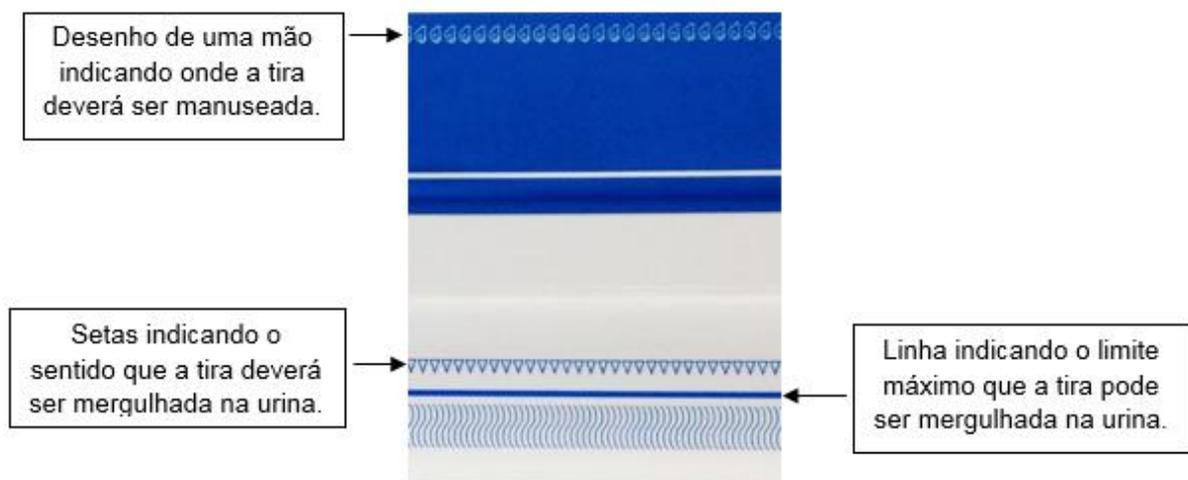


Figura 3 - Placa montada com os adesivos de identificação.

4.2.1.8. Considerações a respeito do processo de produção

Selecionados os componentes que irão compor o kit, padronizou-se o processo de produção.

No desenvolvimento desse projeto utilizou-se o processo de produção descontínuo, que utiliza um alto grau de trabalho manual e possui um custo mais acessível. A impregnação dos reagentes foi feita utilizando um dispensador de contato, que utiliza uma seringa conectada com uma agulha que se move pela membrana dispensando os reagentes. A laminação, processo de sobreposição das membranas, foi feita à mão e o corte das placas foi feito utilizando um cortador simples (que corta uma tira por vez).

4.2.2. Avaliação do desempenho do protótipo

No presente projeto foram feitas diversas combinações de anticorpos, conjugados e membranas com o objetivo de obtenção de um protótipo que atendesse aos requisitos estabelecidos na fase de planejamento do projeto. As combinações utilizadas podem ser vistas na Tabela 2. Cada combinação foi testada utilizando-se o controle LH Standard (ARISTA BIOLOGICALS) que possui uma alta concentração do hormônio LH (300 mUI/mL) diluído em concentrações diferentes para simular amostras reais de urina. O protótipo também foi avaliado utilizando-se algumas amostras de urina doadas por um laboratório clínico. As diluições do controle e as amostras de urina foram quantificadas pelo método de quimioluminescência.

O teste foi realizado conforme procedimento descrito no item 3.3.2.

A escolha do protótipo foi feita baseada nos testes utilizando o controle descrito acima. A combinação ideal do protótipo foi encontrada quando se observou um resultado concordante com os valores esperados do controle diluído, e quando se conseguiu a reprodução desses resultados em testes fabricados em dias diferentes e/ou com lotes de matérias-primas diferentes.

4.2.3. Análise de embalagem e rotulagem

A embalagem do kit desenvolvido nesse projeto foi escolhida em uma reunião envolvendo os departamentos de pesquisa, gestão da qualidade, produção, comercial e embalagem. Por se tratar de um autoteste optou-se por uma embalagem de papelão contendo apenas cinco sachês com tiras, que virão acompanhados de uma bula explicativa do produto e de um guia de interpretação de resultados. O kit poderá ou não ser acompanhado de frascos coletores de urina.

Seguindo as normativas descritas foram feitos os modelos dos rótulos de cada componente e o rótulo externo do kit (Figuras 4 e 5, Tabela 3).

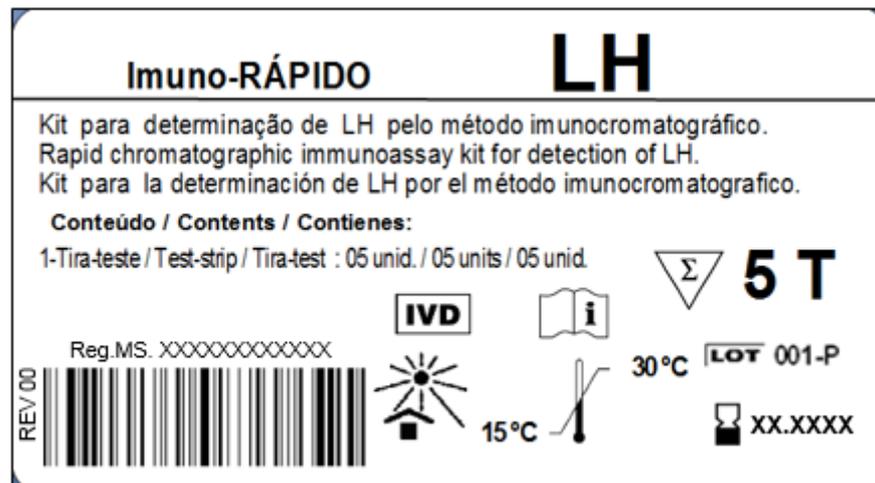


Figura 4 - Modelo de rótulo externo do produto.

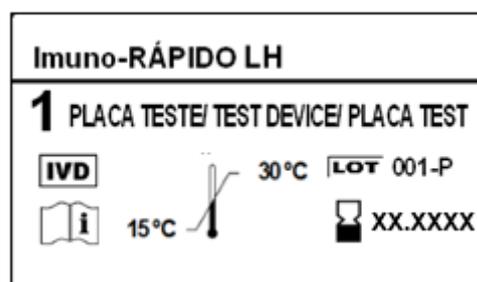


Figura 5 - Modelo de rótulo interno do produto.

Tabela 3 - Legenda dos símbolos utilizados nos rótulos.

Símbolo	Significado
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consultar as instruções de uso
	Limite de temperatura/ Armazenar de 15-30°C
	Número do lote
	Data limite de utilização
	Proteger do calor
	O conteúdo é suficiente para 5 testes

4.3. Validação do protótipo

Terminado o desenvolvimento do produto iniciou-se a fase de validação. Os estudos realizados nessa etapa estão descritos abaixo.

4.3.1. Produção de três lotes pilotos

Estabelecido o protótipo, fez-se a produção de três lotes pilotos utilizando, sempre que possível, matérias-primas de lotes diferentes e dias de fabricação diferentes para simular uma futura produção comercial.

4.3.2. Avaliação dos lotes pilotos

A avaliação dos lotes pilotos do kit IMUNO-RÁPIDO LH foi realizada utilizando amostras de urina de mulheres não grávidas. As amostras foram obtidas de um banco de amostras de um laboratório clínico da cidade. Os testes realizados estão descritos a seguir.

4.3.2.1. Testes com o kit desenvolvido – IMUNO-RÁPIDO LH

As amostras de urina foram testadas seguindo o procedimento abaixo:

As tiras foram mergulhadas verticalmente nas amostras de urina até a posição indicada no adesivo de identificação por 10-15 segundos. Em seguida, as tiras foram colocadas em uma superfície plana, limpa e não absorvente. Com o auxílio de um cronômetro, o resultado foi lido em 10 minutos, onde apareceram uma ou duas linhas coloridas. Não foram lidos resultados após 10 minutos de reação.

Quando a banda teste apresentava uma coloração mais fraca em relação à banda controle, o resultado era considerado como negativo, ou seja, a concentração do hormônio LH naquela amostra era menor que 30 mUI/mL.

Por outro lado, quando a banda teste apresentava uma coloração de igual intensidade ou mais forte que a banda controle o resultado era considerado como positivo, ou seja, a concentração de LH naquela amostra era igual ou maior que 30 mUI/mL e a ovulação provavelmente deveria ocorrer após 24 a 48 horas.

Testaram-se 500 amostras de urina com o protótipo desenvolvido e os resultados foram tabelados e comparados com um teste comercial disponível no mercado (CONFIRME FERTILIDADE) e com um teste de quimioluminescência (BECKMAN COULTER), considerado padrão ouro nessa análise (Apêndice A).

Como o resultado dos testes rápidos é baseado na comparação das cores das bandas testes e controle, isso pode tornar a análise subjetiva, já que cada pessoa pode interpretar de maneira diferente uma mesma tonalidade de cor. Por esse motivo, a leitura dos testes rápidos na validação do produto foi feita por três operadores diferentes.

Outro ponto que foi levado em consideração foi a discreta variação de cor que ocorre em amostras contendo uma concentração de LH perto do *cut-off* estabelecido de 30 mUI/mL. Por esse motivo, é muito difícil diferenciar uma amostra contendo 27 mUI/mL de uma contendo 32 mUI/mL, por exemplo. Sendo assim, consideramos ao invés de um ponto, uma faixa de *cut-off*, variando de 25 mUI/mL a 35 mUI/mL.

Os resultados dessas comparações são abordados a seguir.

4.3.2.2. Teste de Sensibilidade e Especificidade

O teste tem por finalidade verificar a sensibilidade e especificidade do kit Imuno-Rápido LH através de análise comparativa. Os kits Imuno-Rápido LH pertencentes ao lote 001-P foram comparados com o ensaio de quimioluminescência automatizado Beckman Unicel DxI800 (BECKMAN COULTER), utilizado como padrão-ouro nessa análise. Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso.

Para os testes foram utilizadas 500 amostras cegas de urina doadas pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi. A distribuição das frequências de concentrações de LH das 500 amostras pode ser observada na figura 6.

