

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Marli Melo da Silva**

**AVALIAÇÃO DA COMUTATIVIDADE DE PAINEL DE REFERÊNCIA UTILIZADO NO  
CONTROLE DE QUALIDADE DOS KITS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO  
HCV: UM INSTRUMENTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

Rio de Janeiro

2016

Marli Melo da Silva

**AVALIAÇÃO DA COMUTATIVIDADE DE PAINEL DE REFERÊNCIA UTILIZADO NO  
CONTROLE DE QUALIDADE DOS KITS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO  
HCV: UM INSTRUMENTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes e Prof. Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Silva, Marli Melo da

Avaliação da comutatividade de painel de referência utilizado no controle de qualidade dos kits para diagnóstico sorológico do HCV: um instrumento de vigilância sanitária. / Marli Melo da Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

101 f. : il. ; tab. ; graf.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith.

Co-orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

1. Hepatite C. 2. Comutabilidade. 3. Técnicas Imunoenzimáticas.  
I. Título

**ASSESSMENT OF COMMUTABILITY OF REFERENCE PANEL USED IN THE  
QUALITY CONTROL OF KITS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF HCV: A  
HEALTH SURVEILLANCE INSTRUMENT**

Marli Melo da Silva

**AValiação da Comutatividade de Painel de Referência Utilizado no  
Controle de Qualidade dos Kits para Diagnóstico Sorológico do  
HCV: Um Instrumento de Vigilância Sanitária**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor) - Presidente  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marco Antônio Mota da Silva (Doutor)  
Universidade Estadual da Zona Oeste

---

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## "Pegadas na Areia

Sonhei que estava caminhando na praia juntamente com Deus. E revi, espelhado no céu, todos os dias da minha vida. E em cada dia vivido, apareciam na areia, duas pegadas: as minhas e as d'Ele.

No entanto, de quando em quando, vi que havia apenas as minhas pegadas, e isso precisamente nos dias mais difíceis da minha vida.

Então perguntei a Deus: "Senhor, eu quis seguir-Te, e Tu prometeste ficar sempre comigo. Porque deixaste-me sozinho, logo nos momentos mais difíceis?"

Ao que Ele respondeu: "Meu filho, Eu te amo e nunca te abandonei. Os dias em que viste só um par de pegadas na areia são precisamente aqueles em que Eu te levei nos meus braços."

## AGRADECIMENTOS

- À Deus toda honra e toda glória, pois sem Ele nada seria possível.
- À minha filha, minha mãe, minha irmã e minha família, pelo amor, incentivo e torcida que sempre tiveram por mim e abriram mão de um tempo muito precioso de convivência para que eu finalizasse esse trabalho.
- Aos Professores Shirley de Mello Pereira Abrantes e Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida, meus orientadores, que me possibilitaram realizar este trabalho. Pela sua confiança, amizade e, principalmente, pelos vários ensinamentos.
- A chefe do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), e amiga tão chegada como uma irmã, Marisa Coelho Adati, pelo incentivo na conclusão desta tese, por ter sugerido o tema, por ter confiado a mim a responsabilidade de desenvolvê-lo e pela incansável ajuda na realização da tarefa.
- Ao colega Sérgio Alves da Silva que, com seus conhecimentos em química, sistema da qualidade, vigilância sanitária e estatística, me ajudou na imprescindível análise estatística dos dados coletados neste trabalho.
- Ao colega Hudson Eduardo Costa pela ajuda incalculável na obtenção dos dados.
- Aos colegas do laboratório (LSH), Helena Guedes, Daniele Deslandes do Passo, Danielle Vigo, Alvaro Ribeiro, Sabrina Alberti, Margaret Guimarães, Paola Ameixoeira, Rafaelle Motta, Karla Silva e Vanderlei Souza, sou muito grata a vocês pelas valiosas sugestões, ajuda e, sobretudo, por terem me dado apoio na realização das atividades de rotina enquanto eu estava dedicada na realização deste trabalho.
- Aos irmãos em Cristo, da Igreja Batista de Tauá, que oraram incansavelmente por mim, principalmente, nos momentos de quase desistência pelas grandes dificuldades enfrentadas.
- Especial agradecimento aos professores Tereza Cristina dos Santos (Fiocruz) e Jorge Andrade Pinto (Faculdade Medicina UFMG), orientadores no projeto anterior que, por razões fora da nossa governança, não pode ser levado adiante em tempo hábil para finalização deste doutorado.
- A Coordenação de Pós-graduação, especialmente, professora Katia Leandro, pelo grande incentivo na finalização deste projeto.

Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.

Thomas Edison

## RESUMO

Material de Referência (MR) é um termo genérico utilizado para todos os materiais empregados na avaliação da precisão de um método, por ex., calibração, verificação de equiparação de sistemas analíticos de medidas e o controle da qualidade. A avaliação da comutatividade é um dos requisitos mínimos para a produção de um MR. O termo comutatividade pode ser definido como a capacidade de um MR ou controle ter propriedades interensaios comparáveis às propriedades demonstradas por amostras clínicas autênticas quando medido por mais de um método analítico. Foi utilizado pela primeira vez em ensaios enzimáticos, na década de 60, resultando na padronização das medidas de colesterol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a comutatividade de resultados obtidos do Painel de Referência para o vírus da Hepatite C (HCV), utilizado no controle de qualidade dos *kits* empregados no diagnóstico sorológico do HCV no período de 2009 a 2014, como requisito obrigatório para o registro de tais produtos na ANVISA. Foi realizada busca retrospectiva de resultados das razões DO/CO (*ratio*) obtidos na análise dos *kits* para determinação de HCV em plasma/soro, nas metodologias ELISA e quimioluminescência, nos cadernos de recebimento de amostras do laboratório para confecção de planilhas e registro dos resultados positivo. A avaliação dos dados foi realizada conforme o guia EP 14-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, que sugere a avaliação estatística dos *ratios* das amostras positivas usadas nos *kits* e que atendiam aos critérios de aceitação, utilizando filtro na planilha Excel®. A partir destas verificações, foram realizadas análises utilizando modelos de regressão linear ordinária, no caso, Método dos Mínimos Quadrados Ordinários e, posteriormente, modelo de regressão de Deming dos *ratios*, combinando par-a-par, os *kits* ELISA e quimioluminescência estudados. Inicialmente foram selecionados 37 *kits*, totalizando 471 amostras positivas. Destes, 15 *kits* e 44 amostras atenderam aos critérios de aceitação. Somente 19 amostras apresentaram comutatividade para dois pares de *kits*. Um painel sorológico com essas amostras foi confeccionado para ser utilizado na análise prévia de *kits* diagnóstico do HCV, para cumprir o requisito obrigatório para registros desses produtos para sua comercialização. Para os dois pares de *kits* obtivemos 7 amostras comuns. Só foi possível estabelecer grau de comutatividade entre uma das metodologias

escolhida, ELISA, podendo constituir um painel de amostras verdadeiro positivas comutáveis e usadas na análise prévia de *kits* para diagnóstico do HCV, requisito obrigatório para registro desses produtos.

**Palavras chaves:** Hepatite C, Comutatividade, Ensaio imunoenzimático

## ABSTRACT

Reference Material (RM) is a generic term used for all materials used in the precision method evaluation, as, calibration, comparability verification of analytical measurement systems and quality control. The assessment of commutability is one of the minimum requirements for the production of a RM. The term commutability can be defined as the ability of a RM or control to have inter-laboratory test results comparable to demonstrated properties by clinical samples which are authentic when measured by more than one analytical method. It was first used in enzyme assays in the 1960s, resulting in the standardization of cholesterol measurements. The objective of this work was to evaluate the commutability of results obtained from the reference panel for Hepatitis C Virus (HCV), used in quality control of the kits for serological diagnosis of HCV, in the period 2009 to 2014, as required for the registration of such products by the National Regulatory Agency - ANVISA. It was performed a retrospective search of results of the ratio DO/CO obtained in the analysis of kits for ELISA and chemiluminescence methodologies, in the notebook sample registration at laboratory, to perform a Excel spreadsheets® and to record positive results. The evaluation of the data was performed according to the guide EP 14-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute, which suggests a statistical evaluation of the ratios of positive samples used in the kits and what met the acceptance criteria, using filter in Excel spreadsheet®. On the basis of these verifications analyzes were done using linear regression models meeting, in the case, method of ordinary least squares and, subsequently, the regression model of Deming of ratios, combining pair-to-pair the ELISA kits and chemiluminescence studied. Initially we selected 37 kits, totaling 471 positive samples. Of these, 15 kits and 44 samples met the criteria of acceptance. Only 19 samples presented commutability for two pairs of kits. A serologic panel with these samples of plasma/serum was made to be used in the prior analysis of diagnostic kits of HCV, to fulfill the mandatory requirement for commercial registration of these products. For the two pairs of kits were obtained 7 common samples. It was only possible to establish a degree of commutability between one of the methodologies chosen, ELISA. These samples constitute a panel of positive samples that can be commutables and used

in the previous analysis of HCV diagnostic kits, a mandatory requirement for registration of these products.

**Key words:** HCV, Commutability, Enzymatic Immunoassay

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 01	Estratégia da Qualidade..... 20
Figura 02	O vírus da Hepatite C..... 29
Figura 03	Organização do genoma e principais proteínas com importância diagnóstica do vírus da Hepatite C..... 30
Gráfico 01	Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016 ..... 32
Gráfico 02	Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2016..... 33
Gráfico 03	Taxa de incidência de casos de hepatite C segundo UF e capital de residência. Brasil, 2016..... 34
Gráfico 04	Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2000 a 2015..... 35
Figura 04	Janela imunológica do HCV com os marcadores utilizados..... 37
Figura 05	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... 38
Figura 06	Teste Rápido..... 41
Figura 07	Teste <i>immunoblot</i> – fitas de nitrocelulose..... 42
Figura 08	Obtenção das unidades de plasma nos SH..... 46
Figura 09	Modelo de cadastro das amostras de plasma no LSH..... 47
Figura 10	Processamento das amostras de plasma..... 48
Figura 11	Algoritmo utilizado para caracterização das amostras de plasma no LSH..... 49
Quadro 01	Planilha Excel para coleta de informações nos cadernos..... 53
Quadro 02	Planilha Excel para coleta de informações dos protocolos dos kits diagnósticos para os testes ELISA e quimioluminescência..... 54

Quadro 03	Resumo das premissas para aplicação do modelo de MMQO.....	59
Gráfico 05	Distribuição das Metodologias dos <i>kits</i> para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014 Distribuição das Metodologias dos <i>kits</i> para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	61
Gráfico 06	Distribuição dos Fabricantes dos <i>kits</i> , no período 2009-2014.....	62
Gráfico 07	Avaliação das instruções de uso dos 15 <i>kits</i> selecionados quanto aos 21 itens relacionados pela RDC nº 206/2006.....	65
Gráfico 08	Percentual de atendimento de cada item estabelecido pelo RDC 206 pelos 15 <i>kits</i> .....	66
Quadro 04	Pares de <i>kits</i> com resultados satisfatórios na análise de MMQO.....	70
Gráfico 09	Média dos resíduos - <i>kit</i> 04 x <i>kit</i> 05.....	77
Gráfico 10	Normalidade dos resíduos – <i>kit</i> 04 x <i>kit</i> 05.....	78
Gráfico 11	Homocedasticidade das variâncias dos resíduos - <i>kit</i> 04 x <i>kit</i> 05 .....	78
Gráfico 12	Valores discrepantes (out liers) - <i>kit</i> 04 x <i>kit</i> 05.....	79
Gráfico 13	Média dos resíduos - <i>kit</i> 11 x <i>kit</i> 12.....	79
Gráfico 14	Normalidade dos resíduos - <i>kit</i> 11x <i>kit</i> 12.....	80
Gráfico 15	Homocedasticidade das varências dos resíduos - <i>kit</i> 11 x <i>kit</i> 12.....	80
Gráfico 16	Valores discrepantes (out liers) - <i>kit</i> 11 x <i>kit</i> 12.....	81
Gráfico 17	Regressão de Deming - <i>kit</i> 04 x <i>kit</i> 05.....	82
Gráfico 18	Ampliação da área marcada no gráfico 17.....	82
Gráfico 19	Regressão de Deming - <i>kit</i> 11 x <i>kit</i> 12.....	83
Gráfico 20	Ampliação da área marcada no gráfico 19.....	84
Quadro 05	Amostras verdadeiro positivas para HCV comutáveis.....	84

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 Registro dos dados analíticos sumarizados (análise prévia) dos kits para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	60
Tabela 2 Distribuição quanto à matriz biológica dos <i>kits</i> para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	62
Tabela 3 Distribuição do tipo de detecção dos <i>kits</i> para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	63
Tabela 4 Distribuição quanto à sensibilização da fase sólida dos <i>kits</i> para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	63
Tabela 5 Análise dos atributos das instruções de uso de 12 <i>kits</i> do ensaio ELISA e 03 do ensaio quimioluminescência para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.....	64
Tabela 6 Modelo da tabela usada para registrar os resultados das amostras dos <i>kits</i> selecionados.....	67
Tabela 7 Valores de razão DO/CO obtidos nas 44 amostras testadas nos <i>kits</i> das metodologias ELISA ( <i>kits</i> 1-12) e quimioluminescência ( <i>kits</i> 13-15)	68
Tabela 8 Valores de $p$ ( $\alpha > 0,025$ ) para avaliação de significância dos coeficientes lineares aplicados aos pares de <i>kits</i> ELISA e ChLIA.....	70
Tabela 9 Valores de $p$ ( $\alpha < 0,025$ ) para avaliação de significância dos coeficientes angulares aplicados aos pares de <i>kits</i> ELISA e ChLIA .....	71
Tabela10 Valores de $p$ ( $\alpha > 0,025$ ) para avaliação do comportamento normal dos resíduos aplicados aos pares de <i>kits</i> ELISA e ChLIA.....	72
Tabela11 Valores obtidos das médias dos resíduos para as curvas relacionadas a avaliação dos pares de <i>kits</i> ELISA e ChLIA.....	73
Tabela12 Valores de $p$ ( $\alpha < 0,025$ ) obtidos da avaliação da homocedasticidade dos resíduos para as curvas relacionadas aos pares de <i>kits</i> ELISA e ChLIA.....	74

Tabela13	Valores de $\rho$ ( $\alpha > 0,025$ ) obtidos da avaliação da autocorrelação dos resíduos para as curvas relacionadas avaliação dos pares de kits ELISA e ChLIA .....	75
Tabela14	Valores de $\rho$ ( $\alpha < 0,025$ ) obtidos da avaliação da significância da correlação para as curvas relacionadas aos pares de kits ELISA e ChLIA .....	76
Tabela15	Valores encontrados na análise dos pares de <i>kits</i> selecionados pelo MMQO.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	<i>Antibody</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFSSAPS	<i>Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé</i>
Ag/Ac	<i>Antigen/Anticorpo</i>
ALT/TGP	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitaria
CBER	<i>Center for Biologics Evaluation and Research</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
ChLIA	<i>ChemiLuminescence ImmunoAssay (Quimioluminescência)</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO	<i>Cut Off</i>
DI	Departamento de Imunologia
DO	Densidade Ótica
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EC	<i>European Community</i>
EIA	<i>Enzyme Immuno Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEVIT	Gerência de Produtos Diagnóstico para uso In Vitro da ANVISA
GGTPS	Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde da ANVISA
HBcAG	<i>Hepatitis B core Antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface Antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)
HCV	Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HTLV	<i>Human T Lymphotropic Virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IEC	<i>International Eletrotechnical Comission</i>

IFCC	<i>International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JCTLM	<i>Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine</i>
LA	Laudo de Análise
LSH	Laboratório de Sangue e Hemoderivados
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Ministério da Saúde
NAT	<i>Nucleic Acid Test</i>
NCR	<i>Non Codified Region</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NS	<i>Non Structural</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada da ANVISA
REMCO	<i>Committee on Reference Material</i>
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SH	Serviços de Hemoterapia
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SVS	Secretaria Vigilância em Saúde
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA.....	21
1.2 COMUTATIVIDADE DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA.....	22
1.3 COMUTATIVIDADE E SUA IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
1.3.1 Iniciativas Internacionais para Harmonização dos Resultados de Medição.....	24
1.3.2 <i>Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI</i> .....	26
1.3.3 Iniciativas no Brasil.....	27
1.4 HEPATITE C.....	27
1.4.1 O Vírus da Hepatite C (HCV).....	29
1.4.2 Apresentação Clínica e Laboratorial.....	31
1.4.3 Epidemiologia da Hepatite C.....	31
1.4.4 Transmissão e Fatores de Risco.....	35
1.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HEPATITE C.....	36
1.5.1 Testes de Triagem.....	36
1.5.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	37
1.5.1.2 Ensaio de Quimioluminescência.....	40
1.5.1.3 Ensaio Imunocromatográfico.....	40
1.5.1.4 Testes moleculares.....	41
1.5.2 Teste confirmatório.....	41

1.5.2.1 Ensaio <i>Immunoblot</i> .....	41
1.6 CARACTERÍSTICAS DOS TESTES SOROLÓGICOS.....	42
1.7 INSTRUÇÕES DE USO.....	43
1.8 LABORATÓRIO DE SANGUE E HEMODERIVADOS.....	44
1.8.1 Painel sorológico positivo para HCV.....	45
1.8.1.1 As amostras de plasma.....	45
1.8.1.2 Recebimento, cadastro e identificação das amostras de plasma.....	47
1.8.1.3 Processamento das amostras de plasma.....	48
1.8.4 Caracterização das amostras de plasma.....	49
1.9 REGRESSÃO DE DEMING.....	50
1.10 SOFTWARE “R”.....	50
1.11 JUSTIFICATIVA.....	51
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	52
2.1 OBJETIVO GERAL.....	52
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	52
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	53
3.1 BUSCA ATIVA DE DADOS – PERÍODO 2009-2014.....	53
3.2 AVALIAÇÃO DAS INSTRUÇÃO DE USO DOS KITS.....	54
3.2.1 Análise das Informações contidas nas Instruções de Uso.....	55
3.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DE FORMA RETROSPECTIVA.....	56
3.3.1 Construção dos critérios para seleção dos <i>kits</i> .....	56
3.3.2 Avaliação prévia segundo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).....	57

3.3.3	Significância da correlação entre as variáveis (x;y).....	58
3.3.4	Regressão Linear de Deming.....	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
4.1	DA BUSCA ATIVA RETROSPECTIVA DOS DADOS.....	60
4.2	DOS AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DOS DADOS OBTIDOS.....	60
4.2.1	Da pesquisa preliminar dos dados registrados.....	60
4.2.2	Da análise dos dados obtidos frente aos critérios de aceitação adotados..	62
4.2.3	Da Análise das Instruções de Uso.....	63
4.2.4	Do Painel Positivo para HCV.....	67
4.2.5	Da Análise estatística dos dados.....	67
4.2.5.1	Testes de hipótese aplicados.....	69
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO A - REGISTRO DOS RESULTADOS CORRESPONDENTES ÀS 130 AMOSTRAS.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

Qualidade, palavra que deriva do latim *qualitas* possui um conceito altamente subjetivo, ligado diretamente à percepção individual, influenciado por fatores culturais, modelos mentais e necessidades e expectativas pessoais (ROTH, 2011).

Segundo Feigenbaum (1994), alguns especialistas abordam a qualidade como uma atividade do departamento de qualidade, ao invés de uma política de incentivo à cultura da excelência em toda a organização, possibilitando maior relacionamento entre as ações de melhoria e a estratégia de negócios, de modo a atingir bons resultados.

De acordo com Crosby (1994), a qualidade é um fator atingível, mensurável, lucrativo, que pode ser estabelecido, desde que haja compromisso, compreensão e que todos estejam dispostos a trabalhar. Para tanto, defendeu, ainda, que a qualidade seja conforme as especificações que o sistema de gestão deve satisfazer.

A *International Organization for Standardization* (ISO), define qualidade como: “O grau no qual um conjunto de características inerentes satisfaz aos requisitos, ou seja, às necessidades ou expectativas que são expressas, geralmente, de forma implícita ou obrigatória” (ABNT, 2000).

Para que a qualidade seja mensurável, conforme apresentado por Pires (2007, *apud* RODRIGUES, 2013), esta terá que ser definida e medida para o estabelecimento de critérios, tanto no nível da concepção e desenvolvimento, caso ocorra, quanto no nível da realização, na qual a qualidade corresponde ao cumprimento dos requisitos do produto que devem satisfazer os requisitos do cliente. A Figura 1 resume o descrito acima.

Figura 1- Estratégia da Qualidade



Fonte: QUIS, 2012.