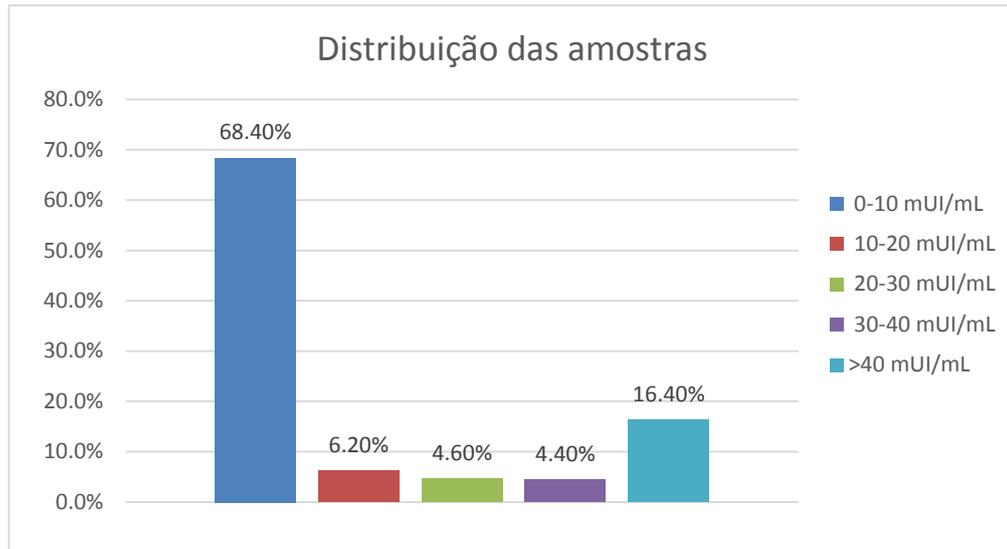


Figura 6 - Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas no estudo de validação do kit Imuno-rápido LH.

Os resultados encontrados nos testes com o protótipo e a comparação com os resultados quantificados pelo método de quimioluminescência (BECKMAN COULTER) podem ser vistos detalhadamente no Apêndice A. A sensibilidade e a especificidade foram calculados conforme Ferreira, Moraes e Beck (2007), utilizando as fórmulas abaixo:

$$Sensibilidade = \frac{Verdadeiros\ positivos}{Falso\ negativo + Verdadeiro\ positivo}$$

$$Especificidade = \frac{Verdadeiros\ negativos}{Falso\ positivo + Verdadeiro\ negativo}$$

Os resultados de sensibilidade e especificidade encontrados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise de sensibilidade e especificidade comparando-se o protótipo desenvolvido e o teste padrão-ouro (quimioluminescência).

Resultados Kit protótipo	Teste padrão-ouro Quimioluminescência		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	112	8	120
Não Reagente	3	377	380
Total	115	385	500

Sensibilidade: 97,39%

Especificidade: 97,92%

De acordo com os testes realizados, a sensibilidade do kit Imuno-Rápido LH foi de 97,39% e a especificidade foi de 97,92% utilizando amostras de urina quando comparado com o método padrão-ouro de quimioluminescência (BECKMAN COULTER). Os resultados foram analisados utilizando o programa Microsoft Office Excel.

4.3.2.3. Testes de Sensibilidade Analítica

Esta análise tem por finalidade determinar a sensibilidade analítica do teste desenvolvido utilizando urinas com concentrações variadas e conhecidas do hormônio.

Foram utilizados os kits IMUNO RÁPIDO LH dos lotes 001-P, 002-P e 003-P da WAMA Diagnóstica e amostras de urina quantificadas. Algumas concentrações foram obtidas através da diluição de um padrão positivo LH STANDARD (ARISTA BIOLOGICALS).

O objetivo do teste foi verificar até qual concentração o kit detectaria a urina como Reagente e em qual concentração ele passaria a detectar a amostra como Não Reagente.

As amostras com intensidade de banda teste igual ou superior à banda controle foram classificadas como “Reagentes”. Já as amostras com intensidade de banda teste inferior à banda controle foram classificadas como “Não Reagentes”. O

kit desenvolvido classifica como “Reagentes” amostras de urina com concentrações do Hormônio Luteinizante acima de 30 mUI/mL.

Conforme abordado anteriormente, um ponto que foi considerado foi a discreta variação de cor que ocorre em amostras contendo uma concentração de LH perto do *cut-off* estabelecido de 30 mUI/mL. Por isso, considerou-se ao invés de um ponto, uma faixa de *cut-off*, variando de 25 mUI/mL a 35 mUI/mL.

Os resultados do teste podem ser verificados na Tabela 5 e na Figura 7:

Tabela 5 - Teste de sensibilidade analítica utilizando padrões diluídos.

IMUNO-RÁPIDO LH				
Número da amostra	Concentração	Resultado 001-P	Resultado 002-P	Resultado 003-P
1	0,1 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	2,06 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	4,15 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	6,03 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
5	7,98 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
6	10,12 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
7	12,59 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	16,78 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
9	17,45 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
10	20,38 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	22,43 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
12	23,74 mUI/mL	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
13	27 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente
14	29 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente
15	30 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente
16	34 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente
17	39 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente
18	48,21 mUI/mL	Reagente	Reagente	Reagente

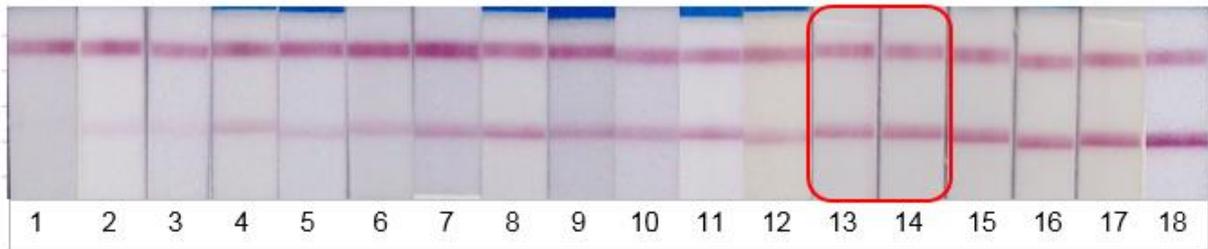


Figura 7 - Resultado dos testes de sensibilidade do lote 001-P mostrando um aumento crescente na intensidade da banda teste. O *cut-off* do teste pode ser visto nas amostras 13 e 14.

A figura 7 mostra o aumento gradual da intensidade da banda teste conforme a concentração de LH da amostra aumenta. Quando a concentração de LH chega a 27 mUI/mL a intensidade da banda teste torna-se igual à intensidade da banda controle. As bandas apresentam intensidades parecidas até a concentração de 30 mUI/mL. A partir dessa concentração a banda teste fica mais intensa que a banda controle.

O cálculo da sensibilidade analítica é abordado de diferentes formas na literatura. Webster e colaboradores (2010) descrevem a sensibilidade analítica (ou limite de detecção) como sendo a diluição na qual mais de 50% das replicatas são detectadas como positivas. Por outro lado, Spencer² (1989 apud SCHAMBECK, BEDEL e KELLER, 1998, p. 2217) introduziu o conceito de “sensibilidade funcional”, que pode ser definida como a menor concentração de uma amostra que pode ser medida com um coeficiente de variação (CV) interensaio de 20%.

Neste trabalho utilizamos a abordagem de Spencer² (1989 apud SCHAMBECK, BEDEL e KELLER, 1998, p. 2217). Como os três lotes apresentaram resultados concordantes entre si, 27 mUI/mL, o coeficiente de variação foi zero. Conclui-se que o kit desenvolvido apresenta uma sensibilidade analítica de 27 mUI/mL em amostras de urina, pois esta foi a menor concentração de hormônio que gerou bandas com igual intensidade nas áreas teste e controle nos três lotes.

² SPENCER, C. A. Thyroid profiling for the 1990s: free T4 estimate or sensitive TSH measurement. **J. Clin. Immunoassay**, v. 12, p. 82-89, 1989.

4.3.2.4. **Estudo comparativo de desempenho com kit comercial**

Os kits IMUNO-RÁPIDO LH pertencentes ao lote 001-P foram comparados com o kit comercial CONFIRME Fertilidade (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.) que também utiliza a metodologia imunocromatográfica, conforme o procedimento do fabricante descrito no item 3.4.2.4. (Tabela 6). Para os testes foram utilizadas 292 amostras de urina doadas pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi. As amostras foram quantificadas pela técnica de quimioluminescência.

O teste CONFIRME Fertilidade utiliza como *cut-off* o valor de 35 mUI/mL e o teste desenvolvido utiliza a faixa de *cut-off* de 25-35 mUI/mL. Por esse motivo a comparação entre as marcas foi feita apenas utilizando amostras com concentrações de LH menores que 25 mUI/mL, que dariam resultados negativos em ambos os testes e maiores que 35 mUI/mL que dariam resultados positivos em ambos os testes. Não foi possível encontrar no mercado brasileiro um teste de outra marca cujo *cut-off* fosse igual ao teste que está sendo validado. Por isso, fizemos a validação utilizando esse teste.

Tabela 6 - Resultados do estudo comparativo de desempenho com kit comercial.

Kit protótipo WAMA	Kit comercial CONFIRME Fertilidade		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	74	22	96
Não Reagente	4	192	196
Total	78	214	292

As 4 amostras que apresentaram resultados “Não Reagente” no teste WAMA e “Reagente” no teste CONFIRME Fertilidade foram quantificadas pela técnica de quimioluminescência e os valores encontrados correspondem a amostras “Não Reagentes”. Sendo assim o teste CONFIRME Fertilidade apresentou 4 resultados falso positivos. Dessas, 3 amostras eram hCG positivas.

Do mesmo modo, as 22 amostras que apresentaram resultados “Reagente” no teste WAMA e “Não Reagente” no teste CONFIRME Fertilidade foram quantificadas pela técnica de quimioluminescência e os valores encontrados correspondem a 3 amostras “Não Reagentes” e 19 amostras “Reagentes”. Sendo

assim o teste WAMA apresentou 3 resultados falso positivos (nenhuma era hCG positiva) e o teste CONFIRME Fertilidade apresentou 19 resultados falso negativos.

Prosseguiu-se com a análise entre as marcas utilizando o programa Win Episcopo 2.0, onde calculou-se a concordância entre os testes e o índice kappa (κ) (BLAS, c2006). O índice Kappa é um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração a concordância devida ao fator chance (ANDRADE; ZICKER, 1997). O seu valor varia de “menos 1” (completo desacordo) a “mais 1” (concordância total) (ANDRADE; ZICKER, 1997).

A tabela 7 apresenta os valores de κ e respectivas interpretações:

Tabela 7 - Escala de concordância do Kappa.

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

(ANDRADE; ZICKER, 1997)

Na análise realizada a concordância entre os testes foi de 91,1% e o índice Kappa (IC 95%) foi 0,788 (0,675 – 0,902), demonstrando boa correlação entre o novo kit e o kit disponível no mercado (ANDRADE; ZICKER, 1997; BLAS, c2006).

Teste de sensibilidade e especificidade – CONFIRME FERTILIDADE

Para verificar qual era a sensibilidade e especificidade do kit comercial CONFIRME FERTILIDADE compararam-se os resultados obtidos com esse teste com àqueles obtidos com o teste de quimioluminescência automatizado Beckman Unicel Dxl800 (BECKMAN COULTER), utilizado como padrão-ouro nessa análise. Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso dos fabricantes.

Para os testes foram utilizadas 310 amostras cegas de urina doadas pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi.

Os resultados encontrados nos testes com o kit comercial e a comparação com os resultados quantificados pelo método de quimioluminescência podem ser vistos detalhadamente no Apêndice A. Os resultados de sensibilidade e especificidade encontrados podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de sensibilidade e especificidade comparando-se o kit comercial CONFIRME FERTILIDADE e o teste padrão-ouro (quimioluminescência).