Um dos precursores do movimento de qualidade no mundo, Deming questiona: *"Como sabemos se estamos constantemente melhorando - tornando-nos a organização do futuro?"* Pode-se afirmar que o uso de um Sistema de Medição de Desempenho é a resposta adequada. Medir é importante, porém, se não é possível medir, não se pode controlar; se não há como controlar, não há como gerenciar; se não há como gerenciar, não há como melhorar (SINK; TUTTLE, 1993).

Para medir, há necessidade da utilização de ferramentas de medição, padrões e/ou materiais de referência (MR) (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

Um MR é normalmente usado para determinar ou verificar a rastreabilidade de um procedimento de medida para um valor atribuído ao material, que representa a melhor estimativa de valor correta ou verdadeira (MILLER; MYERS; REJ, 2006).

Fornecedores de MR e materiais destinados a calibração de procedimentos de medida de rotina devem incluir validação da comutatividade como um requisito essencial. Quando o MR se destina a avaliação de um procedimento clínico de rotina, a comutatividade deve ser validada entre todas as metodologias analíticas que utilizarão este material, incluindo procedimentos de medida de referência (MILLER; MYERS; REJ, 2006).

O termo comutatividade foi utilizado pela primeira vez para descrever a capacidade de um MR ou controle ter propriedades interensaió comparáveis às propriedades demonstradas por amostras clínicas autênticas quando medido por mais de um método analítico (MILLER, 2003; ABNT ISO GUIA 34, 2012).

As Boas Práticas de Laboratório requerem que MRs usados em procedimentos de medida de rotina sejam fornecidos com informações de comutatividade incluídos no certificado de análise do produto (MILLER et al, 2014).

Neste sentido, este trabalho visa demonstrar a comutatividade entre as amostras de plasma ou soro que compõem um Painel Sorológico Positivo para Hepatite C (HCV) utilizado no controle de qualidade dos conjuntos diagnósticos de uso *in vitro* (kits), empregados no diagnóstico sorológico do HCV, nas suas diferentes metodologias.

## 1.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Material de Referência (MR) é definido como material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades específicas (quantitativas ou qualitativas), estabelecido como adequado para utilização em um procedimento de medida (VESPER; MILLER; MYERS, 2007; ABNT ISO GUIA 34, 2012).

MR é um termo genérico utilizado para todos os materiais empregados na avaliação da precisão de um método e o seu uso pode incluir a calibração e verificação de equiparação de sistemas analíticos de medidas, a atribuição de valores a outros materiais e o controle da qualidade (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

O termo abrange ainda, Material de Referência Certificado (MRC), caracterizado por um procedimento validado metrologicamente e acompanhado de um certificado, com grau de incerteza estabelecido e rastreabilidade metrológica, podendo ser empregados para calibração ou avaliação da exatidão, de acordo com ISO GUIA 34 de 2012 (ABNT, 2012).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), por meio dos seus Comitês e Comissões, é o órgão responsável pelas Normas Brasileiras. O ISO GUIA 34 (ABNT), elaborado pela Comissão de Estudo Especial de Materiais de Referência e aprovado em 2012, apresenta conteúdo técnico, estrutura e redação idênticos ao *ISO GUIDE 34:2009*, publicado pela *International Organization for Standardization /Reference Materials Committee (ISO/REMCO)*.

A partir de sua publicação em 2009, o *ISO GUIDE 34* tem sido efetivamente usado como referência pelos órgãos acreditadores, embora tenha sido elaborado com

a finalidade de prover assistência técnica, não mandatória, para usuários e produtores de MR. Recentemente, a exemplo de outros guias, discute-se a possibilidade de converter o *ISO GUIDE 34* em norma padrão para ISO - ISO/IEC 17034, que será adotado como mandatório (JENKS; HAMMOND, 2014), o que poderá causar grande impacto nos meios produtivo e analítico de MR (JENKS; NICHOLS, 2015).

O Guia abrange a produção de MR e MRC e preconiza requisitos menos rígidos para um MR. Os requisitos mínimos para a produção de um MR e MRC inclui a avaliação da homogeneidade, estabilidade e da comutatividade desses materiais, com a finalidade de estabelecer a adequação para o uso proposto (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

## 1.2 COMUTATIVIDADE DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA

O termo comutatividade foi definido pela primeira vez para ensaios enzimáticos por Fasce e colaboradores (1973) e Rej e colaboradores (1984 *apud* CAROBENE; GUERRA; CERIOTTI, 2013) como a capacidade de um MR apresentar propriedades inter-ensaios comparáveis às propriedades demonstradas por amostras clínicas autênticas quando medidas por mais de um método analítico.

O *ISO GUIDE 34* define comutatividade como a propriedade de um MR, demonstrada pela proximidade de concordância entre a relação, por um lado, dos resultados de medição para uma quantidade determinada neste material, obtida de acordo com dois, ou mais, procedimentos de medição e, por outro lado, a relação obtida entre os resultados de medição por outros materiais especificados (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

Autores como Miller e colaboradores (2011), definem comutatividade como a propriedade que um MR apresenta quando os valores medidos para o mesmo e para um painel de amostras clínicas representativas têm a mesma relação entre dois, ou mais, procedimentos de medição para o mesmo mensurando (MILLER; MYERS; REJ, 2006).

Outros documentos de metrologia expandiram os conceitos de comutatividade descrevendo-o como a equivalência das relações matemáticas entre os resultados obtidos de diferentes procedimentos de medidas para um MR e de amostras

representativas de indivíduos saudáveis e doentes para um determinado analito (VESPER; MILLER; MYERS, 2007).

Para demonstrar a comutatividade, utiliza-se normalmente um procedimento de medição de “ordem superior”, além de um ou mais procedimentos de “ordem inferior” na hierarquia metrológica. Quando não existir um método de referência, a comutatividade será avaliada comparando a relação entre os resultados obtidos nos MR/MRC e nas amostras de rotina empregando-se procedimentos de medição a serem harmonizados (ABNT ISO GUIA 34, 2012; OLIVEIRA et al, 2013).

Os procedimentos para os quais um MR se mostra comutável requerem especificação da medição e a comutatividade do MR e pode ser demonstrada em relação a alguns procedimentos e não em outros. Isso não implica que um MR comutável com todos os métodos investigados não seja comutável com os demais (OLIVEIRA et al, 2013).

Inicialmente, a determinação da comutatividade de MR foi estabelecida na química clínica, onde uma série de procedimentos de medição é utilizada nos ensaios clínicos de rotina de mensurandos específicos em amostras de pacientes (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

O exemplo mais conhecido do impacto da comutatividade e de sua importância foi a padronização das medidas de colesterol, cujos esforços iniciais datam da década de 60, época em que havia uma falta de comparabilidade de resultados, nos resultados clínicos e epidemiológicos (OLIVEIRA; MENDES, 2010).

O ISO Guia 34 (ABNT, 2012) estabelece, ainda, que um MR é dito comutável quando são observadas razões matemáticas equivalentes para os resultados de um determinado mensurando obtidos, a partir da aplicação de diferentes procedimentos de medição, tanto para o MR quanto para o conjunto de amostras de ensaio de rotina contendo o mensurando.

Podemos, também, classificar um MR como comutável, se o comportamento do analito alvo para um determinado procedimento de medida for equivalente no MR e nas amostras de ensaio de rotina, ou seja, MR e amostra teste produzindo a mesma resposta (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

Muitas definições de comutatividade foram descritas em variados guias e normas. No entanto, todos os documentos estão de acordo quanto aos princípios básicos do conceito e no processo para estabelecimento da comutatividade, diferindo

na descrição e natureza dos materiais utilizados e na descrição de como a relação entre os procedimentos de medição é estabelecida (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

Nomenclaturas para comutatividade, comutabilidade, equivalência de sistemas analíticos, parecem não estar normalizadas, podendo ser utilizadas de forma indistinta (MALUF; SILVA; VIDIGAL, 2011). Neste trabalho, em conformidade com o ABNT ISO GUIA 34:2012, usaremos o termo comutatividade.

### 1.3 COMUTATIVIDADE E SUA IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Materiais de Referência (MRs) comutáveis são requisitos importantes para assegurar resultados de laboratório confiáveis, e conseqüentemente, tratamentos mais apropriados ao paciente (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2010).

A necessidade do estabelecimento da comutatividade de MR não está limitada a química clínica. Tal procedimento é desejável em qualquer campo em que o uso de procedimentos de medição de rotina seja baseado em princípios físicos ou químicos diferentes, em comparação ao método de referência utilizado (ABNT ISO GUIA 34, 2012).

Apesar da importância e o impacto da comutatividade na padronização dos resultados dos diagnósticos laboratoriais serem reconhecidos por mais de quatro décadas, como uma propriedade essencial para MRs usados como calibradores na cadeia de rastreabilidade, até recentemente este fato não era reconhecido pela associação dos laboratórios clínicos (MADEJ et al, 2010; MILLER et al, 2014).

Como Zegers e colaboradores (2013) demonstraram, a comutatividade de MR é um requisito essencial para comparação dos resultados das amostras dos pacientes.

#### 1.3.1 Iniciativas Internacionais para Harmonização dos Resultados de Medição

A *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), organização internacional comprometida com a harmonização entre os laboratórios clínicos, tem patrocinado vários comitês e grupos de trabalho para o

desenvolvimento de procedimentos e MR de importância em laboratórios clínicos (MILLER et al, 2014).

Em 1998, a União Europeia publicou a Diretiva 98/79/*European Community* (EC) que dispõe sobre os procedimentos de medida para produtos de diagnóstico *in vitro*, para calibração rastreável em sistemas de maior ordem (DIRECTIVE 98/79/EC, 1998).

Em resposta a Diretiva 98/97, em 2002, o IFCC, o *International Committee of Weights and Measures* (ICWM) e o *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) se juntaram para formar o *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine* (JCTLM)<sup>1</sup> - Comitê de Rastreabilidade em Laboratórios Clínicos. A partir de 2002, o JCTLM mantém lista de procedimentos de medida, incluindo laboratórios, e de MR, revisados em conformidade com os padrões ISO (MILLER et al, 2014).

Uma revisão realizada pelo JCTLM em 2006, na lista de MR aprovados, revelou que poucos haviam sido validados quanto à comutatividade contra amostras clínicas de pacientes (MADEJ et al, 2010).

O JCTLM, também, atualizou o seu Manual de Qualidade em 2011, incluindo informação sobre a comutatividade para novos MR, candidatos para uso como calibradores em procedimentos de medida, em laboratórios clínicos (JCTLM, 2015).

Outras iniciativas de grande importância na consolidação da avaliação da comutatividade são realizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que elaborou e disponibiliza em seu site, guias voltados para desenvolvedores e produtores de *kits*, profissionais de laboratórios clínicos, reguladores, entre outros. Os mais recentes são EP30-A (*Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine*) e EP14-A3 (*Evaluation of Commutability of Processed Samples*), elaborados com o propósito, respectivamente, de caracterizar e qualificar MRs comutáveis para laboratórios clínicos e avaliar a comutatividade de amostras processadas (CLSI, 2010; CLSI, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) fornece MRs identificados como *International Standard / Reference Reagents* que são usados como calibradores em procedimentos de medidas nas áreas de segurança transfusional, doenças

---

<sup>1</sup> *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine* é um comitê formado por representantes dos laboratórios clínicos, agências governamentais e fabricantes, com a finalidade de promover comparabilidade internacional, confiabilidade e equivalência nos resultados entre laboratórios clínicos, visando à melhoria da atenção à saúde (ARMBRUSTER; MILLER, 2007).

infeciosas e endocrinologia. Historicamente, a OMS não validou esses MRs para comutatividade e por essa razão, alguns relatórios demonstraram que a rastreabilidade para esses materiais não alcançou harmonização (MILLER; MYERS, 2013).

Com apoio de centros colaboradores como *National Institute for Biological Standard and Control* (NIBSC), *Paul Ehrlich Institute* (PEI) e *Center for Biologicals Evaluation and Research* (CBER/FDA), por meio do *Expert Committee on Biological Standardization*, a OMS vem realizando reuniões desde 2004, com pesquisadores, fabricantes de *kits* e autoridades sanitárias, para discutir e estabelecer agenda positiva para esta questão (OMS, 2012). Além disso, apoia a realização de estudos colaborativos para calibração e avaliação da comutatividade de seus padrões biológicos, incluindo os utilizados na avaliação de *kits*, como os do vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatites B, C, D e E (OMS, 2014a).

Em 2013, a OMS convocou uma conferência para discutir principais requisitos para avaliação da comutatividade e determinar a necessidade de sua aplicação para futuros MRs (MILLER et al, 2014). Encontra-se em fase de elaboração o *World Health Organization (WHO) - Technical Document on Commutability*, com apoio do Paul Erlich Institute, para o desenvolvimento de padrões internacionais para uso em diagnóstico *in vitro* de vários ensaios (OMS, 2014b).

### 1.3.2 *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI

Organização não governamental, que estabelece padrões de qualidade, com aplicação global, nos testes realizados em laboratórios clínicos, com desenvolvimento e implementação de padrões e guias que ajudam os laboratórios a cumprirem suas responsabilidades com eficiência e eficácia (CLSI, 2014).

Um dos guias desenvolvidos pelo CLSI é o *Evaluation of Commutability of Processed Samples; Approved Guideline - Third Edition* (EP14-A3), para atender fabricantes de reagentes para diagnóstico *in vitro*, agências regulatórias, laboratórios clínicos, entre outros. Este guia orienta os usuários a determinar quando a não comutatividade é a fonte de resultados não esperados, observados algumas vezes com amostras processadas, quando são comparados dois procedimentos

quantitativos de medida. Amostras processadas que apresentam desempenho semelhante ao das amostras dos pacientes são ditas comutáveis (CLSI, 2014).

Para análise dos dados obtidos nos procedimentos de medidas é usado o modelo de regressão linear simples ou dos mínimos quadrados ordinários (MQO) e o modelo de regressão de Deming (CLSI, 2014).

### 1.3.3 Iniciativas no Brasil

Melhorias no processo de gestão da qualidade em laboratórios clínicos inclui a avaliação da comutatividade, considerada de extrema importância para a harmonização de dados entre laboratórios, visando garantir a comparabilidade de resultados de exames realizados em diferentes sistemas. Entretanto, poucos laboratórios no Brasil realizam a avaliação da comutatividade dos MRs usados na obtenção de resultados de exames. Esse processo pode causar grande impacto no tratamento de pacientes ou ainda no diagnóstico sorológico de doenças, evitando um viés nos ensaios (MALUF; SILVA; VIDIGAL, 2011).

A propriedade da comutatividade é preconizada também para a avaliação externa da qualidade (MILLER; MYERS; REJ, 2006), que é uma avaliação interlaboratorial realizada por meio de testes de proficiência, com objetivo maior de contribuir para a garantia dos resultados dos testes sorológicos obtidos nos laboratórios e nos Serviços de Hemoterapia (SH) do País, aumentando assim, a segurança transfusional (BRASIL, 2014).

## 1.4 HEPATITE C

As primeiras descrições das hepatites virais foram feitas ainda na Grécia antiga, contudo a descoberta do antígeno Austrália<sup>2</sup>, em 1965, deu início a uma era de grandes avanços no conhecimento dos agentes etiológicos destas patologias.

Foram caracterizados os antígenos virais de superfície (HBsAg) e do núcleo (HBc) do vírus da hepatite B (HBV) e seus respectivos anticorpos específicos (anti-HBs e anti-HBc). Porém, um grande número de casos clínicos que hoje sabemos,

---

<sup>2</sup> Antígeno Austrália, também, conhecido como superfície do vírus da hepatite B (HBsAg).

poderiam ter sido causados pelo vírus da hepatite C (HCV), devido à baixa sensibilidade dos métodos, então existentes, para detecção do HBV foram classificados como hepatites não A e não B (NANB), por simples exclusão (GADELHA, 2002). Portanto, mesmo depois da descoberta do HBV ainda foram encontrados muitos casos de hepatites em transfusões, o que sugeria a existência de outros agentes causadores e que eram transmitidos pela via parenteral (GONÇALES, 1997).

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo HCV e afeta sobretudo o fígado. O vírus pode causar tanto a infecção aguda como a crônica, variando de leve até grave, que normalmente só se manifesta após vários anos. A infecção é muitas vezes assintomática, porém a infecção crônica pode levar à fibrose do fígado e finalmente, a cirrose, à insuficiência hepática ou complicações que representam risco de vida (RYAN; RAY, 2004).

Desde a descoberta da hepatite C por Michael Houghton e colaboradores (1989), a doença passou a ter grande relevância entre as principais causas de doenças hepáticas crônicas. Após a decodificação do genoma do HCV por Choo e colaboradores (1989), iniciou-se a busca por métodos laboratoriais capazes de auxiliar no diagnóstico da infecção, sendo os primeiros *kits* para o diagnóstico do HCV disponibilizados em 1990 (BRANDÃO et al, 2001).

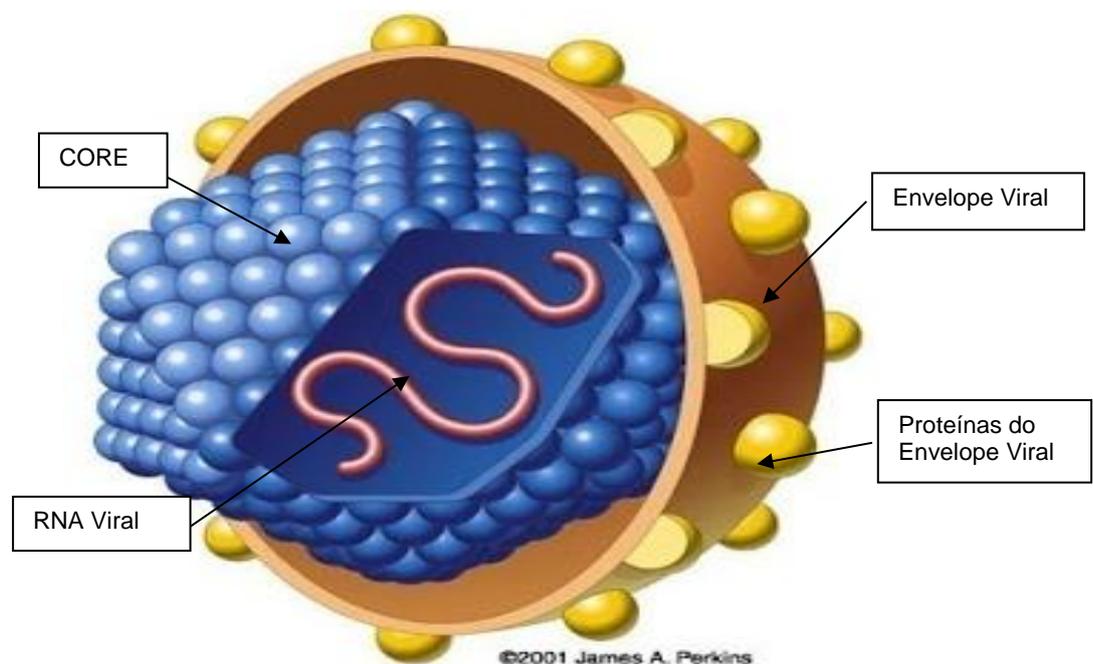
A promulgação da Portaria Nº 1376 de 19 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde, tornou obrigatória a realização do teste para detecção de anticorpos anti-HCV na triagem sorológica dos doadores de sangue nos Serviços de Hemoterapia (SH) do país, proporcionando maior segurança às transfusões sanguíneas até os dias atuais (BRASIL, 1993).

Atualmente, a triagem sorológica do HCV nos SH está regulamentada por 02 dispositivos legais: a Portaria Nº 2.712/2013 do Ministério da Saúde, que redefine o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos (BRASIL, 2013) e a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – RDC Nº 34/2014 (BRASIL, 2014). Estes dispositivos regulamentares têm o objetivo de estabelecer os requisitos de boas práticas a serem cumpridas pelos SH e torna obrigatória a realização de dois testes em paralelo: um para detecção de anticorpos anti-HCV ou para detecção combinada de antígeno/anticorpo e outro para detecção de ácido nucléico do vírus HCV, por técnica de biologia molecular (BRASIL, 2014).

### 1.4.1 O vírus da hepatite C - HCV

O HCV foi o primeiro vírus descoberto por meio de clonagem molecular, sem uso direto de métodos biológicos ou biofísicos, por extração, replicação em cDNA e clonagem dos ácidos nucleicos plasmáticos de um chimpanzé, infectado com fator XIII contaminado com o vírus da hepatite não-A e não-B (ZEIN, 2000). O HCV é pertencente à família *Flaviviridae* com homologia à família *Pestiviridae* (MILLER; PURCELL, 1990; SETO, 2010). Atualmente foi classificado como um gênero distinto dentro da família, chamado de *Hepacivirus*, de acordo com a *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2014). A partícula viral apresenta uma cadeia única de RNA com polaridade positiva com um genoma de aproximadamente 9.600 nucleotídeos, um capsídeo de simetria icosaédrica (core) e um envelope lipídico, conforme demonstrado na Figura 2 (CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2007).