Resultados Kit CONFIRME FERTILIDADE	Teste padrão-ouro Quimioluminescência		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	73	7	80
Não Reagente	19	211	230
Total	92	218	310

Sensibilidade: 79,35%

Especificidade: 96,79%

De acordo com os testes realizados, a sensibilidade do kit CONFIRME FERTILIDADE foi de 79,35% e a especificidade foi de 96,79% utilizando amostras de urina quando comparado com o método padrão-ouro de quimioluminescência (BECKMAN COULTER). Os resultados foram analisados utilizando o programa Microsoft Office Excel.

4.3.2.5. Teste de Reprodutibilidade

Foram selecionadas 44 amostras para realizar o teste de reprodutibilidade. Três das amostras eram positivas, uma era hCG positiva (amostra 18) e as restantes eram negativas. Os testes foram realizados em dias e horários diferentes com 3 lotes diferentes: 001-P, 002-P e 003-P.

Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso e os resultados obtidos estão dispostos na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados da análise de reprodutibilidade do kit para detecção de LH.

Amostra	Conc. LH (mUI/mL)	Lote 001-P	Lote 002-P	Lote 003-P
1	1,65	-	-	-
2	1,37	-	-	-
3	0,24	-	-	-
4	1,55	-	-	-
5	1,79	-	-	-
6	4,61	-	-	-
7	18,86	-	-	-
8	0,17	-	-	-
9	0,11	-	-	-
10	0,32	-	-	-
11	2,67	-	-	-
12	0,04	-	-	-
13	7,08	-	-	-
14	16,99	-	-	-
15	0,82	-	-	-
16	0,32	-	-	-
17	0,35	-	-	-
18	1,2	+	+	+
19	0,76	-	-	-
20	0,01	-	-	-
21	2,28	-	-	-
22	7,65	-	-	-
23	2,78	-	-	-
24	0,21	-	-	-
25	0,43	-	-	-
26	5,41	-	-	-
27	6,88	-	-	-
28	0,02	-	-	-
29	0,08	-	-	-
30	2,09	-	-	-

Amostra	Conc. LH (mUI/mL)	Lote 001-P	Lote 002-P	Lote 003-P
31	6,16	-	-	-
32	1,33	-	-	-
33	3,92	-	-	-
34	15,96	-	-	-
35	9,29	-	-	-
36	0,41	-	-	-
37	1,38	-	-	-
38	3,52	-	-	-
39	1,16	-	-	-
40	0,06	-	-	-
41	23	-	-	-
42	35	+	+	+
43	40	+	+	+
44	45	+	+	+

De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit IMUNO RÁPIDO LH, reproduz de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas mesmo em diferentes condições (operadores, lotes, dias e horários diferentes).

4.3.2.6. Teste de Repetibilidade

Foram selecionadas 5 amostras para realizar o teste de repetibilidade. Duas das amostras eram negativas e três eram positivas. Foram feitas 5 repetições do teste com o mesmo operador no mesmo dia. Utilizaram-se para os testes os lotes 001-P, 002-P e 003-P. Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso e os resultados obtidos estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do teste de repetibilidade utilizando 5 amostras diferentes.

Repetibilidade LH 001-P					
Repetições do Teste	Amostra Urina 0,06 mUI/mL	Amostra Urina 23 mUI/mL	Amostra Urina 35 mUI/mL	Amostra Urina 40 mUI/mL	Amostra Urina 45 mUI/mL
	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	+

Repetibilidade LH 002-P					
Repetições do Teste	Amostra Urina 0,06 mUI/mL	Amostra Urina 23 mUI/mL	Amostra Urina 35 mUI/mL	Amostra Urina 40 mUI/mL	Amostra Urina 45 mUI/mL
	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	+

Repetibilidade LH 003-P					
Repetições do Teste	Amostra Urina 0,06 mUI/mL	Amostra Urina 23 mUI/mL	Amostra Urina 35 mUI/mL	Amostra Urina 40 mUI/mL	Amostra Urina 45 mUI/mL
	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
1	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	+

De acordo com os testes realizados foi verificado que o kit desenvolvido repetiu de maneira satisfatória os resultados com as amostras testadas nas mesmas condições.

4.3.2.7. Análise de Interferentes

A análise de interferentes tem por finalidade verificar se o kit desenvolvido sofre interferência frente a amostras com alta concentração de hCG, FSH e TSH. Foram utilizados para os testes o lote 002-P.

Utilizaram-se para os testes 7 amostras contendo alta concentração de FSH, 7 amostras contendo alta concentração de TSH e 5 amostras contendo alta concentração de hCG. Os testes foram realizados em triplicata de acordo com as instruções de uso. Os resultados podem ser conferidos abaixo na tabela 11.

Tabela 11 - Análise de reação cruzada frente a amostras com alta concentração de FSH, TSH e hCG.

Amostra	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)	Imuno-rápido LH		
			Teste 1	Teste 2	Teste 3
1	18,31	51,98	-	-	-
2	13,92	74,86	-	-	-
3	1,2	8,82	-	-	-
4	24,2	166,25	-	-	-
5	2,26	16,51	-	-	-
6	13,83	92,65	-	-	-
7	4,42	75,39	-	-	-

Amostra	LH (mUI/mL)	TSH (μ UI/mL)	Imuno-rápido LH		
			Teste 1	Teste 2	Teste 3
1	2,41	71,3	-	-	-
2	3,53	40,53	-	-	-
3	0,21	98,75	-	-	-
4	5,95	10,63	-	-	-
5	7,51	14,65	-	-	-
6	3,31	>100	-	-	-

7	6,86	14,3	-	-	-
---	------	------	---	---	---

Amostra	LH (mUI/mL)	hCG (mUI/mL)	Imuno-rápido LH		
			Teste 1	Teste 2	Teste 3
1	3,98	18.688	+	+	+
2	0,52	114.147	+	+	+
3	0,26	12.755	+	+	+
4	0,11	1.123	+	+	+
5	0,08	269	-	-	-

Com base nos resultados acima, conclui-se que o teste desenvolvido não sofre reação cruzada com amostras com alta concentração de FSH e TSH, porém sofre grande interferência de amostras contendo hCG. Uma amostra contendo baixa concentração de hCG (269 mUI/mL) não gerou resultado falso positivo. Essa reação cruzada deverá constar nas Instruções de Uso como um alerta às usuárias.

Alguns testes semi-quantitativos para LH como o que está sendo desenvolvido apresentam restrições em sua bula indicando que devem ser testados apenas com amostras livres de hCG. Para verificar esse dado e avaliar se o teste do mercado também apresentava esse problema, testou-se o kit concorrente com uma amostra contendo hCG. Comparou-se o teste desenvolvido com o teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.) conforme as recomendações do fabricante.

O resultado pode ser conferido na figura 8:

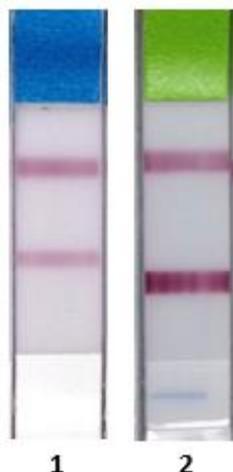


Figura 8 - Teste com tiras de LH utilizando amostra de urina proveniente de paciente grávida para análise de reação cruzada entre LH e hCG. 1 – Teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.), 2 – Teste IMUNO-RÁPIDO LH (WAMA).

A figura 8 retrata uma tira de teste de LH da ALAMAR e uma tira WAMA. Como podemos observar, os dois testes apresentaram resultados positivos, isto é, a intensidade da banda teste foi bem próxima (teste WAMA) ou maior que a da banda controle (teste ALAMAR) para as duas tiras. O kit comercial da ALAMAR apresentou uma reação cruzada mais forte que o kit desenvolvido. Se não fosse conhecido que a amostra era proveniente de uma paciente grávida, poder-se-ia afirmar que a concentração de LH era superior a 30 mUI/mL. Todavia, devido à gravidez, a concentração de LH na paciente é muito baixa (1,18 mUI/mL), o que indica uma provável reação cruzada entre o hCG e o anticorpo anti-LH impregnado na banda teste em ambos os testes.

Durante a gravidez ocorre um aumento na concentração do hormônio gonadotrofina coriônica e uma redução na concentração do hormônio luteinizante, a fim de que a gestação ocorra normalmente. Sabe-se que os hormônios hCG e LH são constituídos por 2 cadeias polipeptídicas, α e β . A cadeia α desses hormônios é idêntica, sendo a cadeia β responsável pela especificidade. Todavia, a cadeia β dos hormônios apresentam uma similaridade maior que 80%, levando a reação cruzada entre eles (HALLAST, 2009). Para verificar a similaridade entre as cadeias, fez-se o alinhamento das sequências utilizando a ferramenta de bioinformática MultiAlin, disponível *online* (CORPET, 1988) (Figura 9). As sequências das cadeias beta do LH (NP_000885.1) e do hCG (NP_000728.1) foram obtidas do banco de dados NCBI (PRUITT et al., 2013).

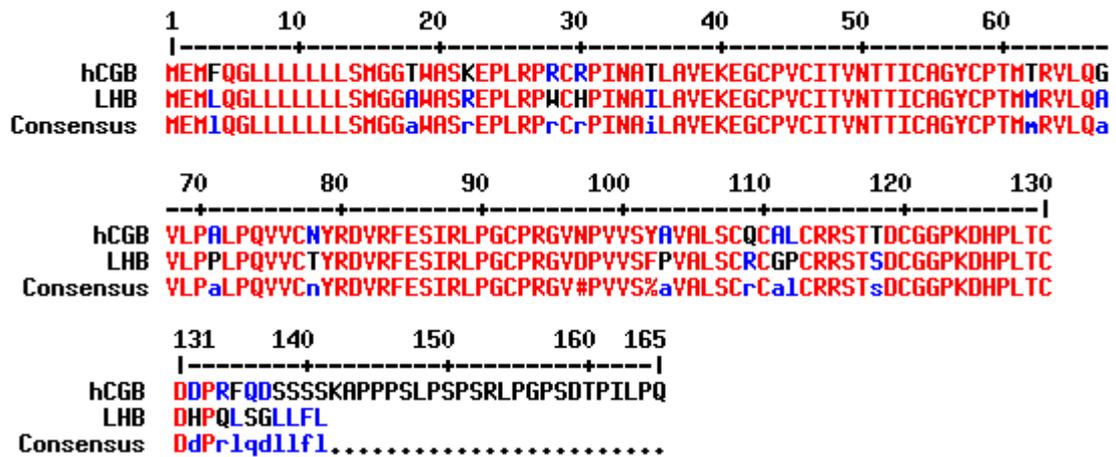


Figura 9 - Alinhamento da sequência de aminoácidos dos hormônios LH e hCG mostrando a alta similaridade entre as cadeias.

Quando se compara a sequência de aminoácidos da cadeia beta do hCG e do LH, nota-se que a diferença entre estes hormônios é a presença de 24 aminoácidos no C-terminal do primeiro. A partir desses dados, ressalta-se a importância de se acrescentar uma restrição de uso para mulheres grávidas nas Instruções de Uso do produto.