Figura 2- O vírus da hepatite C

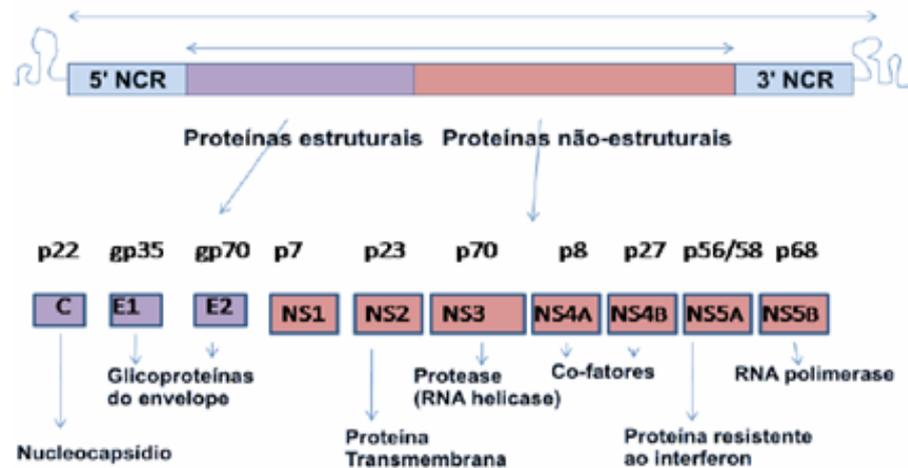


Fonte: Adaptado de SECKO, 2006

O genoma viral apresenta duas regiões não traduzidas (*UTR-untranslated region*) nas extremidades 5' e 3', flanqueada por uma única fase aberta de leitura (*ORF- open reading frame*) cuja região codificante traduz uma poliproteína precursora

de aproximadamente 3.000 aminoácidos. Antes e após a tradução, esta poliproteína é clivada, por proteases virais e celulares, em proteínas estruturais (core, E1, E2) e as não estruturais ou NS (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), de grande importância diagnóstica (ZEIN, 2000), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Organização do genoma do vírus da hepatite C e principais proteínas com importância diagnóstica.



Fonte: SILVA, 2008

As proteínas estruturais estão localizadas na porção amino-terminal 5', sendo a proteína do core a principal constituinte do nucleocapsídeo. As proteínas E1 e E2, altamente glicosiladas, são formadoras do envelope e responsáveis pela entrada da partícula viral no hepatócito (DUBUISSON, 2007). Entretanto, a NS1 localizada no término da E2, é um polipeptídeo altamente hidrofóbico de função desconhecida, mas estudos recentes sugerem que a p7 é importante para montagem e liberação eficientes de virions (STEINMANN et al, 2007). As proteínas não estruturais como o termo indicam, não são constituintes da partícula viral, porém são importantes na replicação do RNA viral (BARTENSCHAGER; LOHMANN, 2000).

Por ser constituído de RNA, o HCV apresenta uma grande variabilidade genética. A taxa de mutação foi estimada em  $1,9 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos por sítio por ano (LYRA; FAN; DI BISCEGLIE, 2004; MAGIORKINIS et al, 2009). As frequentes mutações do HCV e os numerosos subtipos virais são alguns dos obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (BUKH; MILLER; PURCELL, 1995).

#### 1.4.2 Apresentação Clínica e Laboratorial

De modo geral, a hepatite C aguda apresenta evolução subclínica em cerca de 80% dos casos, que têm apresentação assintomática e anictérica (não apresenta tom amarelado na pele), dificultando o diagnóstico. Aproximadamente 20 a 30% dos casos podem apresentar icterícia e 10 a 20% apresentam sintomas inespecíficos, como anorexia, astenia, mal-estar e dor abdominal. Quando presente, o quadro clínico é semelhante àquele decorrente de outros agentes que causam hepatites virais e o diagnóstico diferencial somente é possível com a realização de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos (BRASIL, 2011).

Sintomas de infecção aguda podem ter início cerca de 6 a 12 semanas após a exposição ao HCV. Em apenas 20% dos pacientes sintomáticos o início dos sintomas precede a soroconversão, a qual raramente ocorre em período superior a 6 meses. Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT/TGP) começam a aumentar entre 2 e 8 semanas após a exposição, resultando em necrose do hepatócito (BRASIL, 2011).

Após a exposição ao HCV, o antígeno viral (RNA-HCV) poderá ser identificado no soro antes da presença dos anticorpos anti-HCV. A presença do RNA-HCV pode ocorrer cerca de 2 semanas após a exposição (BRASIL, 2011). O nível do RNA-HCV aumenta rapidamente durante as primeiras semanas, atingindo seus níveis máximos entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>7</sup> UI/mL, imediatamente antes do pico dos níveis séricos de ALT/TGP, coincidindo com o início dos sintomas, exceto nos assintomáticos (VILLANO et al., 1999). Na hepatite C aguda autolimitada, que ocorre em 15 a 25% dos casos, os sintomas podem persistir durante semanas e diminuem com o declínio da ALT/TGP e dos níveis de RNA-HCV, não sendo mais detectados 6 meses após o início da infecção (BRASIL, 2011).

#### 1.4.3 Epidemiologia da hepatite C

Desde a descoberta da hepatite C, em 1989, esta passou a ter especial relevância entre as principais causas de doenças hepáticas crônicas (CHUAN-MO LEE et al, 2008).

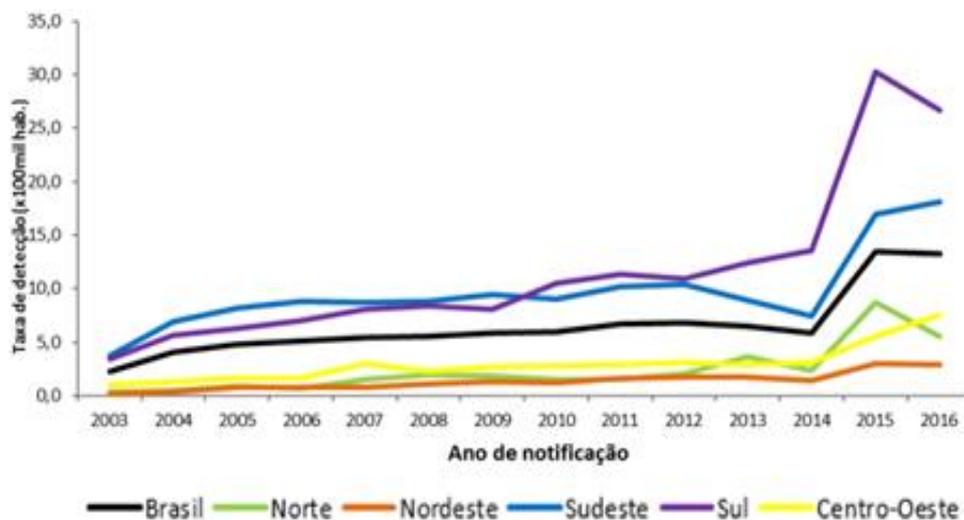
Estima-se que cerca de 3% da população mundial esteja infectada pelo vírus da hepatite C, e que entre 60% e 70% das pessoas infectadas desenvolverão doença hepática crônica, necessitando de assistência à saúde especializada e de alta complexidade (BRASIL, 2017).

No Brasil, a estimativa é que existam entre 1,4 e 1,7 milhão de pessoas cronicamente infectadas pelo HCV – número significativamente inferior aos da Organização Mundial da Saúde (LAVANCHY, 2009; LAVANCHY, 2011). No Brasil, aproximadamente 10 mil casos são notificados a cada ano (BRASIL, 2015a).

De 1999 a 2016, foram notificados 319.751 casos de hepatite C no Brasil. Do total de casos notificados nesse período, 64,1% se concentraram na região Sudeste, 24,5% na região Sul, 5,5% na região Nordeste, 3,3% na região Centro-Oeste e 2,5% na região Norte (BRASIL, 2017).

A taxa de detecção de casos de hepatite C tem apresentado tendência de aumento ao longo dos anos, por regiões do país. De 2002 a 2009, a região Sudeste apresentou a maior taxa e, a partir de 2010, a região Sul passou a liderar o ranking. Em quase toda a série histórica, a região Nordeste apresentou a menor taxa de detecção (BRASIL, 2016). Em 2016, a taxa de detecção da região Sul foi a maior, com de 12,0 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste (9,6), Centro-Oeste (3,9), Nordeste (1,6) e Norte (1,0) (Gráfico 1) (BRASIL, 2017).

Gráfico 1- Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016.



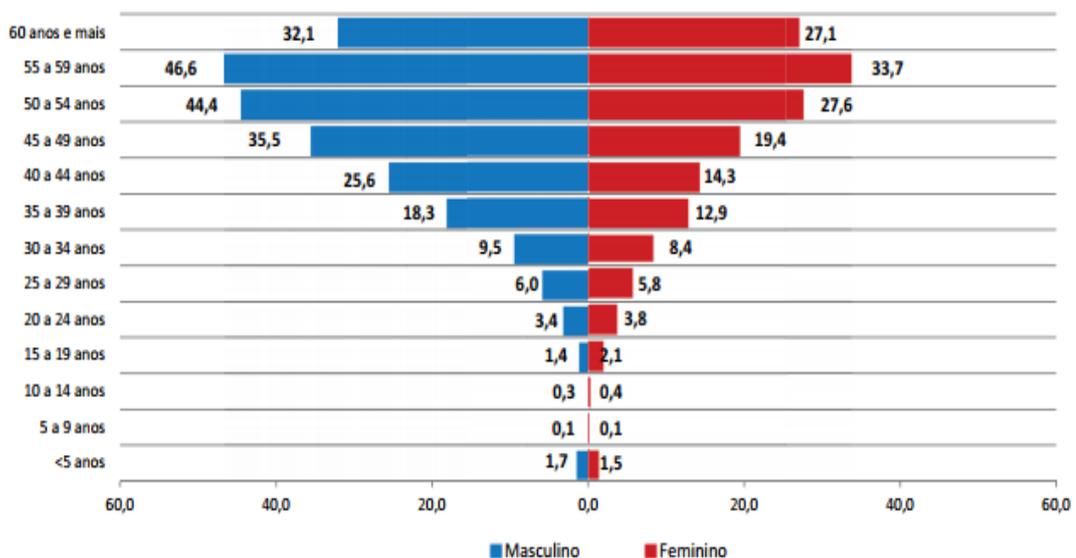
FONTE: Sinan/SVS/MS.

Globalmente, a epidemiologia da hepatite C também enseja maior vulnerabilidade entre indivíduos de determinadas gerações (GALBRAITH et al., 2015). Em recente análise da série histórica brasileira, realizada pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), observou-se que o HCV acomete com maior frequência os indivíduos com mais de 40 anos de idade (AMAKU et al., 2016).

A principal forma clínica dos casos de hepatite C notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) é doença crônica para todas as faixas etárias. Esse grupo representa, aproximadamente, 97% dos casos notificados entre os indivíduos com 15 anos ou mais (BRASIL, 2016).

Entre os casos confirmados de hepatite C, aproximadamente 182.319 casos (58,5%) ocorreram entre homens e 41,5% entre mulheres. Apesar do número de casos entre homens ser superior ao das mulheres, observa-se que essa proporção vem diminuindo ao longo dos anos. A tendência da taxa de detecção segundo sexo mostra aumento em todo o período para ambos os sexos, sendo que a expressiva elevação das taxas e do número de casos no período de 2015 e 2016 se deve à alteração do critério de confirmação de caso de hepatite C a partir do ano de 2015, quando passaram a ser considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentam pelo menos um dos testes anti-HCV ou HCV-RNA reagente (GRÁFICO 2) (BRASIL, 2017).

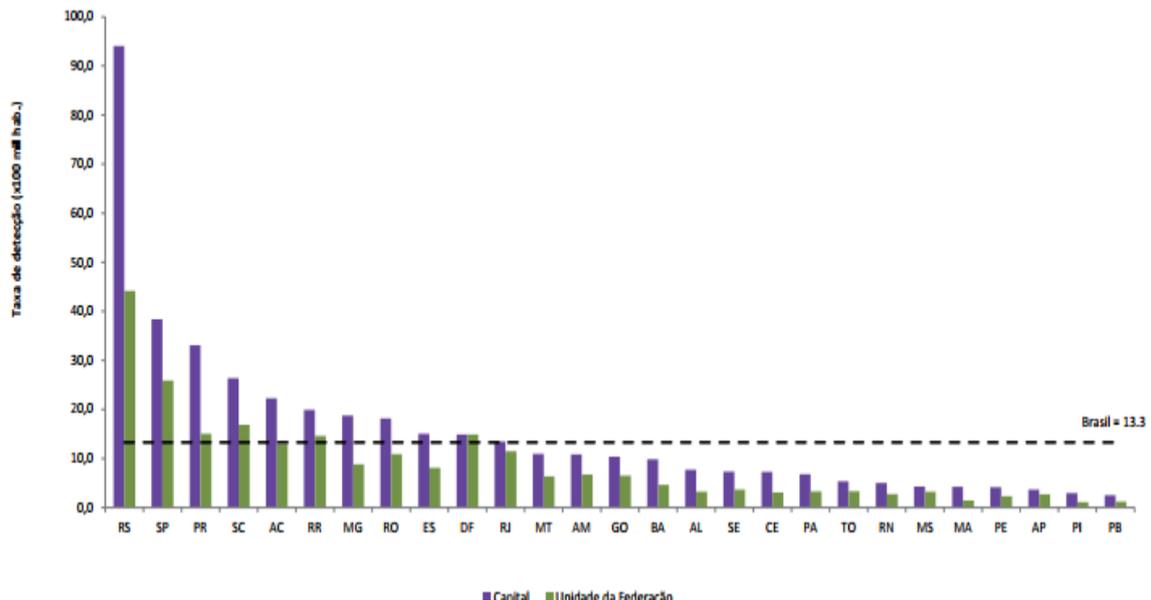
Gráfico 2- Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil,2016



FONTE: Sinan/SVS/MS.

Em 2016, o ranking das capitais com as maiores taxas de detecção de hepatite C apresentou onze capitais com taxas superiores à nacional (13,3 casos por 100 mil habitantes). Destaca-se Porto Alegre-RS (94,1 casos por 100 mil habitantes) com a maior taxa entre as capitais, seguida de São Paulo-SP (38,4), Curitiba-PR (33,1), Florianópolis-SC (26,4), Rio Branco-AC (22,3), Boa Vista-RR (19,9), Belo Horizonte-MG (18,7), Porto Velho-RO (18,2), Vitória-ES (15,0), Brasília-DF (14,9) e Rio de Janeiro-RJ (13,4). A menor taxa entre as capitais foi observada em João Pessoa-PB, com 2,5 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

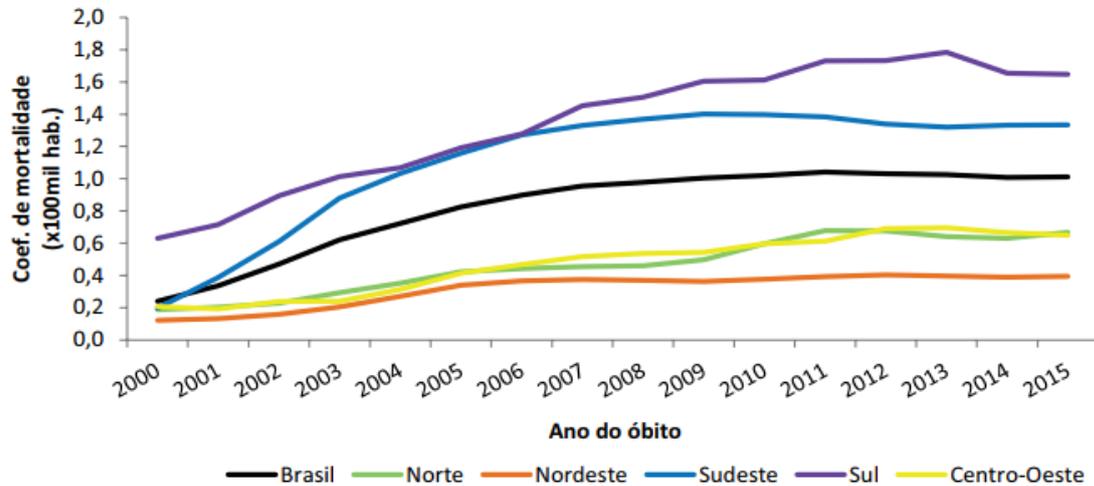
Gráfico 3- Taxa de incidência de casos de hepatite C segundo UF e capital de residência. Brasil, 2016.



FONTE: Sinan/SVS/MS.

Quanto ao coeficiente de mortalidade por hepatite C como causa básica, observou-se uma tendência de estabilização para o Brasil como um todo, a partir de 2007. Em 2015, as regiões Sul (1,5 por 100.000 habitantes) e Sudeste (1,3) apresentaram coeficiente de mortalidade superior à média nacional observada (1,0) (GRAFICO 4) (BRASIL, 2017).

Gráfico 4- Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2000 a 2015.



FONTE: SIM/SVS/MS

O número de óbitos devidos a hepatite C vem aumentando ao longo dos anos em todas as regiões do Brasil. De 2000 a 2015, foram identificados 25.080 óbitos associados à doença; desses, 54,2% tiveram essa infecção como causa básica. Quando analisada a distribuição proporcional entre as regiões brasileiras, 57,0% foram registrados no Sudeste, 23,5% no Sul, 10,7% no Nordeste, 4,7% no Norte e 4,2% no Centro Oeste (BRASIL, 2017).

#### 1.4.4 Transmissão e Fatores de Risco

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue infectado em virtude de exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados e transplantes de doadores infectados. Atualmente, destacam-se como importantes formas de transmissão do HCV, o compartilhamento de equipamentos para uso de drogas, confecção de tatuagens e colocação de *piercing*, além de objetos de uso pessoal, tais como lâminas de barbear ou depilar e instrumentos para pedicure e manicure (BRASIL, 2011).

O HCV é transmitido de forma menos eficiente por exposição de mucosas ou contato com fluidos corporais. A coexistência de alguma doença sexualmente transmissível (DST), incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), constitui relevante facilitador para a transmissão (BRASIL, 2011).

A transmissão vertical do HCV é menos frequente quando comparada à da hepatite B e ocorre em cerca de 5% dos bebês nascidos de mães portadoras do HCV com carga viral elevada. O risco de transmissão é aproximadamente quatro vezes maior em crianças nascidas de mulheres coinfetadas com HCV e HIV (BRASIL, 2011).

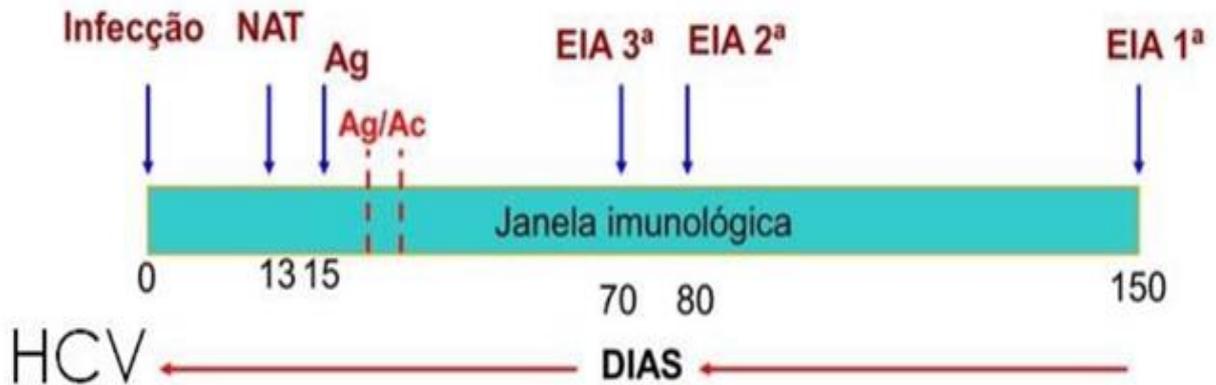
Pesquisa realizada na Penitenciária de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo, apresentou prevalência de HCV de 8,7% entre pessoas do sexo masculino privadas de liberdade, tendo como principais fatores relacionados à infecção, idade acima de 30 anos, história prévia de hepatite, tatuagem e história de uso de drogas injetáveis com compartilhamento de agulhas (COELHO, 2008).

## 1.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HEPATITE C

Em 1990, foram disponibilizados os primeiros kits de diagnóstico de triagem e confirmatório para HCV (BRANDÃO, 2001). No Brasil, foi promulgada a Portaria nº 1376/93-SVS/MS que tornou obrigatório o teste anti-HCV na triagem sorológica dos doadores de sangue nos SH. O diagnóstico da hepatite C é baseado em testes sorológicos e moleculares, empregados na detecção da infecção e no monitoramento da resposta terapêutica (BRASIL, 1993).

Com a evolução tecnológica, antígenos de diferentes regiões do genoma viral foram adicionados na sensibilização, objetivando a melhoria da sensibilidade e especificidade dos kits de diagnóstico de uso *in vitro* e redução da janela imunológica que foi de 150 para 15 dias, quando comparados aos primeiros testes disponibilizados e os testes combinados, respectivamente, conforme mostra a Figura 4 (POZZOBON; BECK; CECCIM, 2011; MARWAHA; SACHDEV, 2014).

Figura 4 – Janela imunológica do HCV com os marcadores utilizados



Fonte: MARWAHA; SACHDEV, 2014. NAT -Nucleic Acid Test (teste do ácido nucleico), Ag (antígeno), Ac (anticorpo), EIA 1ª, 2ª e 3ª geração - Imunoenzimático Assay (ensaio imunoenzimático).

Atualmente, os testes sorológicos para detecção do HCV estão distribuídos de forma empírica em testes de triagem e teste confirmatório (BRASIL, 2011).

### 1.5.1 Testes de Triagem

Compreende as metodologias, ensaios imunoenzimático - ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e quimioluminescência (doravante denominado ChLIA), largamente utilizados na prática clínica e hemoterápica. Também, compreende o teste para detecção de ácido nucleico (NAT), teste imunocromatográfico ou teste rápido.

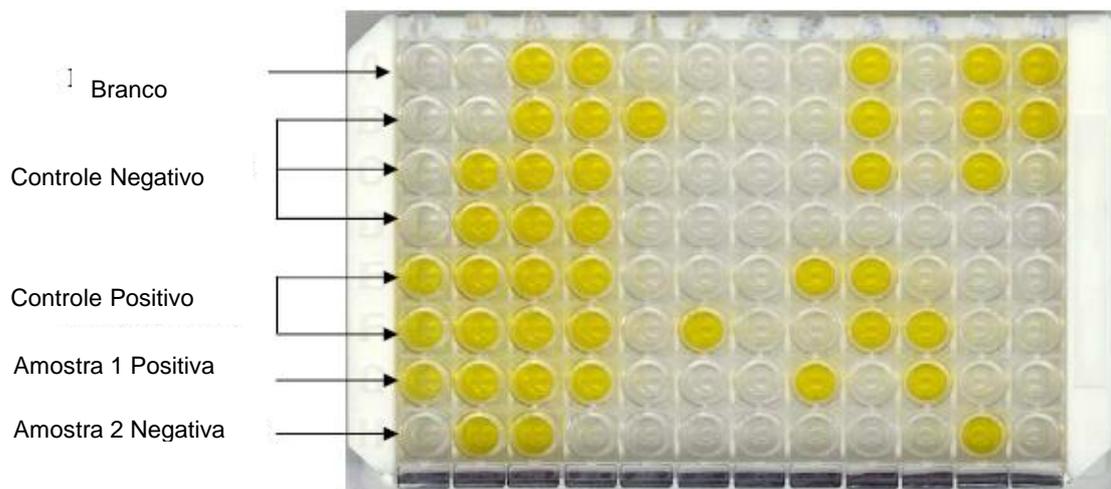
#### 1.5.1.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é a metodologia mais empregada para detecção de antígenos e/ou anticorpos anti-HCV por apresentar vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade, custo relativamente baixo e seu formato é o mais apropriado para a triagem de um grande número de amostras clínicas ou de doadores (Figura 5). Esta técnica emprega antígenos (Ag) e/ou anticorpos (Ac) ligados à fase sólida (sensibilização), que podem ser detectados por um Ac e/ou Ag complementar marcado com uma enzima (peroxidase), capaz de reagir com um substrato cromogênico. A presença de antígenos ou anticorpos pode ser detectada pelo desenvolvimento de um produto final colorido, cuja intensidade, medida pela

densidade ótica (DO), é medida por espectrofotômetro com comprimento de onda indicado pelo fabricante. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à presença de Ag/ Ac na amostra (FERREIRA; ÁVILA, 2001; BORDIN; JUNIOR; COVAS, 2007).

A figura 5 mostra um exemplo de microplaca com resultado para o ELISA. O branco é a ausência de amostra, os controles negativo e positivo são reagentes fornecidos pelos fabricantes, bem como os valores limites de aceitação. As amostras positivas e negativas pertencem aos painéis do laboratório.

Figura 5 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)



Fonte: Adaptado de FIVEPHOTON.COM, 2015.

A busca por testes mais sensíveis e específicos levou a evolução dos testes ELISA, classificados de acordo com antígeno empregado, em 4 diferentes gerações definidas de acordo com a evolução das metodologias, a partir do primeiro ensaio disponível comercialmente, no ano de 1985. São elas:

#### a) Primeira geração

O teste de primeira geração, não mais utilizado na prática clínica, tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3. A baixa sensibilidade do teste indicava que 80% dos pacientes, com evidências clínicas e virológicas de infecção pelo HCV, tinham um resultado positivo. Por outro lado, a taxa de falso-positivos era

de 50 a 70%. Enquanto que doadores de sangue submetidos a teste de maior especificidade, como o RIBA (Immunoblot) ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentaram de 30 a 50% dos resultados positivos (BRANDÃO, 2001).

*b) Segunda geração (ELISA II)*

Surgiu em 1992 nos Estados Unidos, tendo incorporado duas proteínas recombinantes do HCV: c22- 3 (derivada da região estrutural, ou core) e c33-c (derivada da região não estrutural NS3). A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200. Entre as vantagens, aumento da sensibilidade e da especificidade, reduzindo a taxa de falso-positivos, aumento da taxa de detecção e redução de 16 para 10 semanas o tempo médio de soroconversão, ou seja, o tempo transcorrido entre a infecção e o surgimento do anticorpo (BRANDÃO, 2001).

*c) Terceira geração (ELISA III)*

Utilizam antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e foi adicionado um antígeno da região NS5. Entre as vantagens do teste, foi a redução do tempo médio de soroconversão, que passou para 7 a 8 semanas, aumento na sensibilidade para detectar infecção pelo HCV, tanto em doadores de sangue quanto em pacientes. A maior sensibilidade foi atribuída à nova configuração dos antígenos já presentes no ELISA II, e não à presença do antígeno NS5 (BRANDÃO, 2001).

*d) Quarta geração*

Detectam simultaneamente anticorpos e antígenos virais, que aparecem precocemente na fase aguda da doença, diminuindo a janela imunológica em até 65%, se comparados ao ELISA III e, também, reduz o número de resultados indeterminados devido à maior especificidade e alta sensibilidade; detecta o antígeno core do HCV e apresenta como principal vantagem sua realização ser mais simples, ocorrendo em laboratórios não especializados, com diminuição de custos. (POZZOBON; BECK; CECCIM, 2011).

### 1.5.1.2 Ensaio de Quimioluminescência

O ensaio de quimioluminescência (ChLIA) se baseia no mesmo princípio metodológico do ELISA, entretanto a reação química é evidenciada pela ação de um reagente (luminol ou peróxido de hidrogênio) que emite luminescência sem emissão de calor. A reação quimioluminescente final é medida por um detector e o resultado expresso em unidades relativas de luz (RLU), que são diretamente proporcionais à quantidade de anticorpos anti-HCV e/ou antígenos presentes nas amostras de soro ou plasma. O teste automatizado por quimioluminescência vem substituindo o ELISA por sua praticidade, sensibilidade e especificidade similares ao mesmo, sendo utilizado principalmente em laboratórios de grandes rotinas (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

### 1.5.1.3 Ensaio imunocromatográfico (Teste Rápido)

Além dos testes sorológicos convencionais empregados no diagnóstico da infecção pelo HCV, foram desenvolvidos os chamados “Testes Rápidos”, cuja reação é evidenciada em cerca de trinta (30) minutos. Os testes imunocromatográficos empregam geralmente membranas pré-cobertas com antígenos virais. Os anticorpos anti-HCV, quando presentes nas amostras de soro, plasma ou sangue total humano, se ligam ao conjugado ouro coloidal e migram pela membrana. A formação do complexo anticorpo-antígeno determina o aparecimento de uma banda colorida na área teste. São de simples execução e possuem sensibilidade comparável aos testes ELISA (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Testes rápidos e simples possuem um sistema fácil de leitura visual, o que dispensa o uso de equipamento laboratorial, facilitando sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos e em laboratórios de pequeno porte (Figura 6).

Figura 6- Teste Rápido



Fonte: OLIVEIRA, 2014

#### 1.5.1.4. Testes Moleculares

Os testes de ácido nucleico (NAT) são capazes de detectar o RNA do HCV, quantificar a carga viral e indicar o genótipo do vírus em amostras de soro/plasma humanos. Essa metodologia é considerada padrão ouro para o diagnóstico da infecção por Hepatite C. O método utiliza sondas de ácidos nucleicos que são fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma sequência do ácido nucleico a ser detectado. Esse é amplificado por PCR (*polymerase chain reaction*), hibridização (b-DNA) ou sequenciamento TMA (*transcription mediated amplification*).

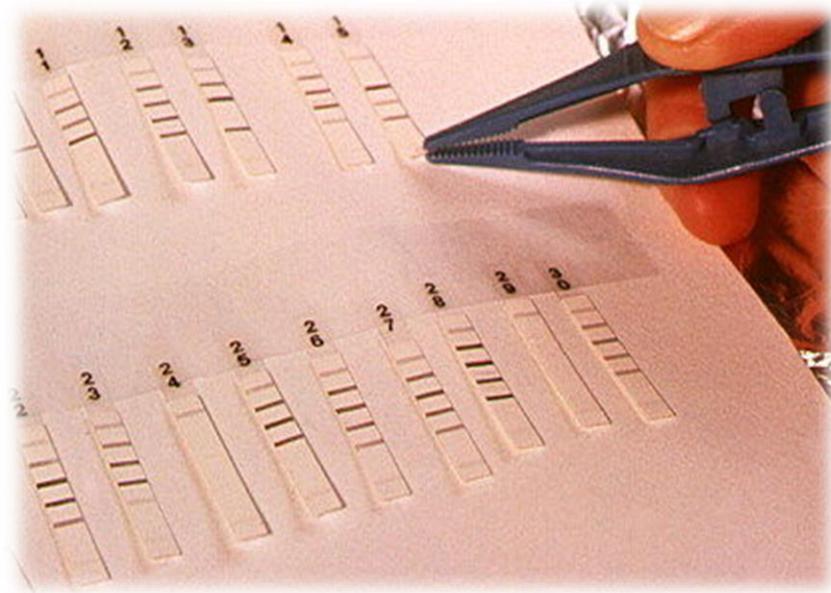
#### 1.5.2 Teste Confirmatório

##### 1.5.2.1 Ensaio Immunoblot

É um ensaio imunoenzimático utilizado como um valioso recurso na caracterização de frações antigênicas imunodominantes como bandas individuais em tiras. A detecção de anticorpos anti-HCV por *immunoblot* é baseada nas técnicas tradicionais de “*western blot*”, nas quais poliproteínas antigênicas codificadas pelo genoma do HCV são imobilizadas sobre um suporte de membrana. A visualização da reatividade dos anticorpos anti-HCV nas amostras com as proteínas individuais

codificadas do HCV das tiras segue o mesmo princípio do ELISA (FERREIRA; ÁVILA, 2001). O teste confirmatório é indicado para avaliar, em maior profundidade, amostras que se apresentam repetidamente reativas ou indeterminadas nos testes de triagem (Figura 7).

Figura 7 - Teste *immunoblot* - fitas de nitrocelulose



Fonte: PLAILLY, 2015

## 1.6 CARACTERÍSTICAS DOS TESTES SOROLÓGICOS

Os testes que detectam antígenos e anticorpos do HCV devem possuir alta sensibilidade (100%) e especificidade (> ou = a 99%) a fim de impedir a ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Resultados falsos positivos podem levar a realização de testes confirmatórios e tratamentos desnecessários, que podem ser invasivos ou levar a ocorrência de eventos adversos graves e/ou traumas psicológicos, caso a doença diagnosticada seja grave ou estigmatizante. Falsos negativos podem levar a um atraso no diagnóstico correto, no início do tratamento necessário, falsa sensação de segurança e, conseqüentemente, ao espalhamento de potenciais agentes infecciosos na comunidade (CLSI, 2014).

A sensibilidade diagnóstica é avaliada pela incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em questão. A especificidade diagnóstica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente não reagentes para a doença em questão (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Em resumo, a segurança e confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HCV dependem, entre outros parâmetros, da sua sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2006).

O monitoramento efetivo dos *kits* para diagnóstico de uso *in vitro* para a detecção do HCV se encontra regulamentado por força de legislação sanitária, tornando obrigatória a avaliação da qualidade antes dos mesmos serem disponibilizados no mercado nacional (BRASIL, 1976; BRASIL, 2006).

## 1.7 INSTRUÇÕES DE USO

As instruções de uso correspondem ao manual do produto, prospectos e outros documentos, contendo informações e orientações ao usuário, suficientes e adequadas para sua correta utilização com segurança e eficácia. Fazem parte do dossiê técnico do produto, enviado para análise pela ANVISA, nas petições de cadastro, registro, revalidação e alterações, nos casos de produtos das classes de risco II, III e IV.

As instruções de uso devem ser de fácil entendimento, com linguagem adequada ao público ao qual se destina, e redigidas em língua portuguesa. Devem conter informações referentes à versão e ano do documento, e corresponder fielmente ao que será entregue ao usuário do produto no que diz respeito ao seu conteúdo, obedecendo aos critérios do procedimento de controle de documentos do Sistema de Boas Práticas de Fabricação da empresa. (ANVISA, 2015).

No período novembro de 2006 a agosto de 2015, a regulação do tema era feita em conformidade com a Resolução ANVISA RDC nº 206, de 17 de novembro de 2006, que estabelece o Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamentos (ANVISA, 2006). A partir de agosto de 2015, a regulação passou a ser realizada pela RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015, que estabelece as informações que deverão

conter na rotulagem interna e externa e nas instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro* (ANVISA, 2015).

## 1.8 LABORATÓRIO DE SANGUE E HEMODERIVADOS

O Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), é um dos laboratórios do Departamento de Imunologia, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Uma das principais atividades executadas no LSH, é a realização de controle da qualidade de produtos para diagnóstico *in vitro*, empregados na triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia, para várias patologias de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), entre elas a hepatite C. Este ato regulatório, a análise prévia, é um dos requisitos para o registro de produtos de alto risco ao indivíduo e a saúde pública (Classe IV) na ANVISA, e está estabelecido na RDC Nº 36/2015 (BRASIL, 2015).

Os produtos para diagnóstico *in vitro* são definidos como:

"Reagentes, calibradores, padrões, controles, coletores de amostra, materiais e instrumentos, usados individualmente ou em combinação, com intenção de uso determinada pelo fabricante, para análise *in vitro* de amostras derivadas do corpo humano, exclusivamente ou principalmente para prover informações com propósitos de diagnóstico, monitoramento, triagem ou para determinar a compatibilidade com potenciais receptores de sangue, tecidos e órgãos" (BRASIL, 2015).

O Laboratório responde, também, pelo controle de qualidade de hemocomponentes, hemoderivados e reagentes imunohematológicos (INCQS, 2015). As atividades de controle da qualidade de reagentes, que ocasionalmente podem ser agrupados e montados em *kits* para diagnóstico, estão sob a responsabilidade do Grupo Técnico de Conjuntos, Reagentes e Insumos para Diagnósticos (GT/Kits) em conjunto com o Grupo Técnico de Sangue e Hemoderivados (GT/SH). Ambos trabalham em cooperação, inclusive, ocupando o mesmo espaço físico no INCQS, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH). A ajuda mútua ocorre porque o GT/Kits se utiliza de amostras de sangue testadas pelo GT/SH para ensaios e vice-versa. A totalidade das demandas de análise são provenientes de órgãos governamentais (INCQS, 2015a).

### 1.8.1 Painel Sorológico Positivo para HCV

O painel sorológico positivo de referência para controle de qualidade dos kits para detecção de Ac e/ou Ag do HCV foi confeccionado a partir de unidades de plasmas consideradas impróprias para uso terapêutico, e que seriam descartadas pelos Serviços de Hemoterapia (SH) por apresentarem resultados reagentes para um ou mais marcadores sorológicos na triagem dos doadores, conforme preconizado pela legislação vigente. O Ministério da Saúde, órgão responsável pelo monitoramento dos procedimentos hemoterápicos, autoriza que os SH das cinco regiões do Brasil, enviem estas unidades de plasma para o LSH (BRASIL, 2013).

No período 1996 a 2013, foram recebidas pelo LSH 5.988 unidades de plasma congelado (INCQS, 2015b).

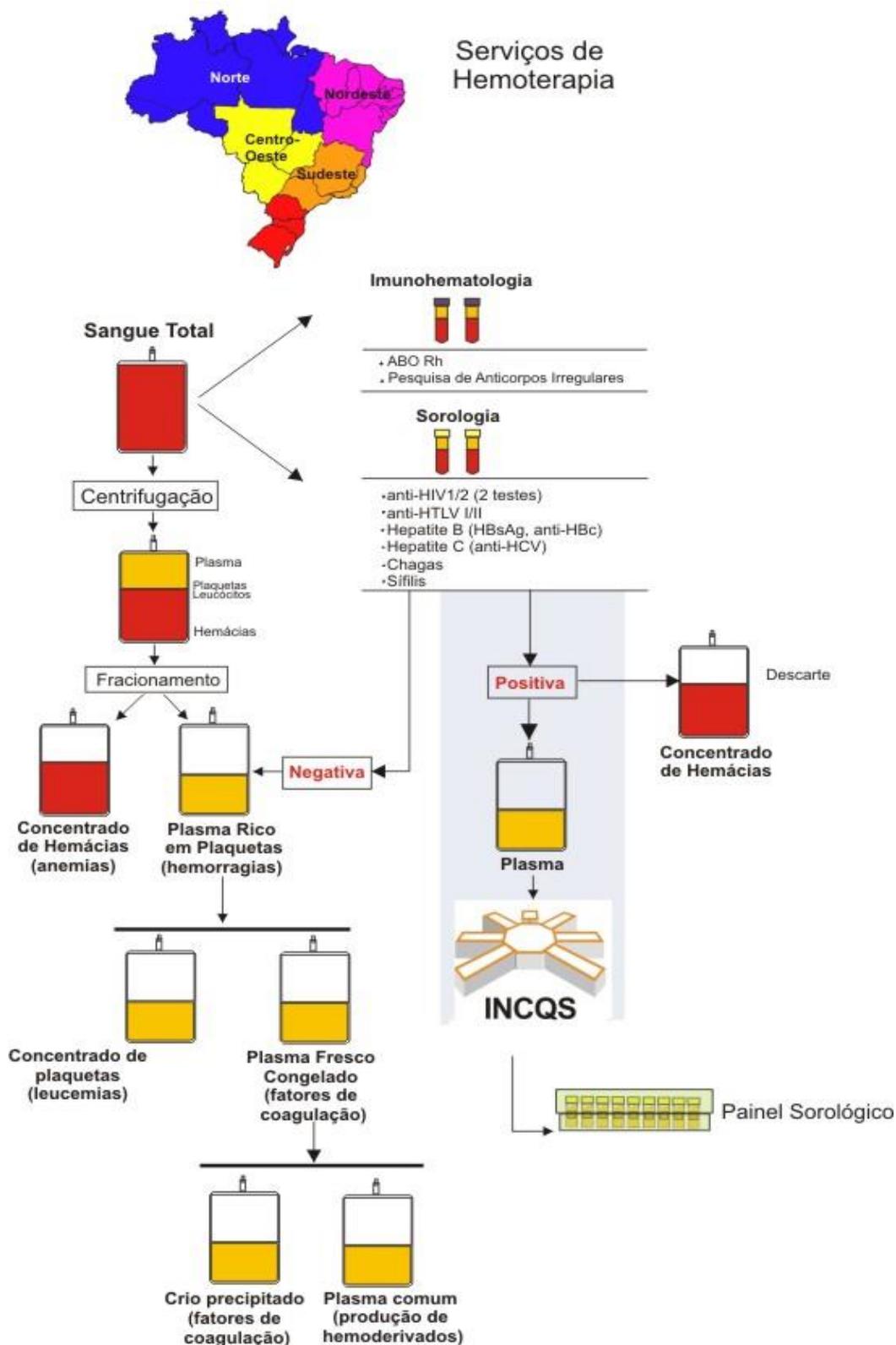
#### 1.8.1.1 *As amostras de plasma*<sup>3</sup>

As unidades de plasma, termo utilizado para unidade transfusional, que no LSH recebe o nome de amostra de plasma, foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores, colhido com anticoagulante, conforme Figura 8.