4.3.2.8. Análise de estabilidade em tempo real e acelerada

Os testes de estabilidade foram feitos para garantir que o kit desenvolvido mantém suas características de funcionamento durante todo o prazo de validade do produto sob condições ideais de armazenamento. Para isso, o kit foi submetido a testes de “Estabilidade em Tempo Real” e “Estabilidade Acelerada”.

4.3.2.8.1. Teste de estabilidade acelerada

Para a realização do teste de estabilidade acelerada partiu-se da experiência prévia com produtos da mesma linha, onde estabeleceu-se que 3 dias em estufa a 70°C correspondem a 18 meses de validade. Foram utilizadas alíquotas do controle positivo LH da ARISTA (LH Standard) diluído em três concentrações diferentes e duas amostras de urina congeladas com 7% de glicerol (v/v), uma com baixa concentração de LH e outra com alta concentração de LH.

O teste permaneceu em estufa a 70°C durante 3 dias e foi analisado após o estresse de temperatura com um kit mantido na temperatura ideal de armazenamento (15 - 30°C). Utilizaram-se para essa análise os testes do lote 001-P.

Os testes foram realizados de acordo com as instruções de uso e os resultados obtidos estão dispostos na tabela abaixo (Tabela 12):

Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade acelerada.

Amostra	Concentração de LH (mUI/mL)	001-P 15-30°C	001-P Após 1 dia a 70°C	001-P Após 2 dias a 70°C	001-P Após 3 dias a 70°C
Controle – Diluição 1	1,12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Controle – Diluição 2	15,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Controle – Diluição 3	44,31	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Urina 1	30,82	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Urina 2	0,91	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

A análise comparativa dos testes mostrou que as bandas controle e teste das tiras submetidas ao estresse de temperatura ficaram gradativamente mais claras que as bandas das tiras mantidas nas condições ideais de armazenamento. Além disso, as tiras que foram mantidas em estufa demoraram um tempo maior para absorver as amostras durante a execução dos testes.

Os resultados obtidos com as tiras submetidas ao estresse de temperatura foram os mesmos das tiras mantidas à temperatura ambiente. Todos os testes concordaram com o valor obtido no teste de quimioluminescência.

De acordo com os testes realizados, foi verificado que o kit desenvolvido mantém sua estabilidade e seu bom funcionamento mesmo após o estresse com temperatura elevada, podendo ser comercializado com validade de 18 meses.

4.3.2.8.2. Teste de estabilidade em tempo real

Infelizmente, devido ao longo período de tempo necessário para esta análise, não foi possível finalizar os testes e relatar os resultados obtidos. Os testes encontram-se em andamento e deverão ser finalizados dentro de um ano.

4.3.3. Validação Externa

Os testes foram enviados para análise a um laboratório clínico da cidade. Foram testadas 100 amostras de urina seguindo o procedimento descrito na bula. Os resultados foram confirmados pela técnica de quimioluminescência, usualmente utilizada no laboratório.

Segundo a análise comparativa realizada entre o lote-piloto do teste IMUNO-RÁPIDO LH e a quantificação do hormônio realizada por quimioluminescência pelo kit ACCESS LH (BECKMAN COULTER), concluiu-se que os resultados do teste rápido foram concordantes com a quantificação de LH das amostras, dado o valor de *cut-off* do teste de 30 mUI/mL. Sendo assim, não foram encontradas evidências que impossibilitassem a fabricação desse produto pela WAMA Diagnóstica.

4.3.4. Oficialização das fichas técnicas de produção

Nesta fase fizeram-se a elaboração e oficialização das fichas técnicas de fabricação, fichas técnicas de embalagem e fichas técnicas de repartição no sistema de qualidade da empresa. As fichas foram redigidas e avaliadas quanto à clareza das instruções de fabricação, repartição e embalagem do produto.

Os documentos foram aprovados pelo Responsável de Fabricação do produto e pela Garantia da Qualidade da WAMA Produtos para Laboratório Ltda., com o objetivo de atender todas as normas de qualidade definidas pelo Ministério da Saúde e ANVISA.

4.3.5. Cadastro de matérias-primas e fornecedores

Todas as matérias-primas e fornecedores que foram validados para a fabricação do produto foram cadastrados no sistema de qualidade e no sistema computacional da empresa.

4.3.6. Elaboração das Instruções de Uso

Como a funcionalidade do produto foi confirmada, fez-se a elaboração das instruções de uso que irão acompanhar o kit. Por se tratar de um autoteste que poderá ser utilizado por um público que não possui necessariamente conhecimento técnico na área, as instruções de uso foram redigidas da forma mais didática possível, evitando ao máximo carregar o texto com linguagem técnica.

Ainda assim foram incluídos todos os dados obrigatórios, como uma breve explicação clínica, o uso pretendido do kit, os reagentes contidos no teste, precauções de uso, informações de armazenamento e estabilidade, instruções para coleta e preparo da amostra, materiais fornecidos, materiais necessários mas não fornecidos, instruções de uso, interpretação dos resultados, limitações do teste, interferentes e características de desempenho.

4.3.7. Revisão do Gerenciamento de Risco

Fez-se uma revisão do Gerenciamento de Risco incluindo os perigos identificados nas fases de desenvolvimento e validação do protótipo, bem como as ações tomadas para mitigar os riscos. Um dos riscos levantados foi a reação cruzada que o teste apresenta com amostras contendo hCG, levando a um resultado falso positivo. A ação tomada para minimizar esse risco foi colocar uma orientação nas Instruções de Uso alertando sobre a interferência.

4.3.8. Elaboração do relatório técnico e registro na ANVISA

Tendo sido aprovado em todos os testes submetidos, ao final do processo de validação é redigido um relatório técnico que deverá ser encaminhado à ANVISA

para registro do produto seguindo as normas da RDC 206/2006, destinada a produtos de diagnóstico na categoria autoteste.

Devido a uma manobra comercial decidiu-se não realizar o registro do produto junto à ANVISA. O registro será feito assim que um número potencial de compradores for estabelecido.

4.3.9. Lançamento do produto e finalização do projeto

Até a data de finalização desta dissertação, o produto ainda não havia sido lançado. O projeto se encontrava parado na fase de Registro, aguardando o levantamento de possíveis compradores. O protótipo finalizado pode ser visto na figura 10:



Figura 10 - Protótipo do kit Imuno-Rápido LH mostrando os principais componentes: sachês de alumínio contendo as tiras imunocromatográficas, tiras teste e frascos coletores de urina.

5. DISCUSSÃO

A produção de kits diagnósticos não é uma tradição no Brasil, conseqüentemente os produtos comercializados no país são, na sua maioria, importados do mercado estrangeiro. O desenvolvimento desses produtos é feito por poucos grupos de pesquisa em universidades e por raras empresas brasileiras no ramo. Por esse motivo é muito difícil encontrar na literatura nacional relatos que norteiem o processo de desenvolvimento. O problema é agravado devido à dificuldade de compreensão e subjetividade das normas e legislações que regulamentam o setor.

Um trabalho feito por Meneghisse em 2007 apresentou de maneira bastante minuciosa as legislações que regem tanto o mercado de kits diagnóstico nacional como o internacional. Com base nas normas, ela descreveu o processo para o desenvolvimento de um kit diagnóstico, tomando como exemplo um kit utilizando a metodologia ELISA. Em resumo, o procedimento para o desenvolvimento de um kit diagnóstico *in vitro*, desde sua concepção até o registro do produto pode ser visto na figura 11.

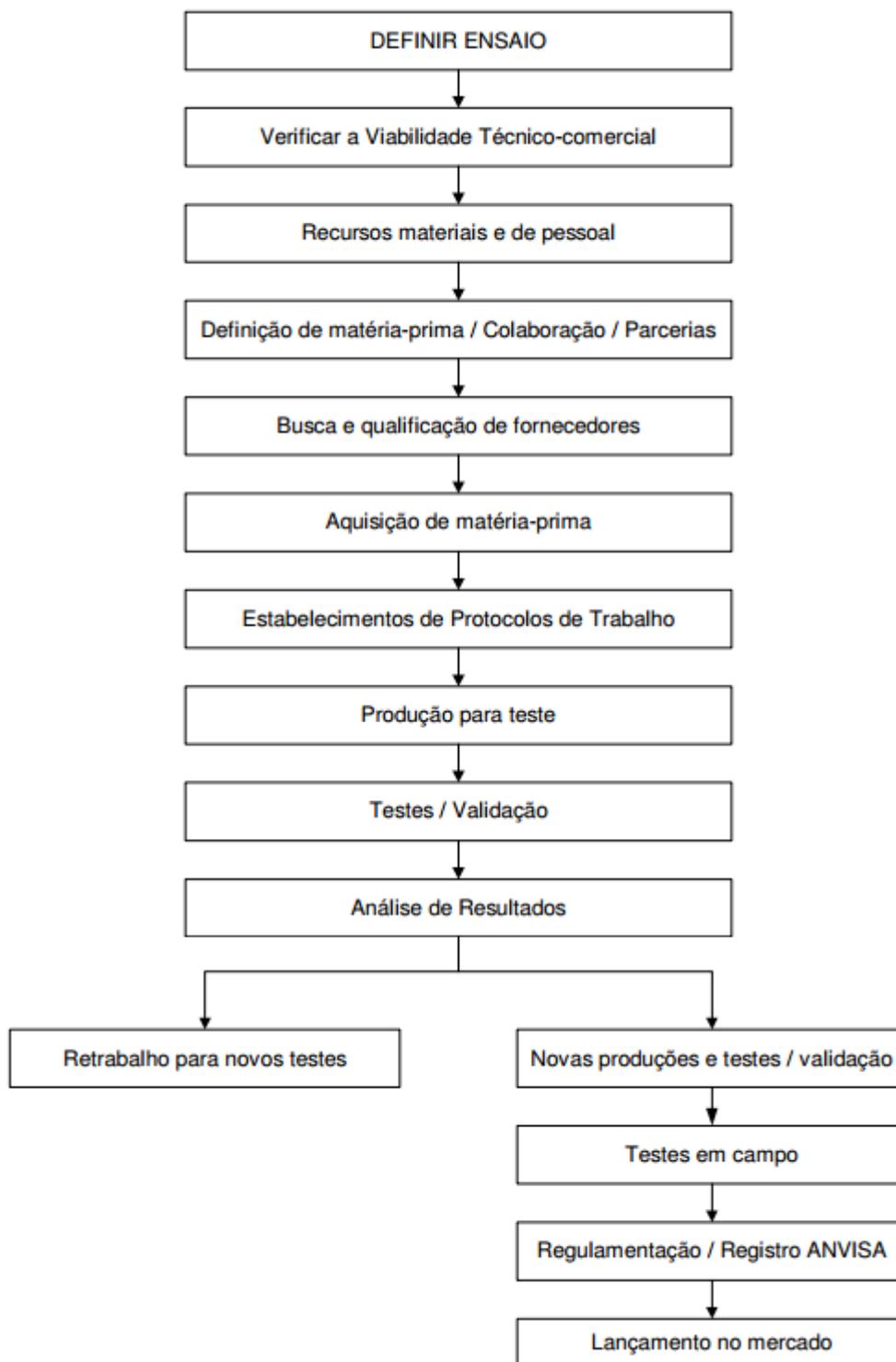


Figura 11 - Etapas do processo de desenvolvimento de um kit de diagnóstico *in vitro* (MENEHISSE, 2007).

Neste trabalho descreveu-se o processo de desenvolvimento de um kit para a detecção do hormônio LH utilizando a plataforma de teste rápido. O kit foi planejado, desenvolvido e validado seguindo os procedimentos descritos nessa dissertação. A sistemática utilizada poderá facilmente ser estendida para o desenvolvimento de outros testes rápidos.

Atualmente, existem cinco kits para a detecção do Hormônio Luteinizante utilizando a metodologia de testes rápidos registrados na ANVISA e apenas um sendo efetivamente comercializado, o CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNOCIENTÍFICA LTDA.), utilizado como comparativo neste trabalho. É importante salientar que nenhum dos produtos registrados é fabricado no Brasil. Com isso, o kit apresentado neste trabalho seria o primeiro kit de teste rápido para a detecção do Hormônio Luteinizante desenvolvido e fabricado no Brasil.

O processo de obtenção de um kit diagnóstico pode ser dividido em três fases: planejamento do projeto, desenvolvimento e validação do produto.

Todas as atividades descritas em materiais e métodos para o Planejamento do Projeto foram realizadas e descritas detalhadamente em resultados, sendo o projeto aprovado para a etapa de desenvolvimento.

Na fase de desenvolvimento foram feitos testes para seleção e padronização de diversos componentes em busca da obtenção do protótipo. O processo geral para obtenção da tira teste pode ser visto na figura 12:

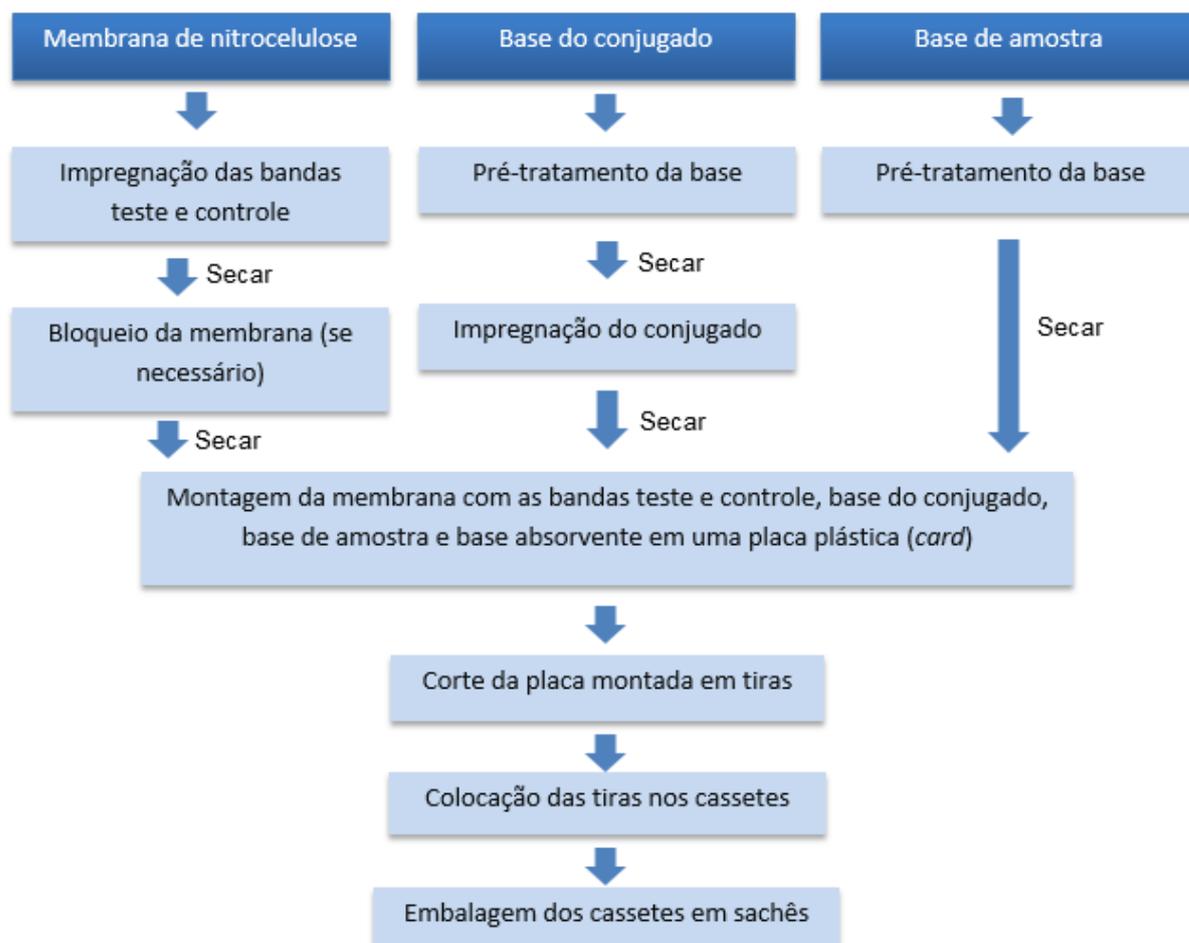


Figura 12 - Estrutura geral do processo de fabricação do teste imunocromatográfico (O'FARRELL, 2013).

Obtido o protótipo, finalizou-se a fase de desenvolvimento e iniciou-se a fase de validação do protótipo. Testaram-se 500 amostras de urina no protótipo desenvolvido e os resultados foram comparados com um teste comercial (CONFIRME FERTILIDADE) e com um teste de quimioluminescência (BECKMAN COULTER), considerado padrão ouro na análise (Apêndice A). A leitura dos testes rápidos foi feita por três operadores diferentes para diminuir o erro devido à subjetividade da comparação de cores.

No teste de sensibilidade e especificidade comparou-se o kit desenvolvido com o teste de quimioluminescência. De acordo com os testes realizados, a sensibilidade do kit Imuno-Rápido LH foi de 97,39% e a especificidade foi de 97,92% utilizando amostras de urina.

Fez-se essa mesma análise de sensibilidade e especificidade com o kit CONFIRME Fertilidade (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.), comparando-se os

resultados do kit comercial com o teste de quimioluminescência. Os testes com 310 amostras revelaram uma sensibilidade de 79,35% e uma especificidade de 96,79%.

A sensibilidade e especificidade encontradas para ambos os testes rápidos podem ser vistas na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparação das análises de sensibilidade e especificidade entre os kits desenvolvido e o comercial.

Kit	Sensibilidade	Especificidade
CONFIRME Fertilidade	79,35%	96,79%
Imuno-rápido LH (WAMA)	97,39%	97,92%

A sensibilidade encontrada com o teste comercial ficou muito abaixo da encontrada com o kit desenvolvido pela WAMA, mostrando um desempenho superior do kit. Já a análise de especificidade mostra um desempenho similar entre as marcas, sendo o da WAMA um pouco melhor que o do concorrente.

Em seguida fez-se os testes de sensibilidade analítica, testes comparativos de desempenho com kit comercial nos quais calculou-se a concordância e o índice kappa (κ) (<http://www.winepi.net/uk/index.htm>), testes de reprodutibilidade e repetibilidade. O kit desenvolvido obteve bons resultados e foi aprovado em todos eles.

No teste de reação cruzada investigou-se se o kit desenvolvido sofria interferência frente a amostras com alta concentração de hCG, FSH e TSH. Com base nos testes, concluiu-se que o teste desenvolvido não sofre reação cruzada com amostras contendo alta concentração de FSH e TSH, porém sofre grande interferência de amostras contendo hCG. Como abordado anteriormente, os hormônios glicoproteicos são compostos por uma cadeia alfa, que é comum para os hormônios LH, TSH, FSH e hCG, e uma cadeia beta, que é específica para cada hormônio. Entretanto, o alinhamento entre as cadeias beta dos hormônios LH e hCG mostrou uma similaridade maior que 80%, sendo esta a provável causa da reação cruzada entre esses hormônios. O mesmo não ocorre entre as cadeias beta do hormônio FSH (NP_001018090.1), cujo alinhamento mostrou similaridade de 41%, e do TSH (NP_000540.2), cujo alinhamento resultou em uma similaridade de 44%. O alinhamento das sequências foi feito utilizando a ferramenta de bioinformática MultiAlin, disponível *online* e as sequências foram obtidas do banco de dados NCBI (CORPET, 1988, PRUITT et al., 2013).

Fez-se uma comparação com o teste CONFIRME FERTILIDADE (ALAMAR TECNO CIENTÍFICA LTDA.) para conferir se ele também apresentava essa reação cruzada. Observou-se que ambos os kits sofrem interferência do hCG.

A identificação da reação cruzada com o hCG foi incluída na revisão do Gerenciamento de Risco e a ação tomada para prevenir esse risco foi incluir uma orientação na bula dizendo que o produto não deve ser utilizado por mulheres grávidas.

Terminada a análise de reação cruzada, fizeram-se os testes de estabilidade acelerada e iniciaram-se os testes de estabilidade em tempo real. Concomitantemente aos testes de estabilidade, enviaram-se os kits para validação externa onde não foram encontradas evidências que impossibilitassem a fabricação desse produto pela WAMA Diagnóstica.

Terminada a fase de testes com o produto, partiu-se para a fase de finalização das documentações relativas à etapa de validação do produto. Fez-se a oficialização das fichas técnicas de produção, embalagem e repartição e os documentos foram aprovados pelo Responsável de Fabricação do produto e pela Garantia da Qualidade da WAMA.

Em seguida todas as matérias-primas e fornecedores foram cadastrados no sistema computacional da empresa e as Instruções de Uso foram elaboradas incluindo todos os dados obrigatórios pela legislação vigente. Fez-se também uma revisão do gerenciamento de risco incluindo os perigos identificados nas fases de desenvolvimento e validação do protótipo, como a reação cruzada com amostras contendo hCG, levando a um resultado falso positivo.

Por fim, tendo sido aprovado em todos os testes submetidos, ao final do processo de validação é redigido um relatório técnico que deverá ser encaminhado à ANVISA para registro do produto seguindo as normas da RDC 206/2006, destinada a produtos de diagnóstico na categoria autoteste. Devido a uma manobra comercial decidiu-se não realizar o registro do produto junto à ANVISA. O registro será feito assim que um número potencial de compradores for estabelecido.

Todas as etapas acima descritas foram feitas obedecendo-se o modelo proposto nesta dissertação, que se mostrou eficaz para o desenvolvimento de um kit na plataforma de teste rápido. O teste usado como modelo atendeu aos requisitos iniciais do projeto e foi aprovado em todos os testes exigidos pela legislação vigente assegurando a qualidade do produto. Quando comparado a um teste comercial

vendido no mercado, o teste desenvolvido mostrou melhores resultados, indicando que o modelo proposto baseado nas normas é capaz de produzir um teste seguro e de qualidade. O modelo poderá facilmente ser utilizado no desenvolvimento de outros testes rápidos e poderá até mesmo ser aplicado no desenvolvimento de outros testes diagnósticos, já que as etapas gerais descritas nas fases de “Planejamento de Projeto”, “Desenvolvimento” e “Validação” são comuns para outros testes, de outras metodologias.