---

<sup>3</sup> Amostra de plasma: amostra processada, provenientes de unidades de plasma para uso terapêutico. São consideradas amostras processadas aquelas modificadas por algum processo como, congelamento, liofilização ou adição de estabilizantes.

Figura 8- Obtenção das unidades de plasma nos SH



Fonte: Adaptado de IAL, 2011

### 1.8.1.2 Recebimento, cadastro e identificação das amostras de plasma

As unidades de plasma foram encaminhadas ao LSH/INCQS, acondicionadas em caixas de isopor (mantidas congeladas), acompanhadas de documentação pertinente, constando: nome da instituição, data da coleta, iniciais do doador, volume aproximado de plasma e resultados da sorologia, quando aplicável. No ato do recebimento, as unidades foram cadastradas em caderno ata, de acordo, com procedimento operacional padronizado. Finalizado o cadastro, as unidades receberam identificação alfanumérica própria do LSH (Figura 9) e foram ainda analisadas quanto à integridade física, volume e identificação da reatividade descrita no rótulo (INCQS, 2012).

Figura 9 - Modelo de cadastro das amostras de plasma no LSH



Fonte : INCQS, 2012.

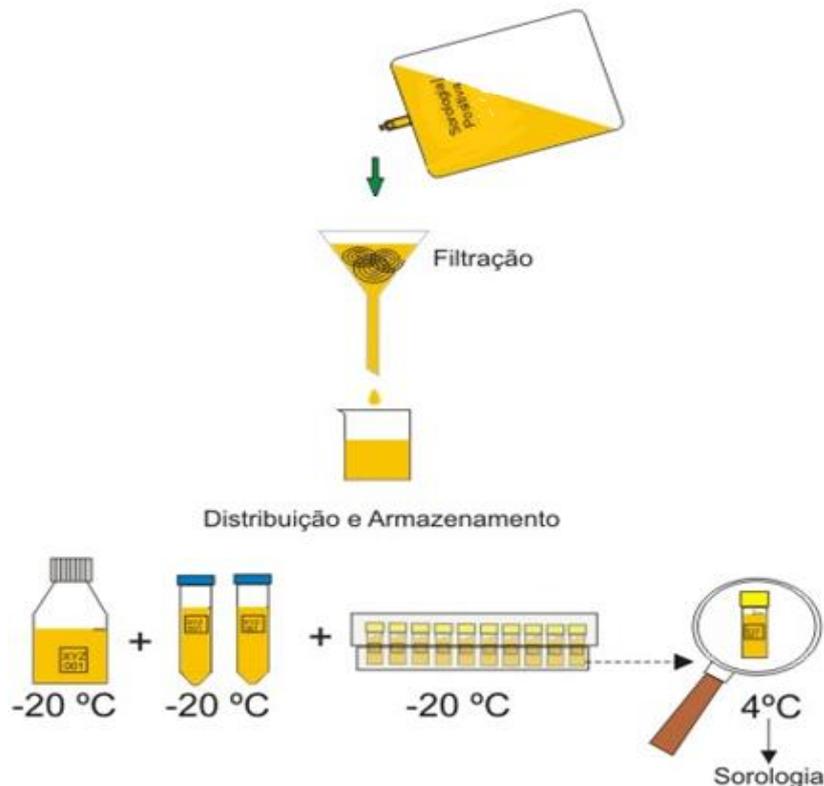
### 1.8.1.3 Processamento das amostras de plasma

Somente as unidades de plasma com volume aproximado ou superior a 200 mL foram selecionadas para processamento, sendo descongeladas a temperatura ambiente e seu conteúdo filtrado, individualmente, em gaze hidrófila (09 fios/cm<sup>2</sup>, 5 dobras–8 camadas) para redução de fibrina. As amostras fracionadas não receberam nenhum tipo de solução conservante ou passaram por processo de recalcificação. Após filtração, foram distribuídas e estocadas da seguinte forma:

- ✓ Aproximadamente 100 mL em garrafas Nalgene™ com capacidade para 250 mL, estocadas a temperatura igual ou inferior a –20°C;
- ✓ 40 mL em dois tubos Falcon™ com capacidade para 50 mL cada, estocados a temperatura igual ou inferior –20°C;

- ✓ 20 mL distribuídos em 10 criotubos com volume aproximado de 2,0 mL cada. Um total de 9 criotubos foram estocados a temperatura igual ou inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$  e 1 criotubo estocado a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), utilizado na realização dos testes sorológicos no LSH (Figura 10).

Figura 10 - Processamento das amostras de plasma



Fonte: INCQS, 2012.

#### 1.8.4 Caracterização das amostras de plasma

Além do algoritmo preconizado na testagem obrigatória realizada pelos SH, conforme determinado desde a promulgação da Portaria Nº 1376/93 até a RDC Nº 34/2014, legislação vigente no período estudado, foi adotado o procedimento para realização de testes adicionais para caracterização de todas as unidades de plasma encaminhadas, utilizando diferentes metodologias e *kits* disponíveis no mercado nacional, conforme descrito abaixo:

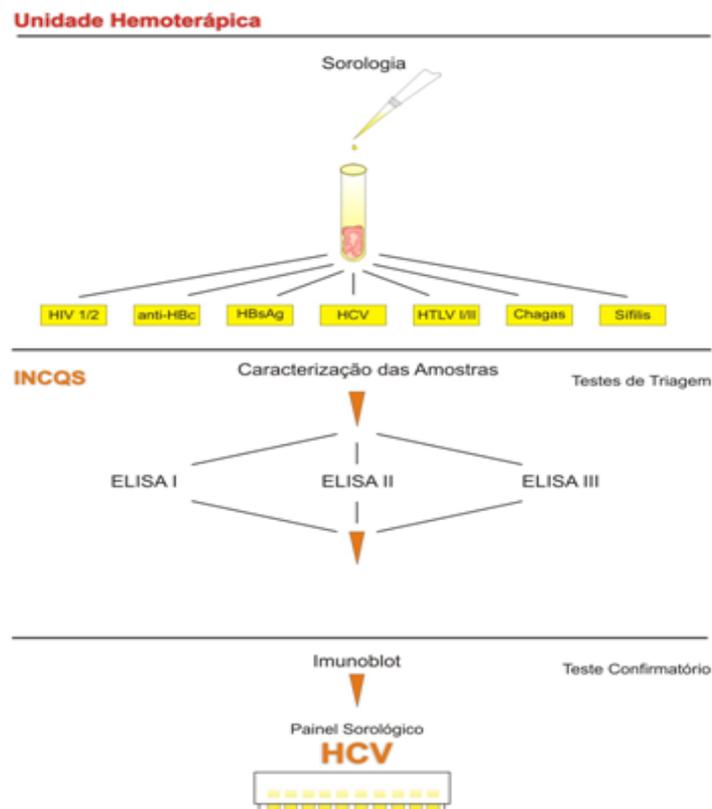
- ✓ 01(um) ensaio por ELISA/quimioluminescência para: hepatite B (HBsAg, anti-HBc), HTLV I e II, doença de Chagas, HIV 1 e 2 e sífilis;
- ✓ 03(três) ensaios distintos por ELISA/quimioluminescência para HCV;

- ✓ 01(um) ensaio por aglutinação para HCV;
- ✓ 01(um) ensaio confirmatório por *Western blot/Immunoblot* para HCV;

Os testes realizados seguiram rigorosamente as instruções de uso dos fabricantes. Todos os conjuntos diagnósticos utilizados possuem registro na ANVISA/MS e foram acondicionados de acordo com a temperatura recomendada pelo fabricante.

O algoritmo preconizado para caracterização das amostras de plasma nas suas diferentes etapas de triagem e confirmação sorológica realizadas no LSH está representado na Figura 11.

Figura 11 - Algoritmo utilizado para caracterização das amostras de plasma no LSH



Fonte: INCQS, 2012

As amostras de plasma reativas para Ac anti-HCV no ensaio imunoenzimático utilizado na etapa de caracterização (ELISA/quimioluminescência I) foram avaliadas frente a dois outros ensaios imunoenzimáticos (ELISA/quimioluminescências II e III), empregando diferentes antígenos. Com objetivo de compor um painel sorológico

positivo para Ac anti-HCV com amostras caracterizadas em todas as metodologias disponíveis até o ano de 2014 foi realizado, ainda, 01 ensaio confirmatório por *immunoblot*.

## 1.9 REGRESSÃO DE DEMING

Originalmente, os modelos foram introduzidos por Adcock (1878) e Kummel (1879), porém, permaneceram não utilizados por mais de 50 anos, até que eles foram revistos por Koopmans (1937) e posteriormente, por Deming em 1943. A partir de então, o método tornou-se muito popular na química clínica e áreas afins, passando a ser conhecido como Modelo de Regressão de Deming.

O Modelo de Regressão de Deming é ligeiramente mais difícil de modelar os dados quando comparado com o modelo de regressão linear simples (LINNET, 1993). Neste caso a principal diferença entre os modelos de regressão é que para a regressão linear simples temos como premissa que a variável independente ( $x$ ) não apresenta variância. Sendo assim a variabilidade dos resíduos se fundamenta única e exclusivamente sob a variância de " $y$ " (variável dependente). No modelo de Deming, observamos que a variância dos resíduos é composta de dois componentes, ou seja, tanto a variável independente como a variável dependente apresentam variabilidade (CLSI, 2014).

Muitos programas computacionais (*software*) usados na química clínica, oferecem regressão de Deming, por ex, MedCalc e R (LINNET, 1993).

### 1.10 O *Software* "R"

O "R" é uma linguagem e ambiente para computação gráfica e estatística similares ao "S", que foi desenvolvido por John Chambers no Bell Laboratories (agora, Lucent Technologies) (THE R-PROJECT, 2015).

O *software* fornece uma grande variedade de análises estatísticas (modelagem linear e não-linear, testes clássicos de estatística, etc.) e técnicas gráficas, sendo, portanto, altamente abrangente. A linguagem S é, frequentemente, o veículo de escolha para pesquisa em metodologias estatísticas, e o conceito do R é de fonte aberta para a participação dos usuários nesta atividade (THE R-PROJECT, 2015).

O *software* é livre e está disponível para uso sob condições do *Free Software Foundation's GNU General Public License*. Ele compila e é executado em uma ampla variedade de plataformas UNIX e sistemas similares como, Linux, Windows e MacOS. No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz (<http://cran.fiocruz.br/>) é um dos signatários do projeto (THE R-PROJECT, 2015).

### 1.11 JUSTIFICATIVA

O LSH vem analisando sistematicamente a sensibilidade e especificidade dos *kits* por meio de análises prévia, fiscal e controle, em atendimento às demandas de registro, revalidação, alterações, entre outras petições encaminhadas pela Gerência de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* (GEVIT) da Gerência Geral de Tecnologia e Produtos para a Saúde (GGTPS) da ANVISA.

A diversidade dos *kits* empregados na triagem e confirmação sorológica do HCV e a variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade justificam a importância do controle da qualidade desses produtos, sendo empregados painéis sorológicos confeccionados com amostras verdadeiramente positivas e negativas para esse vírus.

A avaliação da comutatividade é um importante requisito da qualidade analítica e visa assegurar a comparabilidade de resultados de testes realizados em diferentes sistemas (MALUF; SILVA; VIDIGAL, 2011).

Dada à importância e relevância global deste tema, em abril de 2013, a OMS realizou encontros com especialistas das maiores autoridades regulatórias, como *Food and Drug Administration*, AFSSAPS (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*), entre outros, com participação do INCQS e ANVISA, além de fabricantes de *kits* e agências acreditadoras. Isso reforça a necessidade de implantação da comutatividade de amostras de referência (OMS, 2014).

Além disso, a confecção de um Painel Sorológico Positivo para HCV com amostras comutáveis será, uma etapa imprescindível no processo de acreditação do LSH na Norma ISO 17025.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a comutatividade de resultados obtidos do Painel de Referência para HCV, utilizado no controle de qualidade dos *kits* empregados no diagnóstico sorológico do HCV no período de 2009 a 2014, como requisito obrigatório para o registro de tais produtos na Gerência de Produtos para Diagnóstico *in vitro* (GEVIT) da Gerência Geral de Tecnologia de Produtos para Saúde (GGTPS) da ANVISA.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Selecionar resultados obtidos nos ensaios de ELISA e quimioluminescência, realizados em amostras reativas para o HCV, oriundos de painel positivo já confeccionado e utilizado, no período entre janeiro de 2009 e dezembro de 2014.

2.2.2 Calcular a razão (Densidade Ótica (DO)/*Cut Off*<sup>4</sup> (CO) de todas as amostras com resultado positivo previamente selecionadas.

2.2.3 Aplicar testes estatísticos para verificar a comutatividade das amostras entre os ensaios avaliados.

2.2.4 Selecionar apenas as amostras verdadeiro positivas para HCV em no mínimo 05 ELISA e em, pelo menos, 01 quimioluminescência, efetuados.

2.1.5 Confeccionar Painel Sorológico de Referência contendo amostras verdadeiro positivas para HCV com resultados comutáveis.

2.1.6 Avaliar a conformidade das instruções de uso dos kits analisados, no período de 2009 a 2014, com a legislação vigente.

---

<sup>4</sup> O limiar de reatividade ou *cut off* de um teste é entendido como o ponto de corte, isto é, o valor acima do qual se deverá considerar o resultado como positivo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 BUSCA ATIVA DE DADOS – PERÍODO 2009 a 2014

3.1.1 Foi realizada busca retrospectiva, nos cadernos de recebimento de amostras do laboratório, denominado KITS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO, no período acima proposto. Esta busca teve como finalidade, identificar os *kits* para diagnóstico sorológico do HCV utilizando as metodologias ELISA e quimioluminescência na modalidade "Análise Prévia", no período compreendido entre janeiro de 2009 e dezembro de 2014 conforme a seguir.

- ✓ Ano e Nº do caderno;
- ✓ Nome do *kit*;
- ✓ Metodologia;
- ✓ Nº do Laudo de Análise (LA);
- ✓ Fabricante e origem - nacional ou importado;
- ✓ Tipo de sensibilização da fase sólida do *kit*;
- ✓ Nº dos protocolos;
- ✓ Resultados de Sensibilidade;
- ✓ Resultados de Especificidade
- ✓ Matriz biológica e validação dos controles positivo (CP) e negativo (CN).

O Quadro 1 mostra o modelo da planilha elaborada como instrumento de coleta de informações, oriundas dos cadernos de recebimento de amostras no LSH.

Quadro 1 - Planilha Excel® para coleta de informações dos cadernos

Ano														
Caderno Nº	Produtos	Lote nº	Metodologia	L. A	Fabricante	Tipo sensibilização	Nº dos Protocolos	C.O	Sensib. LSH	Sensib .bula . LSH	Especif . LSH	Especif .bula biológica	Matriz biológica	validação CP e CN

3.1.2 Foram identificados, listados e desarquivados das caixas box de armazenamento no LSH, todos os protocolos selecionados, referentes às análises dos *kits* para diagnóstico do HCV, nas metodologias propostas, que apresentaram

resultado positivo. Todos os protocolos utilizados durante as análises foram separados por ano de realização dos ensaios.

3.1.3 Foram relacionados todos os dados de interesse sobre os *kits* para diagnóstico do HCV, obtidos por meio dos registros nos protocolos de análise, e transferidos para planilhas Excel®, contendo as seguintes informações:

- ✓ Nº do Laudo de Análise (LA);
- ✓ Nº da amostra
- ✓ Resultados de DO de cada amostra que apresentou resultado positivo;
- ✓ Resultados de CO;

A seguir foram elaboradas sub planilhas no mesmo arquivo Excel®, Quadro 2, para registrar os valores de DO e CO, para cálculo da razão entre eles (*ratio*), de cada amostra positiva, individualmente, para cada ensaio efetuado.

Quadro 2 - Planilha Excel® para coleta de informações dos protocolos dos *kits* diagnósticos para os testes ELISA

Nº LA												
	Nº protocolo			Nº protocolo			Nº protocolo			Nº protocolo		
AMOSTRA	D.O	C.O	Ratio									

Os valores da razão DO/CO das amostras de plasma foram obtidos frente aos valores da razão DO/CO dos materiais ditos "padrão ouro" para HCV do NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Controls*) em todos os *kits*. Esses padrões, apesar de não apresentarem em seus certificados a determinação do grau de comutatividade, ainda são considerados imprescindíveis para o controle de qualidade dos *kits* para uso *in vitro* e apresentam valores da razão DO/CO  $\geq 1$ .

### 3.2 AVALIAÇÃO DAS INSTRUÇÕES DE USO DOS KITS

As instruções de uso contidas nos processos correspondentes ao período de 2009 a 2014 foram desarquivadas e identificadas de acordo com o número dos laudos

de análise. A legislação que estabelece as informações que deverão conter na rotulagem interna e externa e nas instruções de uso de Produtos para Diagnóstico *in vitro* foi atualizada pela RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. No entanto, a RDC Nº 206, de 17 de novembro de 2006 foi utilizada como base, face ao período estabelecido para análise.

### 3.2.1 Análise das Informações contidas nas Instruções de Uso

A RDC Nº 206, de 17 de novembro de 2006 exige 21 itens, relacionados a garantia da qualidade, biossegurança, operacionais, obtenção e interpretação dos resultados de medição e legais.

Nesta etapa, as instruções de uso, fornecidas por cada fabricante de *kit*, foram analisadas quanto aos seguintes indicadores:

- 1 - Nome comercial;
- 2 - Descrição da finalidade ou uso do produto;
- 3 - Descrição do princípio de ação ou aplicação do produto;
- 4 - Relação dos componentes fornecidos com o produto;
- 5- Relação dos materiais, artigos, acessórios, insumos ou equipamentos necessários para a utilização do produto que não são fornecidos com o mesmo;
- 6 - Indicação das condições adequadas de armazenamento do produto;
- 7 - Descrição das precauções, dos cuidados especiais e esclarecimentos sobre os riscos decorrentes do manuseio do produto e seu descarte;
- 8 - Orientações sobre os cuidados com a amostra biológica objeto do diagnóstico;
- 9 - Descrição do processo de medição;
- 10 - Orientações sobre os procedimentos de calibração do processo de medição;
- 11 - Descrição dos procedimentos de cálculos e obtenção dos resultados da medição;
- 12 - Informações sobre as limitações do processo de medição;
- 13 - Orientações sobre o controle interno da qualidade para assegurar o desempenho adequado do processo;
- 14 - Informações sobre os valores de referência aplicáveis;
- 15 - Descrição das características de desempenho do produto;

- 16 - Indicação ao consumidor dos termos/condições de garantia da qualidade do produto;
- 17 - Nome do Solicitante, CNPJ, endereço;
- 18 - Origem do produto, indicando o nome do fabricante e seu endereço;
- 19 - Indicação do serviço de atendimento ao consumidor;
- 20 - Relação das referências bibliográficas cujo conteúdo fundamenta ou comprova as informações fornecidas;
- 21 - Data de edição das instruções de uso, com informação do mês e ano de edição ou revisão destas instruções.

3.2.2 Todas as instruções de uso foram digitalizadas para facilitar e otimizar a análise.

### 3.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS OBTIDOS DE FORMA RETROSPECTIVA

A partir dos resultados registrados na planilha correspondente aos Quadros 1 e 2, foram selecionados os *kits* para diagnóstico sorológico HCV utilizados, possibilitando a construção dos critérios de aceitação. Estes *kits* foram recebidos para análise prévia conforme a legislação vigente.

#### 3.3.1 Construção dos critérios para seleção dos *kits*

Para esta análise foram construídas as premissas para seleção dos *kits* os seguintes critérios de aceitação para análise estatística:

- ✓ Amostras verdadeiro positivas para HCV, por no mínimo 05 diferentes ensaios de ELISA e, pelo menos, 01 de quimioluminescência;
- ✓ Razão DO/CO  $\geq 1$
- ✓ Metodologias- ELISA e quimioluminescência;
- ✓ Matriz de análise - maior número de *kits*;
- ✓ Quanto a detecção - maior número de *kits*;

- ✓ Quanto à sensibilização da fase sólida (Ag ou AC detectado por AC ou Ag complementar marcado com uma enzima) - maior número de *kits*.

Foi realizada avaliação estatística das razões DO/CO correspondentes as amostras positivas que usadas nos *kits* que atendiam aos critérios de aceitação, utilizando filtro na planilha Excel®. A partir destas verificações, foram realizadas análises utilizando modelos de regressão linear ordinária e, posteriormente, modelo de regressão de Deming das razões DO/CO, combinando par-a-par os *kits* ELISA e, separadamente, os *kits* quimioluminescência estudados.