Um esquema geral do modelo proposto pode ser visto no Anexo A. O procedimento está dividido em três etapas: Plano de projeto, Desenvolvimento e Validação. Dentro de cada uma dessas fases há uma série de atividades que devem ser cumpridas e no final de cada fase há uma etapa chamada “Análise Crítica”, onde é feita uma reunião com os envolvidos no projeto para verificar que todas as etapas relativas àquela etapa foram cumpridas, podendo prosseguir para a próxima etapa. Caso seja constatado que alguma etapa não foi cumprida, permanece-se nesta fase até a conclusão da atividade. No modelo proposto também é possível nomear os responsáveis por cada etapa no projeto e indicar a data prevista e a realizada para cada atividade. Com isso é possível gerenciar o tempo gasto com o projeto e verificar se ele se encontra dentro do prazo. O gerenciamento do projeto também poderá ser feito usando outras ferramentas como o MS Project.

6. CONCLUSÃO

1- Descreveu-se a metodologia para a obtenção de um kit diagnóstico desde a fase de planejamento, passando pela fase de desenvolvimento, até a fase de validação seguindo as normas de gestão da ISO 9001:2008 e as boas práticas de fabricação da RDC 16 de 2013. Utilizou-se como exemplo o desenvolvimento de um teste rápido para detecção do hormônio luteinizante que poderá servir como um modelo para a gestão e desenvolvimento de novos projetos em empresas do ramo diagnóstico.

2- O kit IMUNO-RÁPIDO LH foi planejado, desenvolvido e validado conforme os procedimentos descritos nesta dissertação e seu desempenho foi confirmado através de inúmeros testes tornando-o apto para ser lançado no mercado brasileiro. Devido a uma manobra comercial o produto se encontra parado na fase de Registro.

7. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de São Carlos em 23 de fevereiro de 2015, sob Protocolo CAAE nº 38507414.7.0000.5504 (Anexo B). As amostras de urina utilizadas foram previamente coletadas e codificadas pelo laboratório clínico de forma que a identidade dos sujeitos não foi revelada à pesquisadora. Dessa forma, aprovou-se a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT LABORATORIES (Abbott Park). Julian Gordon, Charles S. G. Pugh. **Lateral flow chromatographic binding assay device**. Int. Cl.⁵ G01N 33/58. US Pat. 4.956.302. 15 mai. 1989, 11 set. 1990. United States Patent.
- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F., org. **Métodos de investigação epidemiológicas em doenças transmissíveis**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1997. v. 1.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 13485**: Produtos para saúde - Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos para fins regulamentares. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 14971**: Produtos para a saúde - Aplicação de gerenciamento de risco a produtos para a saúde. Rio de Janeiro: ABNT, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 15223-1**: Produtos para a saúde — Símbolos a serem utilizados em rótulos, rotulagem e informações a serem fornecidas de produtos para saúde Parte 1: Requisitos gerais. Rio de Janeiro: ABNT, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 15223-2**: Produtos para a saúde — Símbolos a serem utilizados em rótulos, rotulagem e informações a serem fornecidas de produtos para saúde Parte 2: Desenvolvimento, seleção e validação de símbolos. Rio de Janeiro: ABNT, 2013.
- BECTON DICKINSON AND COMPANY (Franklin Lakes). Robert L. Campbell, Daniel B. Wagner, James P. O'Connell. **Solid phase assay with visual readout**. Int. Cl.⁴ G01N 33/532; G01N 33/543; G01N 33/544; G01N 33/548. US Pat. 4.703.017. 14 fev. 1984, 27 out. 1987. United States Patent.
- BECTON DICKINSON AND COMPANY (Franklin Lakes). Robert W. Rosenstein, Timothy G. Bloomster. **Solid phase assay employing capillary flow**. Int. Cl.⁴ G01N 33/558; G01N 33/549. US Pat. 4.855.240. 13 mai. 1987, 8 ago. 1989. United States Patent.
- BEHRE, H. M. et al. Prediction of ovulation by urinary hormone measurements with the home use ClearPlan Fertility Monitor: comparison with transvaginal ultrasound scans and serum hormone measurements. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 2478-2482, 2000.
- BERSON, S. A.; YALOW, R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. **J. Clin. Invest.**, v. 38, p. 1996–2016, 1959.
- BLAS, I. Working in Epidemiology. **WinEpi**, c2006. Disponível em: <<http://www.winepi.net/>>. Acesso em: 20 Março 2015.

- BORGES, L. O que é e como calcular o Valor Presente Líquido. **Blog.luz.vc**, 2013? Disponível em: <<http://blog.luz.vc/o-que-e/o-que-e-e-como-calculer-o-valor-presente-liquido/>>. Acesso em: 22 Abril 2015.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 206, de 17 de novembro de 2006. Estabelece regulamento técnico de produtos para diagnóstico de uso in vitro e seu registro, cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 221, p. 36-38, 2006.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 16, de 28 de março de 2013**. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0016_28_03_2013.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Teste Rápido - porque não? Estudos que contribuiriam para a política de ampliação da testagem para o HIV no Brasil**. p. 29-30, 2007.
- BROWN, M. C. Antibodies: Key to a Robust Lateral Flow Immunoassay. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 59-74, 2009.
- CHUN, P. Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 75-93, 2009.
- CROWTHER, J. R. **Methods in Molecular Biology: ELISA – Theory and Practice**. v. 42. New Jersey: Humana Press, 1995.
- COMISSÃO EUROPEIA. DG Health and Consumers (SANCO). **MEDDEV 2.12-1 Rev. 8**: Guidelines on a medical devices vigilance system. Janeiro 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/medical-devices/files/meddev/2_12_1_ol_en.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- CONFIRME FERTILIDADE. Diadema: Alamar Tecno Científica Ltda., 2013. Instruções de uso.

- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, p. 10881-10890, 1988.
- DE CICCIO, F. **A nova NBR ISO 21500 sobre Gestão de Projetos**. QSP, 2012. Disponível em: <<http://www.iso31000qsp.org/2012/10/a-nova-nbr-iso-21500-sobre-gestao-de.html>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia – um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
- DIREITO, A. et al. Relationship between the luteinizing hormone surge and other characteristics of the menstrual cycle in normally ovulating women. **Fertil. Steril.**, v. 99, p. 279-285, 2013.
- DOURADO, Z. F. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Rev. Patol. Trop.**, v.36, n. 3, p. 205-214, 2007.
- DUARTE JUNIOR, N. S. F. **O atendimento aos requisitos de projeto e desenvolvimento da ISO 9001:2008 em empreendimentos**. Banas Qualidade, 2013. Disponível em: <<http://www.banasqualidade.com.br/2012/portal/conteudo.asp?codigo=16459&secao=Revista>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G**. *Immunochemistry*, v. 8, p. 871-874, 1971.
- FARIA, D. E. P.; GRIECO, S. C.; BARROS, S. M. O. Efeitos da infertilidade no relacionamento dos cônjuges. **Rev. Esc. Enfer. USP**, v. 46, n. 4, p. 794-801, 2012.
- 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.
- FREITAS, A. **ISO 9001:2008 – 7.3. Projeto e desenvolvimento**. Academia platônica, 2011. Disponível em: <<http://academiaplatonica.com.br/2011/gestao/iso-90012008-7-3-projeto-e-desenvolvimento/>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- HALLAST, P. **Human and chimpanzee Luteinizing hormone/Chorionic Gonadotropin beta (LHB/CGB) gene clusters: diversity and divergence of young duplicated genes**. 2009. 93 f. Tese (Doutorado em Filosofia em diagnóstico molecular) - Instituto de Biologia Celular e Molecular, Universidade de Tartu, Estônia, 2009.

- HERMES PARDINI. Interferências em Imunoensaios. **Boletim Técnico**, n. 10, 2010. Disponível em: <<http://www3.hermespardini.com.br/media/194/cgh-array.aspx>>. Acesso em: 10 jun. 2015.
- JIANG, X.; DIAS, J. A.; HE, X. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 382, p. 424-451, 2014.
- KAWANO, T.; MATSUURA, K.; HONDA, R. Prediction of ovulation by urinary LH surge. **Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi**, v. 68, p. 1188-1196, 1992.
- KETEMA, F. et al. Assessment of the performance of a rapid, lateral flow assay for the detection of antibodies to HIV. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 27, n. 1, p. 63–70, 2001.
- LEUVERING, J. H. et al. Sol particle immunoassay (SPIA). **J. Immunoassay**, v. 1, n. 1, p. 77–91, 1980.
- LIMA, A. O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica – técnica e interpretação**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- LIMA, J. R. C. et al. Interpretation of the presence of IgM and IgG antibodies in a rapid test for dengue: analysis of dengue antibody prevalence in Fortaleza City in the 20th year of the epidemic. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, p. 163-167, 2012.
- LITMAN, D. J.; HANLON, T. M.; ULLMAN, E. F. Enzyme channeling immunoassay: A new homogeneous enzyme immunoassay technique. **Anal. Biochem.**, v. 106, p. 223–229, 1980.
- MASCIOTRA, S. et al. Performance of the Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo Rapid Test with specimens from HIV-1 seroconverters from the US and HIV-2 infected individuals from Ivory Coast. **J. Clin. Virol.**, v. 58, p. e54-e58, 2013.
- 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.
- 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.
- MILLER, P. B.; SOULOES, M. R. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. **Obstet. Gynecol.**, v. 87, p. 13-17, 1996.
- MILLIPORE. **Rapid lateral flow test strip: Considerations for product development**. Estados Unidos, c2006.

- MOGHISSI, K. S. **Documentation of ovulation**. Glob. Libr. Women's Med., 2008. Disponível em: <http://www.glowm.com/section_view/heading/Documentation%20of%20Ovulation/itei/324>. Acesso em: 18 fev. 2014.
- 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, 2013. cap. 2,4, p. 89-107.
- OKU, Y. et al. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. **J. Immunol. Methods**, v. 258, p. 73-84, 2001.
- PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W. T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Immunol. Methods**, v. 64, p. 205-214, 1983.
- PARK, S. J. et al. Characteristics of the urinary luteinizing hormone surge in young ovulatory women. **Fertil. Steril.**, v. 88, p. 684-690, 2007.
- PEARLSTONE, A. C.; SURREY, E. S. The temporal relation between the urine LH surge and sonographic evidence of ovulation: determinants and clinical significance. **Obstet. Gynecol.**, v. 83, p. 184-188, 1994.
- PEINADO, J.; GRAEML, A. R. **Administração da produção**: operações industriais e de serviços. Curitiba: UnicenP, 2007. 750 p.
- PIERCE, J. G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 465-95, 1981.
- PMKB. **ISO 21500**. [entre 2006 e 2014]. Disponível em: <<http://pmkb.com.br/sig/padroes-frameworks/iso-21500/>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- PONS, R. **Lançada a Norma ABNT ISO 21500 – Orientações para o gerenciamento de Projetos**. Projectblog, 2012. Disponível em: <<http://www2.projectlab.com.br/blog/index.php/home/lancada-a-norma-abnt-iso-21500-orientacoes-para-o-gerenciamento-de-projetos/>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- PONTI, J. S. Material Platform for the Assembly of Lateral Flow Immunoassay Test Strips. In: WONG, R.C. and TSE, H.Y (eds.). **Lateral Flow Immunoassay**. New York: Humana Press, p. 51-57, 2009.