### 3.3.2 Avaliação prévia segundo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO)

O modelo de regressão linear utilizado foi o método dos mínimos quadrados ordinário (MMQO). Sob este método foi avaliada a significância do coeficiente angular ser diferente de zero. Para o coeficiente linear, foi avaliada a significância deste ser igual a zero. Ambos os testes foram aplicados sob um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Na avaliação do MMQO foram avaliadas as premissas para aplicação deste modelo:

#### a) Comportamento normal dos resíduos

Na avaliação dos resíduos foi aplicado o Teste de Shapiro-Wilk sob um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) sob a hipótese nula de normalidade.

#### b) Média dos resíduos igual a zero (aleatoriedade dos resíduos);

Esta avaliação foi realizada para verificar se os resíduos, apesar de apresentar uma distribuição normal, apresentavam média igual a zero, mostrando uma tendência a aleatoriedade.

### c) Homocedasticidade das variâncias dos resíduos

A homocedasticidade, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos em função da variável independente (variável  $x$ ), foi testada ao aplicar o Teste de Levene aos resíduos sob um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

### d) Autocorrelação dos resíduos

Para avaliar a autocorrelação dos resíduos foi aplicado o Teste de Durbin-Whatson que verifica a correlação dos resíduos tomados par-a-par. Este teste foi aplicado sob a hipótese nula de não correlação e a um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3.3 Significância da correlação entre as variáveis ( $x;y$ ).

Nesta etapa do estudo foi avaliado o coeficiente de correlação de Pearson entre os resultados da razão de DO/CO dos pares de *kits* estudados. Foram considerados apenas os pares de *kits* que apresentaram significância da correlação sob uma hipótese nula de correlação igual a zero ( $\rho\text{-valor} < \alpha = 0,05$ ).

Os *kits* que apresentaram resultados satisfatórios para os critérios acima citados foram selecionados para aplicação do modelo de regressão linear de Deming. O Quadro 3 resume as premissas aplicadas no modelo MMQO descrito acima.

Quadro 3 - Resumo das premissas para aplicação do modelo MMQO

PARÂMETRO	TESTE ESTATÍSTICO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO
Coefficiente Angular	Teste t de <i>Student</i>	H0: $\text{tg } \alpha = 0$ H1: $\text{tg } \alpha \neq 0$ - Rejeitar H0
Coefficiente Linear	Teste t de <i>Student</i>	H0: $b=0$ H1: $b \neq 0$ - Não rejeitar H0
Homocedasticidade	Teste de Levene	H0: variância dos resíduos $(SD)^2$ constante H1: variância dos resíduos $(SD)^2$ não constante - Não rejeitar H0
Auto-Correlação dos Resíduos	Teste de Durbin-Whatson	H0: $r=0$ H1: $r \neq 0$ - Não rejeitar H0
Normalidade dos Resíduos	Teste de Normalidade para qualquer $N_e$ - Shapiro- Wilk	H0: é normal H1: não é normal - Não rejeitar H0
Significância da Correlação das Variáveis	Teste t de <i>Student</i>	H0: $r=0$ H1: $r \neq 0$ - Rejeitar H0
Média dos Resíduos = 0 (não é teste)		

### 3.3.4 Regressão Linear de Deming

A regressão linear de Deming é um modelo de estimação do coeficiente angular e linear da reta que passa entre um conjunto de pares ordenados  $(x,y)$  de tal forma que a soma dos quadrados dos resíduos seja a menor possível. Este método, diferentemente do MMQO, considera que ambas as variáveis  $(x, y)$  são estocásticas, ou seja, apresentem variabilidade (CLSI, 2014).

Neste trabalho a modelagem e análise dos dados foi realizada por meio do *software* "R" versão 3.1.3, lançado em 03 de setembro de 2015 (The R-Project, 2015).

3.3.5 Foram selecionadas apenas as amostras verdadeiro positivas, que após análise estatística apresentaram resultados comutáveis, para confecção de um painel sorológico, utilizado no controle de qualidade de *kits* para diagnóstico sorológico do HCV.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DA BUSCA ATIVA RETROSPECTIVA DOS DADOS

4.1.1 Primeiramente foram identificados e selecionados os Cadernos de Recebimentos de *Kits*, denominado KITS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO, para análise, no período de 2009 a 2014. Os cadernos identificados e selecionados para realização deste trabalho foram os de nº 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

### 4.2 DA AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS

#### 4.2.1 Da Pesquisa Preliminar dos Dados Registrados

A partir dos dados registrados nos cadernos, foram identificados 376 protocolos de análise de 37 *kits* para diagnóstico sorológico do HCV, referente as metodologias ELISA e quimioluminescência, analisados no período de 2009 a 2014, estão demonstrados na Tabela 01 e Gráficos 05 e 06.

Tabela 01- Registro dos dados analíticos sumarizados da análise prévia dos kits para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.

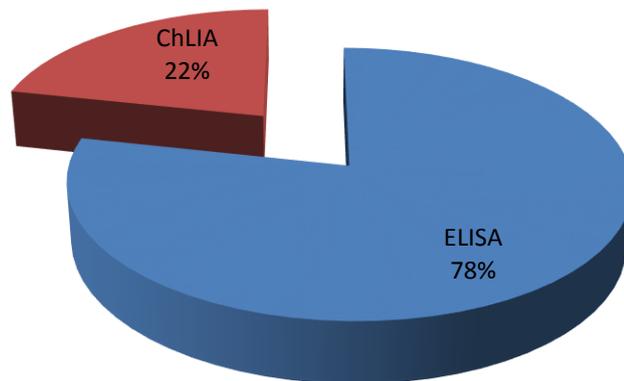
ANO	Nº DE PROTOCOLOS	KITS- METODOLOGIAS		FABRICANTES	
		ELISA	ChLIA	NACIONAL	IMPORTADO
2009	78	08	0	01	07
2010	31	03	0	01	02
2011	85	08	01	03	06
2012	104	03	06	0	09
2013	16	01	01	0	02
2014	62	06	0	0	06
<b>TOTAL</b>	<b>376</b>	<b>29</b>	<b>08</b>	<b>05</b>	<b>32</b>

O total de amostras positivas ( $DO/CO \geq 1,0$ ) encontradas nesta fase da pesquisa foi de **471**, parte do painel de amostras verdadeiro positivas (62) e as demais, que fazem parte do painel de amostras em fase final de caracterização (409), apresentaram resultado positivo em pelo menos 1 metodologia ELISA ou ChLIA.

Conhecer o universo total de amostras com resultado positivo, registradas nos protocolos, foi importante para ampliação do painel de amostras verdadeiro positivas e avaliação do grau de comutatividade em relação às metodologias ELISA e ChLIA.

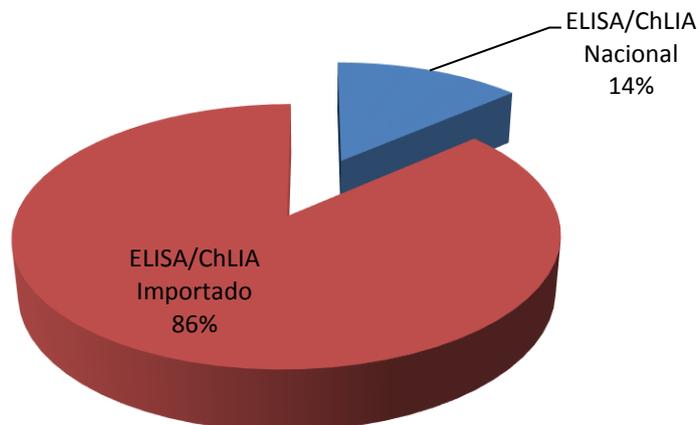
O Gráfico 05 mostra a distribuição das metodologias no total de kits encontrados na busca.

Gráfico 05- Distribuição das Metodologias dos *kits* para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.



A distribuição acima demonstra o predomínio da metodologia ELISA, 78% (29/37), contra 22% (08/37) da metodologia ChLIA.

O Gráfico 06 apresenta a distribuição quanto a ser nacional ou importado os *kits* para diagnóstico sorológico do HCV.

Gráfico 06- Distribuição dos Fabricantes dos *kits*, no período 2009-2014

Quanto aos fabricantes dos *kits* o predomínio é de fabricantes internacionais demonstrando que 86% (32/37) trata-se de *kits* importados e apenas 14% (05/37) são de fabricação nacional.

#### 4.2.2 Da Análise dos dados obtidos frente aos critérios de aceitação adotados

Com a finalidade de atender aos critérios de aceitação estabelecidos neste estudo, **quanto à matriz biológica**, apresentamos os resultados encontrados na Tabela 02, que mostra que a maioria dos *kits* utilizam soro/plasma para detecção do HCV nas metodologias ELISA (27/29) e ChLIA (08/08).

Tabela 02 - Distribuição quanto à matriz biológica dos kits para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014

METODOLOGIA	MATRIZ BIOLÓGICA	Nº DE KITS
ELISA	Soro/plasma	27
	Sangue seco	02
ChLIA	Soro/plasma	08

Outro critério de seleção, **quanto ao tipo de detecção do HCV**, está demonstrado na Tabela 03 abaixo.

Tabela 03 - Distribuição do tipo de detecção dos kits para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014

METODOLOGIA	TIPO DE DETECÇÃO	Nº DE KITS
ELISA	Anticorpo anti HCV	25
	Ag/Ac	04
ChLIA	Anticorpo anti HCV	7
	Ag	1

A Tabela 03 mostra a predominância da detecção de **anticorpos (Ac) anti HCV** nas metodologias ELISA (25/29) e ChLIA (07/08), sendo, portanto, estes os *kits* selecionados para avaliação.

Outro critério de seleção, **quanto à sensibilização da fase sólida**, está demonstrado na Tabela 04 e mostra que a maioria dos *kits* nas metodologias ELISA (14/29) e ChLIA (04/08) apresentam sensibilização de proteínas das regiões estrutural (**Core**) e não estrutural (**NS3, NS4 e NS5**) do HCV.

Tabela 04 - Distribuição quanto à sensibilização da fase sólida dos *kits* para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014

METODOLOGIA	SENSIBILIZAÇÃO FASE SÓLIDA	Nº DE KITS
ELISA	Core, NS3, NS4 e NS5	14
	Outros	15
ChLIA	Core, NS3, NS4 e NS5	04
	Outros	04

Foram eliminados do total acima, 2 *kits* na metodologia ELISA, por apresentar o sangue seco como matriz biológica e 1 *kit* ChLIA pelo grande número de amostras sem resultado. Com isso, o total de *kits* a serem considerados na avaliação final passa para **12 ELISA e 3 ChLIA**.

#### 4.2.3 Da Análise das Instruções de Uso

A análise foi realizada nas instruções de uso, dos 15 *kits* que atendem aos objetivos estabelecidos, dos quais 12 são do ensaio ELISA e 03 do ensaio quimioluminescência, para detecção de anticorpos anti-HCV. As informações foram

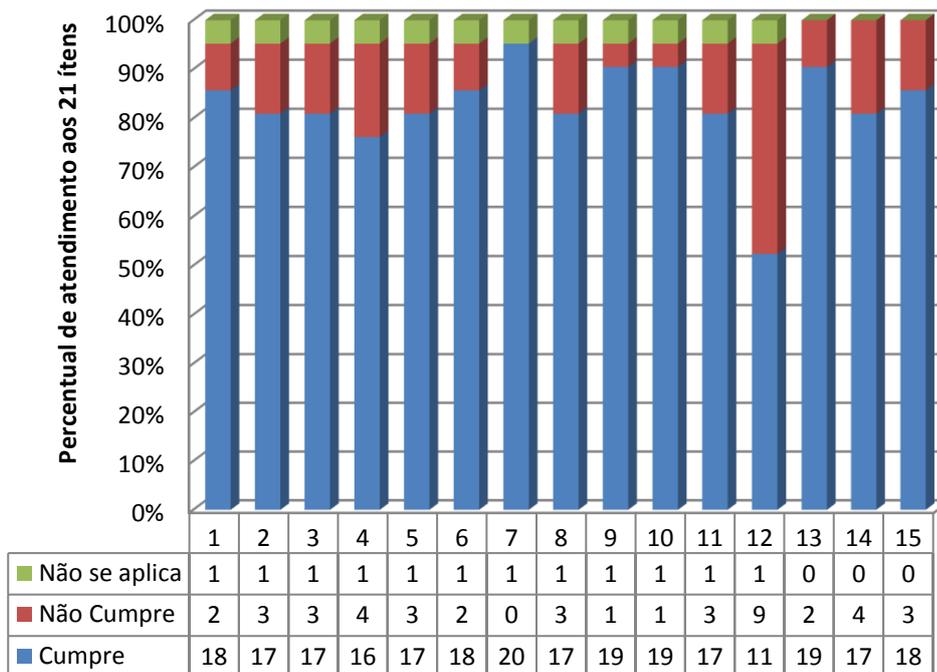
analisadas com base na RDC Nº 206/2006, levando em conta os 21 itens exigidos, relacionados a garantia da qualidade, biossegurança, operacionais, obtenção e interpretação dos resultados de medição e legais. A Tabela 05 abaixo, expressa os resultados da análise.

Tabela 05 - Análise dos atributos das instruções de uso de 12 kits do ensaio ELISA e 03 do ensaio quimioluminescência para diagnóstico sorológico do HCV no período 2009-2014.

Lista de verificação para instrução de uso para produto para diagnóstico in vitro - RDC 206/2006	ELISA kit 1	ELISA kit 2	ELISA kit 3	ELISA kit 4	ELISA kit 5	ELISA kit 6	ELISA kit 7	ELISA kit 8	ELISA kit 9	ELISA kit 10	ELISA kit 11	ELISA kit 12	Químio kit 1	Químio kit 2	Químio kit 3
1 - Nome comercial;	sim	sim	sim	sim	sim	sim									
2 - Descrição da finalidade ou uso do produto;	sim	sim	sim	não	sim	sim									
3 - Descrição do princípio de ação ou aplicação do produto, informando a base científica, bem como explicação concisa da metodologia, técnicas ou reações envolvidas;	sim	sim	sim	não	sim	sim									
4 - Relação dos componentes fornecidos com o produto, descrevendo as especificações ou características técnicas qualitativas e quantitativas de cada componente, incluindo, conforme o caso;	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim
5 - Relação dos materiais, artigos, acessórios, insumos ou equipamentos necessários para a utilização do produto que não são fornecidos com o mesmo;	sim	sim	sim	não	sim	sim									
6 - Indicação das condições adequadas de armazenamento do produto;	sim	sim	sim	não	não	sim									
7 - Descrição das precauções, dos cuidados especiais e esclarecimentos sobre os riscos decorrentes do manuseio do produto e seu descarte. Quando couber, apresentar, instruções de biossegurança, procedimentos para eliminar os materiais infectantes, derivados de sangue humano, animal ou de organismos geneticamente modificados (OGM), e alerta ao consumidor sobre a potencialidade de transmissão de doenças infecciosas;	não	sim	não	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
8 - Orientações sobre os cuidados com a amostra biológica objeto do diagnóstico, descrevendo;	não	sim	sim	sim	não	não	sim	não	não	sim	sim	não	sim	sim	sim
9 - Descrição do processo de medição;	sim	sim	sim	sim	sim	sim									
10 - Orientações sobre os procedimentos de calibração do processo de medição descrevendo;	NA	NA	NA	sim	sim	sim									
11 - Descrição dos procedimentos de cálculos e obtenção dos resultados da medição informando;	sim	sim	sim	sim	sim	sim									
12 - Informações sobre as limitações do processo de medição, incluindo orientações sobre a utilização de testes adicionais mais específicos ou sensíveis, quando os resultados obtidos assim o sugerirem;	sim	sim	sim	sim	sim	sim									
13 - Orientações sobre o controle interno da qualidade a ser adotado pelo usuário para assegurar o desempenho adequado do processo de medição;	sim	sim	sim	sim	sim	sim									
14 - Informações sobre os valores de referência aplicáveis obtidos em populações sadias ou valores demográficos, epidemiológicos, estatísticos, desejáveis, terapêuticos ou tóxicos.	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim
15 - Descrição das características de desempenho do produto;	sim	sim	não	sim	sim	sim	não	sim	sim						
16 - Indicação ao consumidor dos termos e condições de garantia da qualidade do produto;	sim	sim	sim	não	não	não									
17 - Nome do Solicitante, CNPJ, endereço;	sim	não	sim	não	não	sim	sim	não	sim	sim	sim	não	sim	não	não
18 - Origem do produto, indicando o nome do fabricante e seu endereço;	sim	sim	sim	sim	não	sim									
19 - Indicação do serviço de atendimento ao consumidor;	sim	não	sim	não	não	sim	sim	não	sim	não	não	não	sim	sim	não
20 - Relação das referências bibliográficas cujo conteúdo fundamenta ou comprova as informações fornecidas;	sim	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim						
21 - Data de edição das instruções de uso, com informação do mês e ano de edição ou revisão destas instruções.	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim

O desempenho dos fabricantes dos *kits* cujas instruções de uso foram analisadas, está mostrado no Gráfico 07.

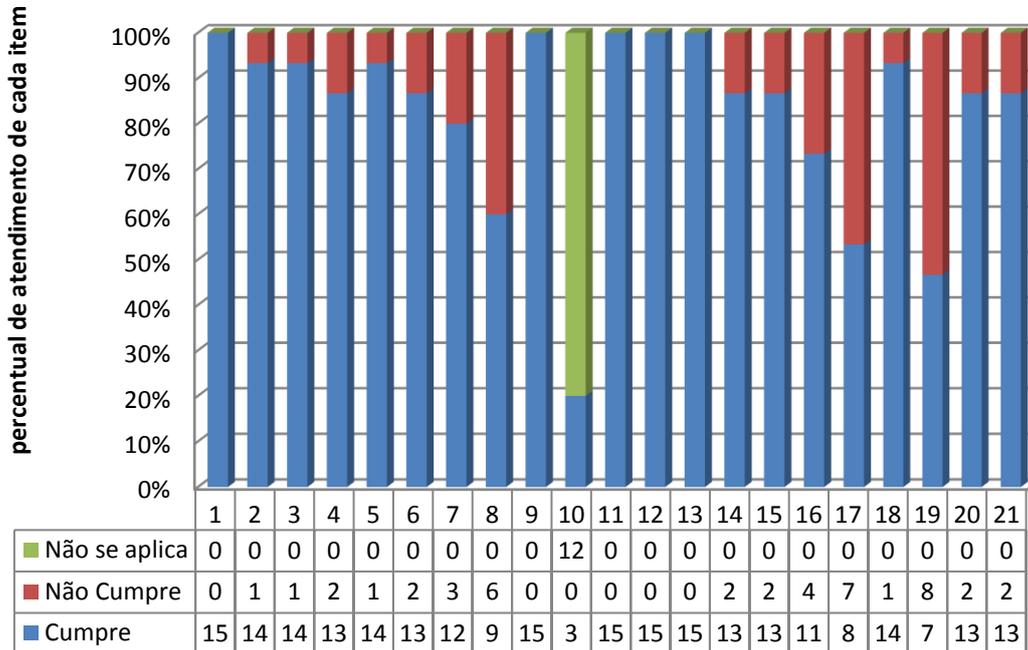
Gráfico 07 - Avaliação das instruções de uso dos 15 *kits* selecionados quanto aos 21 itens relacionados pela RDC nº 206/2006.



O Gráfico 07 mostra que apenas o *kit* de número 7 apresentou instrução de uso que atendeu a 100% dos itens exigidos pela RDC 206/2006. Mostra, também, que o *kit* 12 apresentou instrução de uso com 55 % dos itens exigidos. Os demais, 13 *kits* nas metodologias ELISA (10) e quimioluminescência (3), apresentaram desempenho entre 80 e 95 %. Para os *kits* na metodologia ELISA foram considerados 20 itens, tendo em vista que, o item 10 da RDC em questão, “Orientações sobre os procedimentos de calibração do processo de medição” não se aplica aos mesmos.

O Gráfico 08 mostra o percentual de atendimento de cada item estabelecido pelo RDC 206 pelos 15 *kits*.

Gráfico 08 - Percentual de atendimento de cada item estabelecido pelo RDC 206 pelos 15 kits



O Gráfico 08 mostra que os itens 1, 9, 10, 11, 12 e 13 (06/21) foram considerados satisfatórios em todas (100%) as instruções de uso avaliadas (15), levando em conta que o item 10 não se aplica aos kits da metodologia ELISA. Os itens 2, 3, 5 e 18 (04/21) satisfatórios em 14 instruções de uso avaliadas, os itens 4, 6, 14, 15, 20 e 21 (06/21) satisfatórios em 13 instruções de uso e os itens 7, 8, 16, 17 e 19 (05/21) foram satisfatórios, respectivamente, em 12, 9, 11, 8 e 7 instruções de uso.

Resultados encontrados frente aos critérios de aceitação estabelecidos, estão listados abaixo:

- ✓ Amostras verdadeiro positivas para HCV, por no mínimo 05 diferentes ensaios de ELISA e pelo menos 01 da metodologia quimioluminescência, apresentando razão DO/CO  $\geq 1,0$ ;
- ✓ Metodologias - 12 kits ELISA e 01 quimioluminescência;
- ✓ Matriz de Análise - 15 kits para análise de soro e plasma humano;
- ✓ 15 kits para detecção de anticorpos de HCV;
- ✓ Sensibilização da fase sólida - 15 kits proteínas estrutural do HCV – core e não estrutural - NS3, NS4 e NS5;

#### 4.2.4 Do Painel Positivo para HCV

Do total de **471 amostras** encontradas inicialmente, em atendimento ao critério de aceitação de amostras que apresentem, no mínimo, 05 resultados do ensaio de ELISA para anticorpos anti-HCV e 01 resultado do ensaio de quimioluminescência, foram preliminarmente selecionadas **130 amostras**, composto por amostras do painel verdadeiro positivo para HCV (30) e as demais do painel de amostras em fase final de caracterização (100). A Tabela 06 apresenta o modelo utilizado para registrar os resultados correspondente às 130 amostras, que podem ser vistos na íntegra no Anexo A.

Tabela 06 - Modelo da tabela usada para registrar os resultados das amostras dos *kits* selecionados

METODOLOGIA	ELISA ANTI HCV												QUIMIOLUMINESCÊNCIA ANTI HCV		
FABRICANTE															
SENSIBILIZAÇÃO	core, NS3, NS4, NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5									
	kit 1	kit 2	kit 3	kit 4	kit 5	kit 6	kit 7	kit 8	kit 9	kit 10	kit 11	kit 12	kit 1	kit 2	kit 3
AMOSTRA	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO										

#### 4.2.5 Da Análise Estatística dos Dados

Dado o grau de complexidade da avaliação do grau de comutatividade, foram eliminadas amostras com volume inferior a 40 mL (tubo Falcon®) em estoque (-20 °C), resultando em **118 amostras**. Consideramos que, somente quantidades acima deste volume de amostra justifica a realização desta avaliação.

Para a aplicação dos modelos estatísticos utilizados, foi necessária a aplicação de filtro na planilha Excel® para eliminar os espaços correspondentes às amostras sem resultado (SR), resultando em **44 amostras** de plasma. Esta eliminação evitou que amostras SR fossem consideradas com resultado zero, o que levaria a um viés na análise.

Os valores amostrais foram tabelados, como mostrado na Tabela 07. *Kits* identificados de 1 a 12 correspondem aos da metodologia ELISA e 13 a 15 aos da quimioluminescência.

Tabela 07 - Valores de razão DO/CO obtidos nas 44 amostras testadas nos *kits* das metodologias ELISA (*kits* 1-12) e quimioluminescência (*kits* 13-15)

METODOLOGIA	ELISA ANTI HCV												QUIMIOLUMINESCÊNCIA ANTI HCV		
FABRICANTE															
SENSIBILIZAÇÃO	core, NS3, NS4, NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5	Core, NS3, NS4 e NS5											
	kit 1	kit 2	kit 3	kit 4	kit 5	kit 6	kit 7	kit 8	kit 9	kit 10	kit 11	kit 12	kit 1	kit 2	kit 3
AMOSTRA	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO									
1	3,95	5,22	2,46	15,52	4,2	26,28	4,29	4,89	21,43	8	19,76	4,78	6,73	11	52,59
2	3,95	5,56	3,78	16,3	4,94	26,71	4,29	4,89	21,43	8	18,76	1,37	11,05	11	97,2
3	3,95	5,7	1,9	16,3	3,96	28,3	4,29	4,89	21,43	8	19,17	3,79	9,4	11	74,38
4	3,95	6,59	1	14,49	4,91	28,3	4,29	4,89	20,46	8	19,09	4,42	9,72	11	76,07
5	3,95	5,11	4,62	14,49	5,18	27,46	4,29	4,89	21,43	8	19,87	4,16	8,34	11	132,09
6	3,95	4,75	4,31	14,49	5,01	28,3	4,29	4,89	21,43	8	19,27	2,35	6,7	11	115,23
7	3,95	5,19	4,29	14,49	5,05	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,82	2,21	9,56	11	121,98
8	3,95	5,26	3,8	14,49	4,95	26,15	4,29	4,89	21,43	8	19,27	3,88	10,36	11	82,49
9	3,95	5,89	2,78	14,49	3,97	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,6	4,01	10,84	11	102,78
10	3,95	4,71	3,37	14,49	5,09	26,82	4,29	4,89	21,43	8	18,62	1,99	7,96	11	90,38
11	3,95	4,62	3,19	14,49	5,11	26,73	4,29	4,89	21,43	8	18,51	4,49	10,02	11	114,9
12	3,95	5,75	4,34	13,09	5,27	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,82	2,29	8,92	11	96,71
13	3,95	4,74	1,91	13,67	5,47	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,54	2,53	7,71	11	113,82
14	3,95	4,42	2,74	14,49	5,06	28,3	4,29	4,89	21,43	8	14,18	1,59	9,83	11	112,95
15	3,95	4,49	5,26	14,49	4,71	26,74	4,29	7,28	21,43	8	18,45	4,35	7,55	11	93,41
16	3,95	4,42	4,73	14,49	4,92	27,52	4,29	7,28	21,43	8	18,24	4,17	9,98	11	109,08
17	4,00	4,42	4,54	13,85	4,28	26,82	4,33	6,85	21,43	8,22	16,21	3,54	7,03	11	69,64
18	4,00	4,6	1,98	14,49	4,75	26,49	4,33	5,82	21,43	8,22	20,5	4,22	9,92	11	152,57
19	4,00	4,1	3,98	13,15	4,25	26,68	4,33	6,96	21,43	8,22	18,96	3,11	8,97	11	80,25
20	4,00	3,6	2,82	8,25	2,35	23,92	4,33	5,82	11,7	8,22	14,9	2,36	4,5	11	6,15
21	4,00	4,83	6	14,49	4,39	27,52	4,33	5,99	21,43	8,22	18,63	6,27	8,45	11	79,91
22	4,00	4,57	2,97	11,67	3,59	23,07	4,33	3,49	19,81	8,22	18,21	3,87	8	11	90,62
23	4,00	3,45	4,47	14,49	4,72	26,89	4,33	7,28	21,43	8,22	15,72	5,16	10,93	11	123,66
24	4,00	5,63	3,82	14,49	4,08	26,61	4,33	5,45	21,43	8,22	18,47	3,87	9,17	11	89,95
25	4,00	2,22	6	14,49	4,88	27,52	4,33	6,51	21,43	8,22	19,57	2,35	7,04	11	57,14
26	4,00	4,84	2,1	14,49	3,67	22,79	4,33	6,97	21,43	8,22	19,97	2,07	9,69	11	126,57

27	4,00	4,38	3,76	15,23	4,37	21,59	4,33	7,28	21,43	8,22	20,17	4,63	9,11	11	121,89
28	4,00	4,17	4,32	15,23	5,15	27,52	4,33	5,16	21,43	8,22	19,55	4,24	10,89	11	105,66
29	4,00	4,65	2,26	13,3	4,23	26,12	4,33	5,09	21	8,22	18,91	4,79	10,53	11	120,36
30	4,00	4,46	1,16	15,23	4,49	27,52	4,33	5,8	21,43	8,22	19,22	4,91	6,89	11	125,59
31	4,00	5,78	2,66	15,23	4,86	27,52	4,33	5,05	21,43	8,22	19,63	3,98	9,01	11	126,86
32	4,00	4,74	3,6	15,23	4,88	27,02	4,33	1,61	21,43	7,84	2,79	1,04	4,25	6,38	1,2
33	4,00	2,59	1,71	1,83	1,02	17,82	4,33	5,25	10,67	8,22	18,21	3,3	8,94	11	84,24
34	4,00	4,72	6	15,23	4,8	27,52	4,33	6,86	21,43	8,22	19,49	3,51	9,24	11	125,81
35	4,00	3,81	2,74	15,23	4,43	27,52	4,33	7,02	21,43	8,22	19,08	3,06	11,25	11	3,5
36	4,00	4,25	2,18	15,23	4,56	27,52	4,33	4,06	21,43	7,54	12,17	1,95	2,49	6,38	3,23
37	3,20	2,62	1,4	7,58	2,06	12,87	4,06	6,11	9,98	8,22	18,7	4,05	9,74	11	81,08
38	4,00	3,97	2,61	14,62	4,92	23,94	4,33	3,79	21,43	8,22	18,48	4,73	4,96	11	114,13
39	4,00	3,85	3,83	15,23	4,99	26,66	4,33	3,72	21,43	8,22	18,09	3,91	8,62	11	66,46
40	4,00	3,69	6	14,58	3,54	27,52	4,33	5,6	21,43	8,22	20,1	2,73	10,41	11	58,97
41	4,00	3,79	2,64	15,23	3,65	27,52	4,33	5,89	21,43	8,22	20,47	3,95	10,65	11	123,7
42	4,00	3,94	3,79	12,72	5,17	26,75	4,33	4,68	21,43	8,22	19,49	4,25	10,65	11	102,63
43	4,00	3,32	4,08	15,23	4,67	26,86	4,33	4,93	21,43	8,22	14,39	4,78	9,65	11	20,34
44	4,00	3,53	5,23	12,91	4,42	27,52	4,33	5,83	21,43	3,8	2,82	1,29	1,37	2,36	6,51

A partir destas verificações, foram realizadas análises estatísticas usando o modelo de regressão linear, com todas as combinações de pares, para os 12 *kits* ELISA e posteriormente para os 03 *kits* quimioluminescência estudados.

#### 4.2.5.1 Testes de hipóteses aplicados

##### Significância dos coeficientes angulares e lineares.

A avaliação da significância dos coeficientes angulares e lineares apresentam interpretações inversas uma vez que para a avaliação do coeficiente linear desejamos que o valor zero seja um ponto que pertença ao intervalo de confiança para este parâmetro. Sendo assim foi adotado o critério que, apenas os pares que não apresentaram rejeição da hipótese nula foram considerados como candidatos para prosseguimento das avaliações subsequentes.

Na avaliação do coeficiente angular o comportamento foi inverso pois foram selecionadas apenas as curvas que apresentaram um coeficiente angular significativamente diferente de zero (rejeitando  $H_0$ ). Para ambos os casos foram aplicados um teste bilateral em nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Na Tabela 08 podemos observar os  $p$ -valores dos testes aplicados aos pares de *kits* que atenderam ao critério definido para o coeficiente linear.

Tabela 08 - Valores de  $p$  ( $\alpha>0,025$ ) para avaliação de significância dos coeficientes lineares aplicados aos pares de *kits* ELISA e ChLIA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Intercepto	0,703	0,262	0,2084	0,188	0,00246	2,00E-16	0,191	0,011	0,0116	0,164	0,405				
2	Intercepto		6,22E-05	2,23E-05	0,000118	1,79E-12	2,00E-16	1,01E-09	1,22E-09	2,00E-16	7,57E-06	0,000993				
3	Intercepto			4,28E-15	3,02E-13	2,00E-16	2,00E-16	4,74E-12	2,00E-16	2,00E-16	5,79E-15	7,54E-09				
4	Intercepto				0,222	2,42E-10	2,00E-16	1,85E-06	4,09E-08	2,00E-16	7,09E-06	0,00503				
5	Intercepto					1,48E-12	2,00E-16	1,64E-08	1,63E-09	2,00E-16	2,79E-07	0,00038				
6	Intercepto						2,00E-16	0,000242	0,667	4,97E-12	0,000324	0,00759				
7	Intercepto							0,655	0,00488	0,315	0,285	0,856				
8	Intercepto								1,29E-13	2,00E-16	0,000033	0,0114				
9	Intercepto									1,07E-13	0,000348	0,0302				
10	Intercepto										0,0173	0,3925				
11	Intercepto											0,29495				
12	Intercepto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	Intercepto													1,29E-11	0,62781	
14	Intercepto															0,108835
15	Intercepto															X

Na Tabela 09 podemos observar os  $p$ -valores, em nível de significância estabelecido ( $\alpha>0,025$ ), dos testes aplicados aos pares de *kits* que atenderam ao critério definido para o coeficiente angular.

Tabela 09 - Valores de  $\rho$  ( $\alpha < 0,025$ ) para avaliação de significância dos coeficientes angulares aplicados aos pares de kits ELISA e ChLIA.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Angular		0,178	0,104	0,0187	0,0213	1,74E-06	2E-16	0,672	5,94E-05	0,7761	0,632	0,789				
2	Angular			0,286	0,00118	0,004639	0,00156	0,792	0,0977	0,00216	0,645	0,257	0,811075				
3	Angular				0,111	0,0401	0,0257	0,108	0,0802	0,0247	0,263	0,487	0,708				
4	Angular					3,23E-10	3,55E-08	0,0717	0,795	2E-16	0,951	0,752	0,69732				
5	Angular						1,17E-08	0,143	0,282	2,93E-12	0,657	0,905	0,85479				
6	Angular							0,000272	0,48259	8,37E-11	0,39	0,605389	0,47957				
7	Angular								0,881	0,00102	0,813	0,443	0,994				
8	Angular									0,754	0,809	0,0238	0,1388				
9	Angular										0,565	0,891102	0,813				
10	Angular											4,32E-07	0,0141				
11	Angular												0,00139				
12	Angular																
13	Angular													6,48E-08	0,000317		
14	Angular															0,000113	
14	Angular																X

### Normalidade dos resíduos de regressão

Uma das premissas para aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é a tendência de normalidade para os resíduos de regressão. A tendência de comportamento normal dos resíduos foi avaliada ao aplicar o teste de Shapiro-Wilk. Neste caso foi tomado como hipótese nula a tendência a normalidade em nível de significância de 0,05 sob um teste bilateral. Os resultados de  $\rho$ -valores obtidos, apresentados na Tabela 10, demonstram que a maioria das curvas formadas pelos kits não atenderam a esse critério sob um alfa de 5%.

Tabela 10 - Valores de  $p$  ( $\alpha > 0,025$  ou  $0,05$ ) para avaliação do comportamento normal dos resíduos aplicados aos pares de kits ELISA e ChLIA.

Normalidade dos resíduos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	x	0,7933	0,2979	2,66E-10	0,003994	0,000482	3,86E-06	0,002375	1,57E-09	2,11E-10	5,90E-07	0,1069			
2			0,6783	0,008622	0,004559	1,89E-05	2,34E-11	0,01028	0,000136	6,64E-10	1,83E-09	0,1078			
3				7,64E-05	0,06325	0,001501	1,02E-06	0,02019	8,24E-07	2,04E-09	9,99E-07	0,07953			
4					0,3718	0,002067	4,00E-06	0,002442	0,03142	2,10E-10	2,78E-07	0,06862			
5						0,000216	3,65E-06	0,004674	0,1115	2,17E-10	3,87E-07	0,09612			
6							0,000111	0,002862	0,000298	2,94E-10	6,23E-07	0,1605			
7								0,002553	2,41E-08	2,32E-10	1,02E-06	0,08264			
8									1,31E-09	1,98E-10	1,38E-05	0,09619			
9										2,15E-10	3,14E-10	0,07492			
10											1,01E-09	0,09198			
11												0,4421			
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
13														0,000517	0,08702
14															0,008216
15															x

### Média dos resíduos igual a zero

Uma das premissas que devem ser atendidas para aplicação do MMQO (método dos mínimos quadrados ordinários) é que a média dos resíduos deve ser igual a zero. Para esta verificação foram calculadas as médias dos resíduos para todas as curvas desenvolvidas nesse trabalho. Na Tabela 11 podemos observar que todas as médias dos resíduos para todos os pares de curvas estão muito próximas de zero.

Tabela 11 - Valores obtidos das médias dos resíduos para as curvas relacionadas a avaliação dos pares de *kits* ELISA e ChLIA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	X	1,79E-11	-2,2E-12	-2,5E-11	-1,1E-11	-3,2E-11	4,72E-13	-2,4E-11	-4,7E-11	1,3E-11	-3,8E-11	-6E-12			
2			-1,2E-11	-4,5E-11	-1,4E-12	6,67E-12	-1,1E-12	1,46E-11	-7,3E-13	-1,6E-13	-5,5E-11	4,16E-12			
3				1,4E-11	-3,6E-12	9,57E-12	-1,9E-14	-2,2E-11	-3,7E-11	1,5E-13	-5,3E-11	-1,3E-11			
4					1,85E-12	-4,6E-12	-1,2E-13	-1,9E-11	1,1E-11	5,72E-13	-5,9E-14	3,35E-11			
5						1,8E-11	-9,9E-13	-2,7E-12	2,9E-11	1,57E-11	1,68E-11	1,8E-11			
6							7,12E-13	2,21E-11	1,58E-11	-4,6E-12	8,95E-12	-5,2E-13			
7								-5E-13	-1,6E-11	4,44E-12	7,69E-11	2,96E-11			
8									6,29E-11	4,97E-12	2,37E-11	-1,8E-12			
9										7,5E-12	4,16E-11	1,18E-11			
10											-7,4E-12	-2,6E-11			
11												-1,3E-11			
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13														-2,5E-12	4,76E-10
14															6,32E-10
15															X

### Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (em relação ao eixo x)

Para avaliação da homocedasticidade das variâncias foi aplicado o teste de Levene em nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Este teste foi aplicado sob uma hipótese nula de ausência de homocedasticidade. Na Tabela 12 podemos observar os resultados dos  $p$ -valores obtidos para o teste de Levene, para todas as curvas encontradas. Nesta tabela estão evidenciadas as curvas onde foram observadas a homocedasticidade.

Tabela 12 - Valores de  $p$  ( $\alpha < 0,025$ ) obtidos da avaliação da homocedasticidade dos resíduos para as curvas relacionadas a avaliação dos pares de kits ELISA e ChLIA

Homocedasticidade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		3,94E-07	1,98E-11	0,001757	0,004802	0,000304	0,4463	4,71E-06	0,06754	0,1008	0,0013	5,10E-11			
2			0,004368	0,1941	0,4423	0,04353	1,07E-07	0,2253	0,7871	0,000648	0,04318	0,07343			
3				0,9197	0,001059	0,3408	6,92E-12	0,1693	0,4628	6,66E-05	0,2226	0,3569			
4					0,1152	0,4999	0,001519	0,4554	0,5137	0,0101	0,3246	0,6003			
5						0,02418	0,002068	0,07733	0,6016	0,01459	0,02744	0,02111			
6							0,000264	0,129	0,2171	0,001778	0,6828	0,1853			
7								2,18E-06	0,06229	0,07113	0,001181	2,09E-08			
8									0,8595	0,08823	0,09904	0,6373			
9										0,1655	0,1473	0,7105			
10											0,004136	7,58E-06			
11												0,1331			
12															
13														0,001091	2,98E-07
14															7,57E-08
15															X

### Ausência da autocorrelação dos resíduos

A ausência de autocorrelação dos resíduos é uma das premissas para utilização do MMQO com fins de estimação do coeficiente angular e linear bem como suas respectivas variâncias. Para avaliação da ausência da autocorrelação dos resíduos aplicou-se o teste de Durbin-Watson em nível de significância de 5% e sob uma hipótese nula de ausência de autocorrelação. Como podemos observar, evidenciados na Tabela 13, a grande maioria das curvas dos pares não apresentaram autocorrelação dos resíduos. Valores em espaço em branco apresentam autocorrelação.

Tabela 13 - Valores de  $\rho$  ( $\alpha > 0,025$ ) obtidos da avaliação da autocorrelação dos resíduos para as curvas relacionadas a avaliação dos pares de kits ELISA e ChLIA

Autocorrelação dos resíduos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		0,02577	0,7104	0,5728	0,3863	0,09581	< 2,2e-16	0,04035	0,5076	0,000597	0,0356	0,4452			
2			0,6114	0,7778	0,8183	0,5049	0,2537	0,05581	0,6377	0,000724	0,0864	0,4424			
3				0,4866	0,2649	0,1643	0,4822	0,1285	0,5227	0,001067	0,04152	0,4576			
4					0,09113	0,007552	0,1379	0,06894	0,4328	0,000608	0,06402	0,4661			
5						0,08336	0,1168	0,05906	0,4844	0,000658	0,03816	0,4599			
6							0,01712	0,05459	0,2305	0,000615	0,02635	0,4563			
7								0,06133	0,2969	0,000548	0,035	0,4503			
8									0,6789	0,000562	0,007421	0,2871			
9										0,000666	0,04898	0,4593			
10											0,4594	0,4206			
11												0,2587			
12		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13														0,06175	0,2434
14															0,4997
15															X

### Significância da correlação (entre os kits)

Para extrapolação do MMQO para o modelo de regressão de Deming adotou-se o critério de significância da correlação entre as variáveis dependentes e independentes. Desta forma aplicou-se o teste t de *Student* para avaliação da significância da correlação entre as variáveis para cada curva estudada. Este teste foi realizado em nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) tendo como hipótese nula correlação igual a zero. Na Tabela 14 podemos observar os resultados de  $\rho$ -valores obtidos do teste aplicado para todos os pares de curvas que fizeram parte desta avaliação. Como podemos ver a maioria das curvas não apresentaram significância na correlação.