- 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.
- POWERS, J. LH, **Luteinizing Hormone; Beckman Unicel Dxl800**. The clinical laboratory testing manual. 2011. Disponível em: <<http://webserver.pa-ucl.com/wwwdocs/analyticalproc/FrameA.htm>>. Acesso em: 04 mar. 2014.
- PRUITT, K. D. et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. **Nucleic Acids Res.**, p. D756-D763, 2013.
- RESENDE, E. A. M. R. **Avaliação dos hormônios LH e FSH basais e pós GnRH no diagnóstico de menopausa determinados por imunoquimioluminescência**. 2010. 142 f. Tese (Doutorado em Patologia Clínica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.
- SCHAMBECK, C. M.; BEDEL, A.; KELLER, F. Limit of quantification (functional sensitivity) of the new IMx Tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 10, p. 2217, 1998.
- SINGER, J. M.; PLOTZ, C. M. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, v. 21, n. 6, p. 888-892, 1956.
- SOTILLE, M. **ISO 21500: Orientações sobre Gerenciamento de Projetos**. PM Tech Blog, 2012. Disponível em: <<http://blog.pmtech.com.br/iso-21500-orientacoes-sobre-gerenciamento-de-projetos/>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- STRAUSS, J. F.; BARBIERI, R. L. (Eds.). **Yen and Jaffe's - Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management**. 6^a ed. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2009c.
- SYVA COMPANY (Palo Alto). Henry K. Tom, Gerald L. Rowley. **Concentrating Zone Method in Heterogeneous Immunoassays**. Int. Cl.³ G01N 33/16; C12Q 1/70. US Pat. 4.366.241. 7 ago. 1980, 28 dez. 1982. United States Patent.
- SYVA COMPANY (Palo Alto). David J. Litman, Edwin F. Ullman. **Test strip kits in immunoassays and composition therein**. Int. Cl.³ G01N 33/54; G01N 21/00; G01N 1/48; G01N 21/06. US Pat. 4.391.904. 17 abr. 1981, 5 jul. 1983. United States Patent.
- TATE, J.; WARD, G. Interferences in Immunoassay. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 25, p. 105-120, 2004.
- THOMA, M. E. et al. The prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. **Fertil. Steril.**, v. 99, n. 5, p. 1324-1331, 2013.

- THYROID DIAGNOSTICS, INC. (Bedford). Marshall E. Deutsch, Louis W. Mead. **Test Device**. Int. Cl.² G01N 33/16. US Pat. 4.094.647. 2 jul. 1976, 13 jun. 1978. United States Patent.
- TOLEDO, J. C. et al. Fatores críticos de sucesso no gerenciamento de projetos de desenvolvimento de produto em empresas de base tecnológica de pequeno e médio porte. **Gest. Prod.**, v. 15, p. 117-134, 2008.
- UNILEVER PATENT HOLDINGS B.V. (Netherlands). Keith May, Michael E. Prior, Ian Richards. **Capillary immunoassay and device therefor comprising mobilizable particulate labelled reagents**. Int. Cl.⁶ G01N 33/558, US Pat. 5.622.871. 15 jul. 1993, 22 abr. 1997. United States Patent.
- VAITUKAITIS, J. L., BRAUNSTEIN, G. D.; ROSS, G. T. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 15, p. 751–758, 1972.
- VENTREX LABORATORIES, INC. (Portland). Roger N. Piasio, David A. Perry, Pangal N. Nayak. **Method and apparatus for performing *in vitro* clinical diagnostic tests using a solid phase assay system**. Int. Cl.² G01N 33/16; A61K 43/00; B01J 1/22 US Pat. 4.225.575. 15 mai. 1978, 30 set. 1980. United States Patent.
- WEBSTER, K. et al. **Determination of Analytical Sensitivity for the Prionics® - Check LIA and Prionics® - Check PrioStrip BSE Rapid Tests**. Community Reference Laboratory. [S.I.], p. 14. 2010.
- WELLER, M. G. Immunochromatographic techniques – a critical review. **J. Anal. Chem.**, v. 366, p. 635-645, 2000.
- WILKINSON, D. et al. On-site HIV testing in resource-poor settings: is one rapid test enough? **AIDS**, v. 11, n. 3, p. 377–381, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/ UNAIDS. **Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera**. Relatório 11. Geneva: s.n., 1999. Disponível em: <http://data.unaids.org/publications/external-documents/who_bts_99-1_en.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2014.
- ZANELLA, R. **Cromatografia em Camada Delgada (CCD) ou Thin Layer Chromatography (TLC)**. Universidade Federal de Santa Maria, [200-?]. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/larp/media/camada_delgada_teorica.pdf> Acesso em: 21/07/2010.

APÊNDICES

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

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
1	1,65	-	N/A
2	1,37	-	N/A
3	0,24	-	N/A
4	1,55	-	N/A
5	1,79	-	N/A
6	4,61	-	N/A
7	18,86	-	N/A
8	0,17	-	N/A
9	0,11	-	N/A
10	0,32	-	N/A
11	2,67	-	N/A
12	0,04	-	N/A
13	7,08	-	N/A
14	16,99	-	N/A
15	0,82	-	N/A
16	0,32	-	N/A
17	0,35	-	N/A
18	1,2*	+	N/A
19	0,76	-	N/A
20	0,01	-	N/A
21	2,28	-	N/A
22	7,65	-	N/A
23	2,78	-	N/A
24	0,21	-	N/A
25	0,43	-	N/A
26	5,41	-	N/A
27	6,88	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
28	0,02	-	N/A
29	0,08	-	N/A
30	2,09	-	N/A
31	6,16	-	N/A
32	1,33	-	N/A
33	3,92	-	N/A
34	15,96	-	N/A
35	9,29	-	N/A
36	0,41	-	N/A
37	1,38	-	N/A
38	3,52	-	N/A
39	1,16	-	N/A
40	1,86	-	N/A
41	0,1	-	N/A
42	0,72	-	N/A
43	23,74	-	N/A
44	3,36	-	N/A
45	3,15	-	N/A
46	0,33	-	N/A
47	1,47	-	N/A
48	6,03	-	N/A
49	6,19	-	N/A
50	2,06	-	N/A
51	22,43	-	N/A
52	1,16	-	N/A
53	18,22	+	N/A
54	3,27	-	N/A
55	0,44	-	N/A
56	7,34	-	N/A
57	3,56	-	N/A
58	11,17	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
59	2,94	-	N/A
60	10,98	-	N/A
61	48,21	+	N/A
62	0,04	-	N/A
63	1,25	-	N/A
64	0,19	-	N/A
65	0,06	-	N/A
66	1,48	-	N/A
67	6,98	-	N/A
68	0,71	-	N/A
69	0,01	-	N/A
70	1,04	-	N/A
71	0,01	-	N/A
72	7,98	-	N/A
73	16,78	-	N/A
74	5,3	-	N/A
75	0,01	-	N/A
76	3,69	-	N/A
77	1,4	-	N/A
78	0,86	-	N/A
79	0,15	-	N/A
80	0,6	-	N/A
81	4,78	-	N/A
82	1,06	-	N/A
83	3,36	-	N/A
84	0,02	-	N/A
85	0,46	-	N/A
86	5,4	-	N/A
87	40,65	+	N/A
88	8,27	-	N/A
89	1,62	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
90	0,75	-	N/A
91	8,63	-	N/A
92	1,23	-	N/A
93	0,84	-	N/A
94	2,43	-	N/A
95	4,01	-	N/A
96	1,48	-	N/A
97	8,18	-	N/A
98	1,02	-	N/A
99	0,46	-	N/A
100	7,69	-	N/A
101	0,16	-	N/A
102	33,32	-	N/A
103	0,73	-	N/A
104	0,12*	+	N/A
105	30,67	+	N/A
106	0,53	-	N/A
107	1,85	-	N/A
108	0,64	-	N/A
109	4,97	-	N/A
110	3,4	-	N/A
111	11,1	-	N/A
112	1,69	-	N/A
113	7,28	-	N/A
114	0,76	-	N/A
115	1,66	-	N/A
116	3,49	-	N/A
117	1,6	-	N/A
118	0,28	-	N/A
119	3,09	-	N/A
120	0,1	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
121	8,87	-	N/A
122	8,23	-	N/A
123	0,27	-	N/A
124	0,21	-	N/A
125	4,09	-	N/A
126	1,16	-	N/A
127	0,88	-	N/A
128	13,87	-	N/A
129	9,51	-	N/A
130	0,94	-	N/A
131	5,86	-	N/A
132	6,72	-	N/A
133	4,15	-	N/A
134	22,01	-	N/A
135	35,23	-	N/A
136	2,08	-	N/A
137	0,39	-	N/A
138	1,12	-	N/A
139	2,16	-	N/A
140	12,59	-	N/A
141	1,94	-	N/A
142	0,98	-	N/A
143	20,38	-	N/A
144	3,72	-	N/A
145	2,54	-	N/A
146	23,94	+	N/A
147	3,1	-	N/A
148	14,19	-	N/A
149	1,3	-	N/A
150	0,01	-	N/A
151	0,06	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
152	0,07	-	N/A
153	0,69	-	N/A
154	3,48	-	N/A
155	0,01	-	N/A
156	6,26	-	N/A
157	8,25	-	N/A
158	0,04	-	N/A
159	1,53	-	N/A
160	3,08	-	N/A
161	8,92	-	N/A
162	6,77	-	N/A
163	2,04	-	N/A
164	0,98	-	N/A
165	16,51	-	N/A
166	2,88	-	N/A
167	0,52	-	N/A
168	0,1	-	N/A
169	3,45	-	N/A
170	0,02	-	N/A
171	4,63	-	N/A
172	0,85	-	N/A
173	0,59	-	N/A
174	0,08	-	N/A
175	4,08	-	N/A
176	0,14	-	N/A
177	9,45	-	N/A
178	0,95	-	N/A
179	0,23	-	N/A
180	0,22	-	N/A
181	0,04	-	N/A
182	1,96	-	N/A

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
183	5,44	-	N/A
184	7,73	-	N/A
185	0,1	-	N/A
186	2,99	-	N/A
187	5,22	-	N/A
188	2,3	-	N/A
189	4,33	-	N/A
190	0,4	-	N/A
191	9,57	-	-
192	3,94	-	-
193	2,91	-	-
194	0,01	-	-
195	46,62	+	+
196	4,17	-	-
197	5,96	-	-
198	5,59	-	-
199	9,66	-	-
200	1,86	-	-
201	0,1	-	-
202	2,4	-	-
203	2,16	-	-
204	0,02	-	-
205	0,16	-	-
206	5,13	-	-
207	2,82	-	-
208	1,18*	-	+
209	1,32	-	-
210	6,97	-	-
211	2,98	-	-
212	8,62	-	-
213	20,66	-	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
214	4,21	-	-
215	1,8	-	-
216	2,47	-	-
217	26,9	+	-
218	1,12	-	-
219	14,53	-	-
220	11,96	-	-
221	6,29	-	-
222	5,58	-	-
223	0,85	-	-
224	1,44	-	-
225	1,03	-	-
226	0,13*	-	+
227	0,84	-	-
228	7,36	-	-
229	6,34	-	-
230	5,92	-	-
231	3,82	-	-
232	3,34	-	-
233	1,37	-	-
234	2,56	-	-
235	5,33	-	-
236	0,49	-	-
237	1,04	-	-
238	0,03	-	-
239	1,22	-	-
240	10,12	-	-
241	0,9	-	-
242	1,43	-	-
243	5,08	-	-
244	23,44	-	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
245	6,13	-	-
246	8,29	-	-
247	2,5	-	-
248	12,21	-	-
249	0,94	-	-
250	4,11	-	-
251	7,48	-	-
252	3,21	-	-
253	1,8	-	-
254	11,44	-	-
255	2,6	-	-
256	2,85	-	-
257	0,06	-	-
258	3,57	-	-
259	0,62	-	-
260	0,87	-	-
261	2,33	-	-
262	3,47	-	-
263	16,81	-	-
264	7,75	-	-
265	2,61	-	-
266	0,19	-	-
267	4,29	-	-
268	0,84	-	-
269	2,05	-	-
270	2,53	-	-
271	17,45	-	-
272	1,06	-	-
273	0,49	-	-
274	0,38	-	-
275	2,07	-	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
276	0,28	-	-
277	0,42	-	-
278	3,91	-	-
279	0,97	-	-
280	0,58	-	-
281	0,25	-	-
282	14,55	-	-
283	2,46	-	-
284	3,61	-	-
285	11,79	-	-
286	1,15	-	-
287	5,81	-	-
288	3,24	-	-
289	1,79	-	-
290	3,39	-	-
291	4,17	-	-
292	13,63	-	-
293	2,49	-	-
294	15,71	-	-
295	8,82	-	-
296	2,77	-	-
297	7,67	-	-
298	5,47	-	-
299	13,36	-	-
300	1,07	-	-
301	2,75	-	-
302	1,62	-	-
303	0,96	-	-
304	2,52	-	-
305	6,71	-	-
306	2,68	-	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
307	0,15	-	-
308	1,2	-	-
309	0,04	-	-
310	0,07	-	-
311	0,12*	+	+
312	1,45	-	-
313	0,07	-	-
314	0,5	-	-
315	0,05	-	-
316	13,36	-	-
317	6,24	-	-
318	34,25	+	-
319	3,63	-	-
320	0,13	-	-
321	1,92	-	-
322	10,35	-	-
323	0,57	-	-
324	0,21	-	-
325	0,01	-	-
326	1,22	-	-
327	1,48	-	-
328	4,35	-	-
329	16,79	-	-
330	1,35	-	-
331	18,72	-	-
332	5,2	-	-
333	0,24	-	-
334	1,7	-	-
335	1,31	-	-
336	11,82	-	-
337	8,8	-	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
338	8,6	-	-
339	2,42	-	-
340	1,65	-	-
341	21,71	-	+
342	1,87	-	-
343	5,05	-	-
344	2,93	-	-
345	4,17	-	-
346	0,63	-	-
347	0,23	-	-
348	0,05	-	-
349	1,09	-	-
350	0,03*	-	+
351	1,32	-	-
352	2	-	-
353	0,1	-	-
354	9,47	-	-
355	0,66	-	-
356	0,01	-	-
357	0,2	-	-
358	0,46	-	-
359	2,77	-	-
360	0,39	-	-
361	0,38	-	-
362	0,03	-	-
363	7,57	-	-
364	23,15	-	-
365	0,1	-	-
366	1,03	-	-
367	6,38	-	-
368	12,06	+	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
369	9,72	-	-
370	20,04	-	-
371	0,38	-	-
372	0,88	-	-
373	3,16	-	-
374	7,61	-	-
375	33,54	+	-
376	18,33	-	-
377	0,1	-	-
378	24,7	+	-
379	7,19	-	-
380	7,57	-	-
381	2,69	-	-
382	3,86	-	-
383	4,52	-	-
384	0,41	-	-
385	0,71	-	-
386	0,58	-	-
387	4,24	-	-
388	9,23	-	-
389	1,83	-	-
390	1,21	-	-
391	0,97	-	-
392	0,35	-	-
393	0,59	-	-
394	26,59	+	-
395	32,57	+	+
396	38,82	+	-
397	48,06	+	+
398	31,99	+	-
399	36,22	+	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
400	34,67	+	-
401	38,09	+	+
402	35,39	+	+
403	38,51	+	+
404	39,47	+	+
405	39,7	+	+
406	43,83	+	+
407	42,94	+	+
408	45,71	+	+
409	45,21	+	+
410	45,52	+	+
411	46,49	+	+
412	47,75	+	+
413	48,92	+	+
414	49,45	+	-
415	53,97	+	+
416	51,72	+	+
417	55,21	+	+
418	53,64	+	+
419	57,13	+	+
420	59,53	+	+
421	58,17	+	+
422	61,07	+	+
423	61,12	+	+
424	59,2	+	+
425	60,48	+	+
426	61,56	+	+
427	61,83	+	+
428	66,31	+	+
429	65,63	+	+
430	70,62	+	+

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
431	41	+	+
432	75,05	+	+
433	33,62	+	-
434	34,66	+	-
435	35	+	+
436	38,4	+	+
437	45,99	+	+
438	46,81	+	+
439	47,38	+	+
440	44,1	+	+
441	49,55	+	+
442	50,46	+	+
443	49,24	+	+
444	48,69	+	+
445	50,81	+	+
446	53,64	+	+
447	55,66	+	+
448	53,56	+	+
449	57,42	+	+
450	54,62	+	+
451	57,82	+	+
452	58,89	+	+
453	62,59	+	+
454	62,64	+	+
455	63,56	+	+
456	42,38	+	-
457	24,81	+	-
458	29,79	+	+
459	38,95	+	-
460	73,26	+	+
461	73,9	+	+

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
462	91,92	+	+
463	81,81	+	+
464	38,73	+	-
465	39,07	+	-
466	40,3	+	-
467	42,1	+	-
468	43,43	+	-
469	46,95	+	-
470	47,4	+	-
471	49,63	+	-
472	51,38	+	-
473	49,57	+	+
474	50,95	+	+
475	52,35	+	+
476	52,68	+	+
477	56,2	+	+
478	57,7	+	+
479	60,85	+	+
480	64,4	+	+
481	65,25	+	+
482	65,45	+	+
483	67,84	+	+
484	69,27	+	+
485	71,54	+	+
486	75,81	+	+
487	40,68	+	+
488	41,77	+	-
489	43,63	+	-
490	50,12	+	-
491	49,95	+	-
492	54,77	+	-

AMOSTRA	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (mUI/mL)	IMUNO-RÁPIDO LH WAMA	CONFIRME FERTILIDADE
493	25,51	+	-
494	26,38	+	-
495	27,1	+	-
496	28,02	+	-
497	28,04	-	-
498	27,85	+	-
499	26,5	+	-
500	26,12	+	-

*hCG positivas

ANEXOS

ANEXO A – Modelo de procedimento para o desenvolvimento de projetos de kits diagnósticos.

	ETAPAS DO PROJETO	Responsáveis	ANO												OBSERVAÇÃO/ APROVAÇÃO		
			jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez			
PLANO DE PROJETO	Definição do coordenador do projeto.	Direção															
	Definição da equipe responsável pelo desenvolvimento do projeto e das funções de cada componente.	Coordenador do Projeto															
	Bibliografia de apoio. Definição do prazo de conclusão do projeto.	Equipe						-									
	Requisitos de funcionamento do produto	Equipe															
	Requisitos estatutários e regulamentares aplicáveis	Equipe / Coord. Qualidade															
	Onde aplicável, informações originadas de projetos anteriores	Equipe															
	Requisitos essenciais para projeto e desenvolvimento	Equipe															
	Gerenciamento de risco	Equipe / Coord. Qualidade															
	Elaboração do protocolo para início dos experimentos e forma de verificação das amostras produzidas.	Equipe															
	Levantamento das necessidades de equipamentos e matéria-prima necessários para o desenvolvimento do projeto.	Direção / Coord. Projeto															
	Levantamento de custo dos produtos identificados no item anterior	Compras / Coord. Projeto															
	Análise da viabilidade técnica do projeto.	Equipe															
	Análise da viabilidade financeira do projeto.	Direção															
			() Aprovado, seguir com desenvolvimento () Reprovado, justificativas:														
			Ass. Equipe e Direção														
	ANÁLISE CRÍTICA DO PROJETO																

ETAPAS DO PROJETO	Responsáveis	ANO												OBSERVAÇÃO/ APROVAÇÃO	
		jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez		
Fabricação do lote comercial.	Equipe														
		planejado					cumprido								

ANÁLISE CRÍTICA DE FINALIZAÇÃO DE PROJETO	
Data de Encerramento:	() Aprovado, comercializar () Reprovado, justificativas:
Responsável Técnico:	Ass. Diretor
Coordenador Projeto:	Equipe:

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: METODOLOGIA DE DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE KIT DIAGNÓSTICO ADOTANDO COMO MODELO O TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH)

Pesquisador: Maria Angélica de Camargo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 38507414.7.0000.5504

Instituição Proponente: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Patrocinador Principal: WAMA PRODUTOS PARA LABORATORIO LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 960.304

Data da Relatoria: 15/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado do programa de pós-graduação em genética evolutiva e biologia molecular da UFSCar. O protocolo está bem apresentado e descreve com detalhes o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Do protocolo:

"

Descrever a metodologia para o desenvolvimento e validação de um kit diagnóstico seguindo as normas de gestão da ISO 9001:2008 e as boas práticas de fabricação da Portaria 686 de 1998 e da RDC 167 de 2004, tomando como modelo o desenvolvimento de um kit para detecção do hormônio luteinizante em amostras de urina utilizando a plataforma de teste rápido"

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não prevê o contato direto da equipe de pesquisadores com os sujeitos de pesquisa. Os pesquisadores utilizarão amostras de urina já coletadas e codificadas de forma que a identidade dos sujeitos não será revelada nem mesmo aos pesquisadores. Este contexto minimiza qualquer risco existente.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SAO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR



Continuação do Parecer: 960.304

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios estão presentes e justifica-se a ausência de TCLE.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO CARLOS, 23 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Ricardo Carneiro Borra
(Coordenador)

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