Tabela 14 - Valores de  $p$  ( $\alpha < 0,025$ ) obtidos da avaliação da significância da correlação para as curvas relacionadas à avaliação dos pares de *kits* ELISA e ChLIA

Significância da correlação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		0,1783	0,1042	0,01869	0,0213	0,001738	<2,2e-16	0,6722	0,05942	0,7761	0,6319	0,7892			
2			0,2855	0,001181	0,004639	0,001561	0,7917	0,09768	0,002156	0,6451	0,2566	0,8111			
3				0,1114	0,04008	0,02575	0,1083	0,08018	0,02472	0,2629	0,4872	0,7079			
4					3,23E-07	3,55E-05	0,07167	0,7947	2,22E-16	0,9509	0,7517	0,6973			
5						1,18E-05	0,1429	0,2819	2,93E-09	0,6571	0,9051	0,8548			
6							0,000272	0,4826	8,37E-11	0,3897	0,6054	0,4796			
7								0,8806	0,001016	0,8127	0,4434	0,9942			
8									0,7539	0,8095	0,0238	0,1388			
9										0,565	0,8911	0,813			
10											0,000432	0,01408			
11												0,001391			
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13															6,48E-05
14															
15															

### Significância da correlação entre as variáveis (x;y).

Nesta etapa do estudo foi avaliado o coeficiente de correlação entre os pares de *kits* estudados. Foram considerados apenas os pares de *kits* que apresentaram um p-valor para a significância da correlação sob uma hipótese nula de correlação igual a zero ( $p\text{-valor} < \alpha = 0,05$ ).

Os *kits* que apresentaram resultados satisfatórios para os critérios acima citados estão demonstrados no Quadro 04.

Quadro 04 - Pares de *kits* com resultado satisfatório na análise de MMQO.

Kit – A	Kit - B
4	5
11	12

A tabela 15 mostra os valores encontrados na análise do MMQO realizada para pares de *kit* 04 x *kit* 05 e *kit* 11 x *kit* 12, demonstrando que eles atendem aos testes de hipóteses realizados.

Tabela 15 - Valores encontrados na análise dos pares de *kits* selecionados pelo MMQO

Pares de kits	Coef linear	Coef. angular	Normal. resíduos	Média resíduos	Homocedasticidade das variâncias	Autocorrelação dos resíduos	Significância da correlação
04 x 05	0,222	3,23E-10	0,3718	~ zero	0,1152	0,09113	3,23E-05
11 x 12	0,295	0,0139	0,4421	~ zero	1,1331	0,2587	0,01391

Os Gráficos 09 a 16 mostram os resultados da média dos resíduos, normalidade dos resíduos, homocedasticidade das variâncias e valores discrepantes para os pares de *kit* 04 x *kit* 05 e *kit* 11x *kit* 12 mostrados no quadro acima.

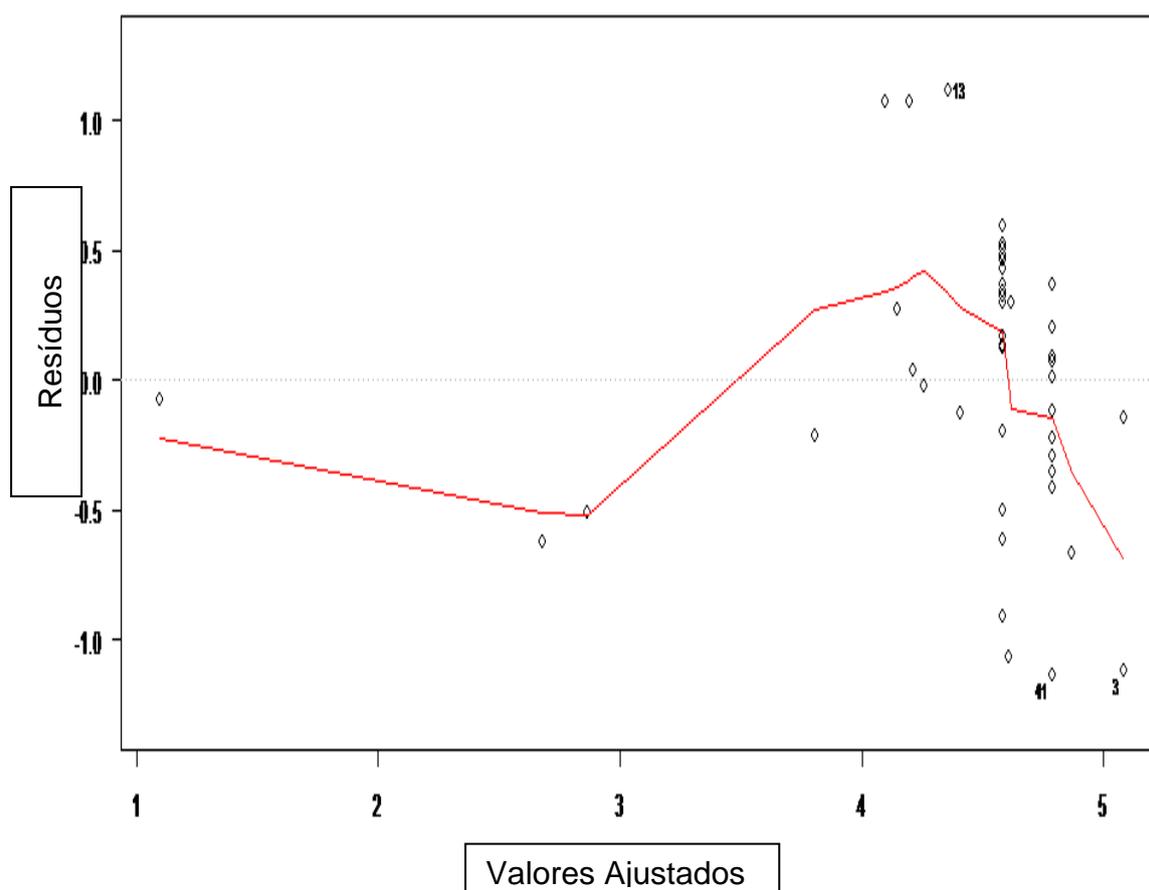
Gráfico 09 - Média dos resíduos - *kit* 04 x *kit* 05

Gráfico 10- Normalidade dos resíduos - kit 04 x kit 05

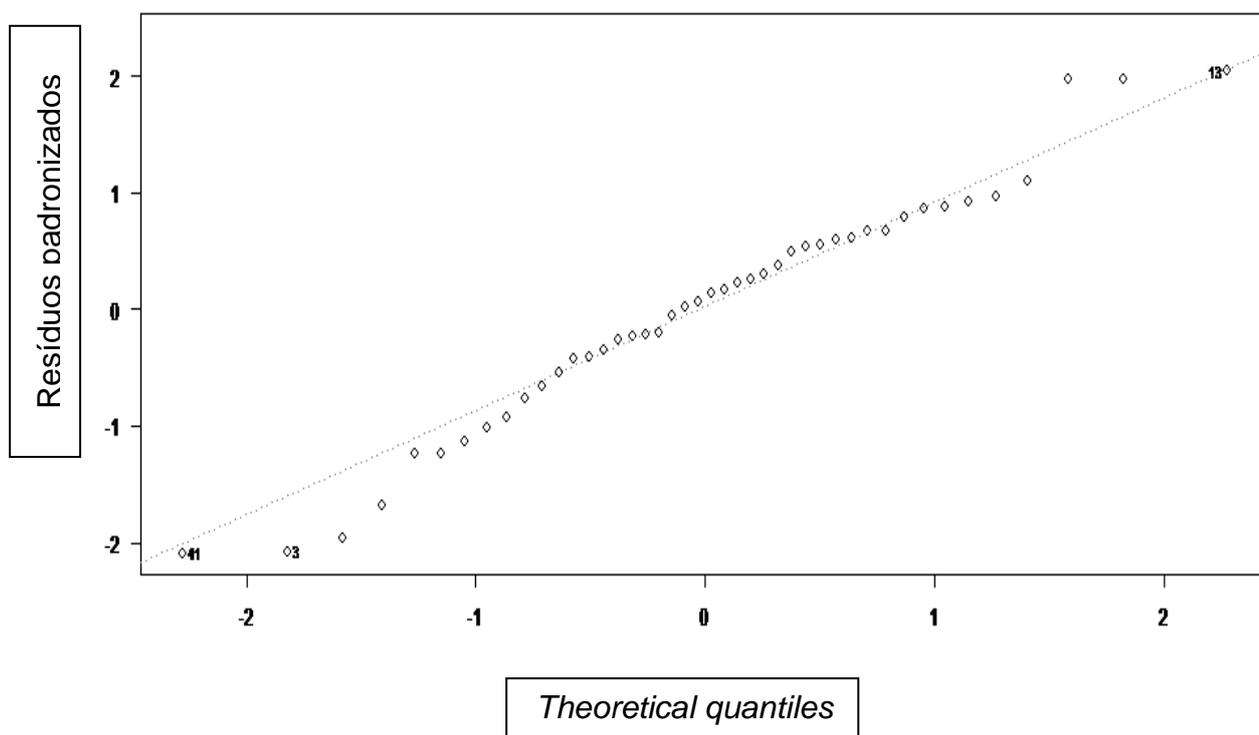


Gráfico 11 - Homocedasticidade das variâncias- kit 04 x kit 05

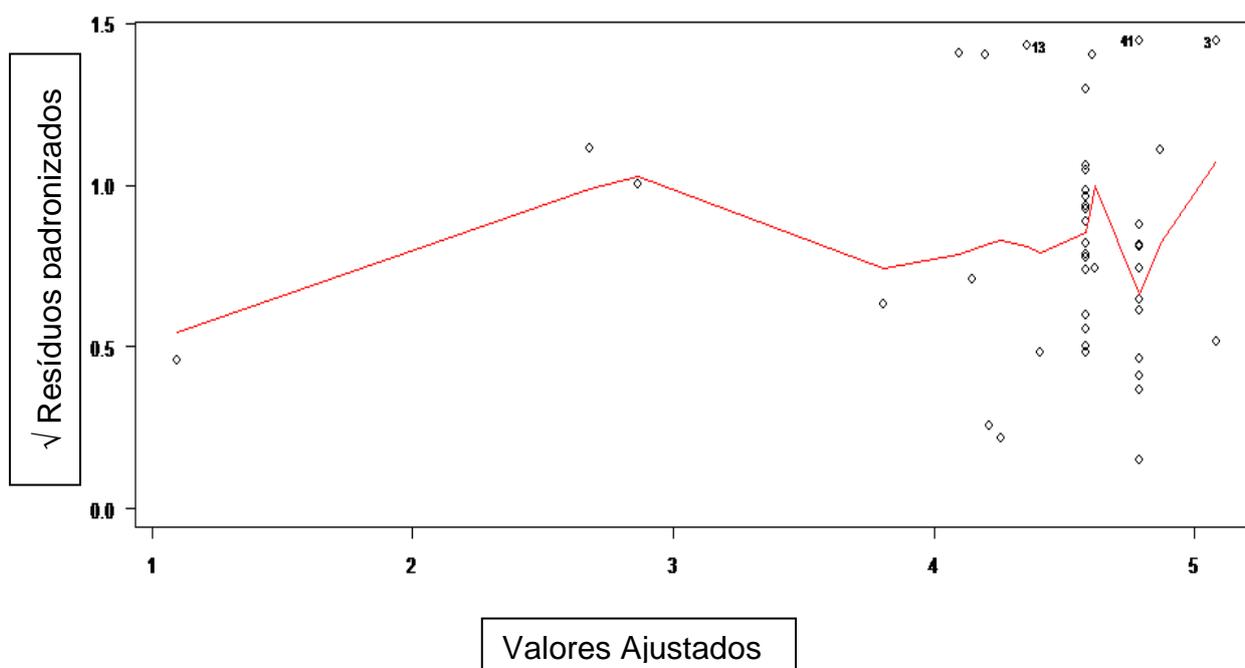
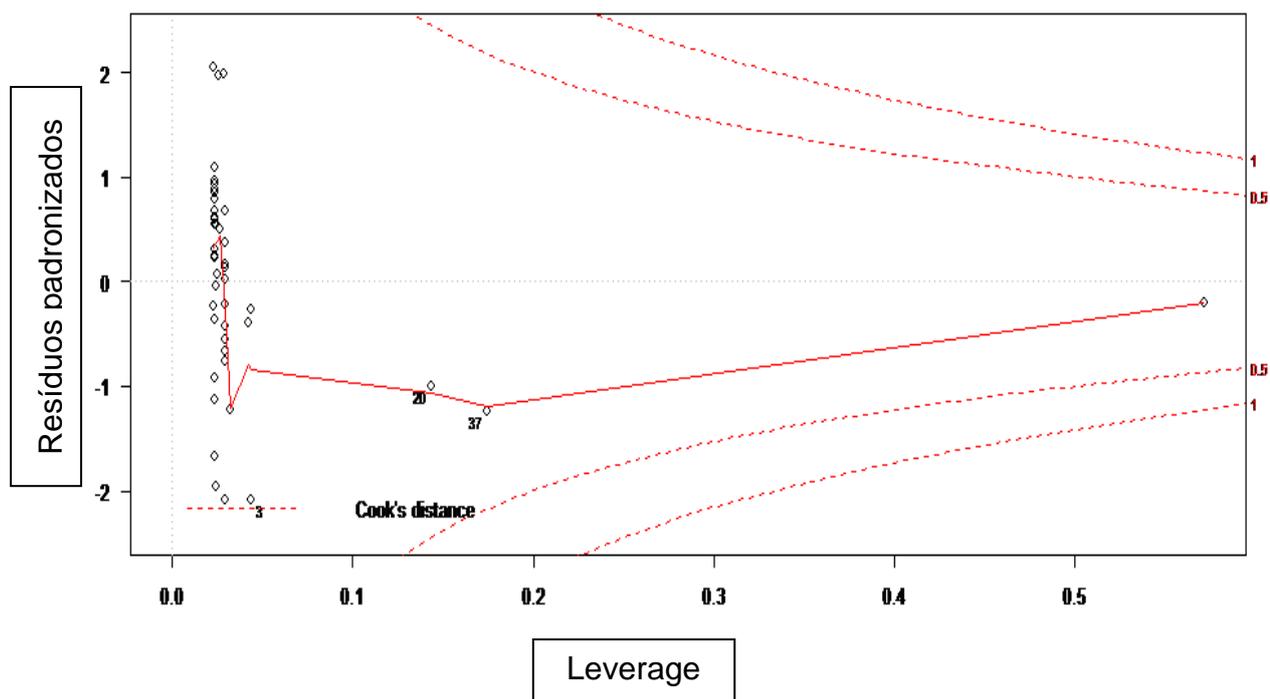


Gráfico 12 - Valores discrepantes (*out liers*) - kit 04 x kit 05

Todos os pontos fora da reta pontilhada são considerados discrepantes.

Gráfico 13 - Média dos resíduos - kit 11 x kit 12

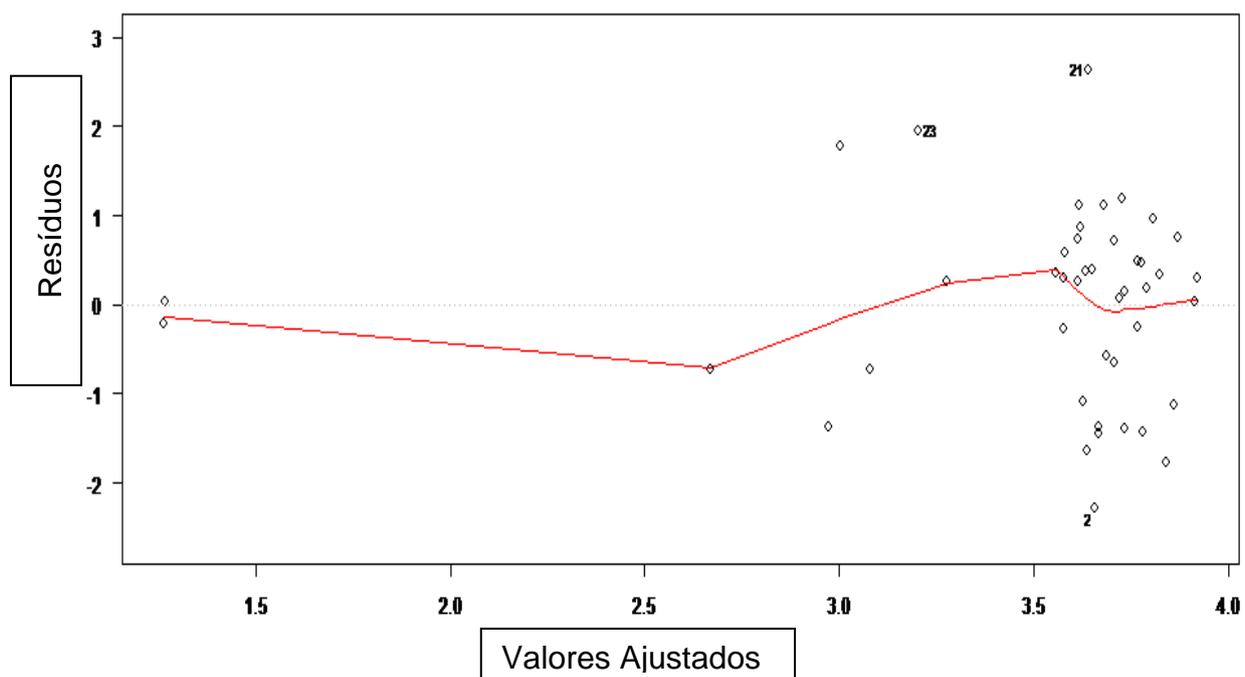


Gráfico 14 - Normalidade dos resíduos - kit 11 x kit 12

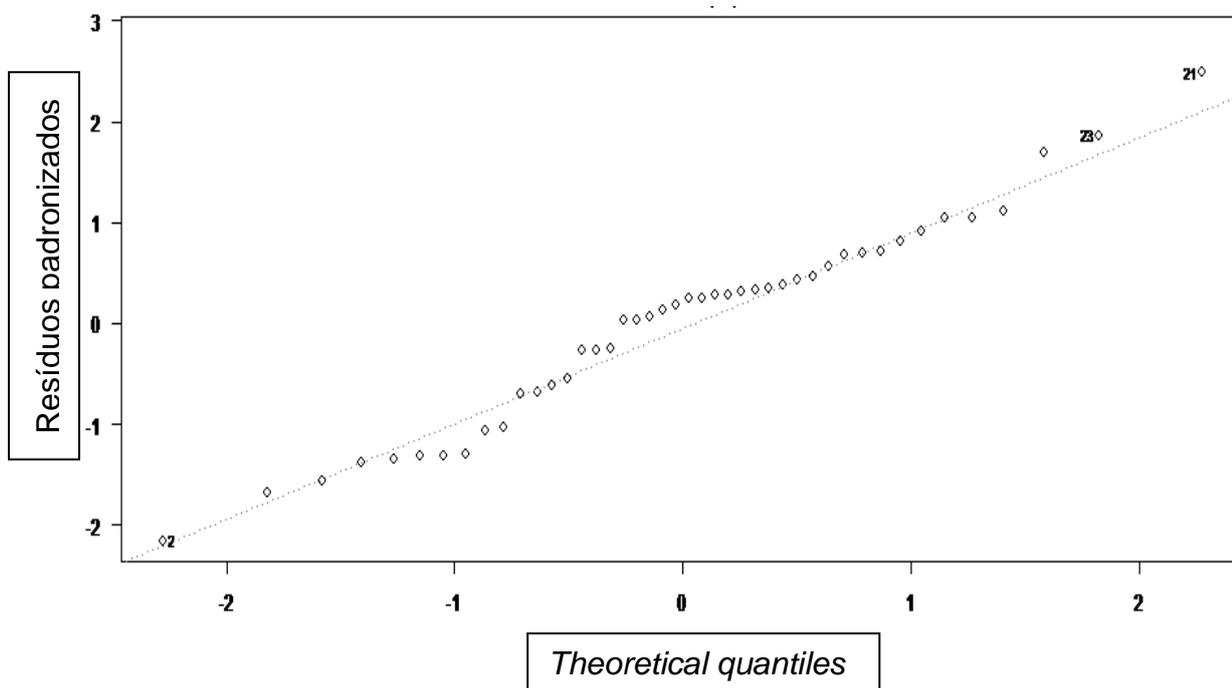


Gráfico 15 - Homocedasticidade das variâncias dos resíduos - kit 11 x kit 12

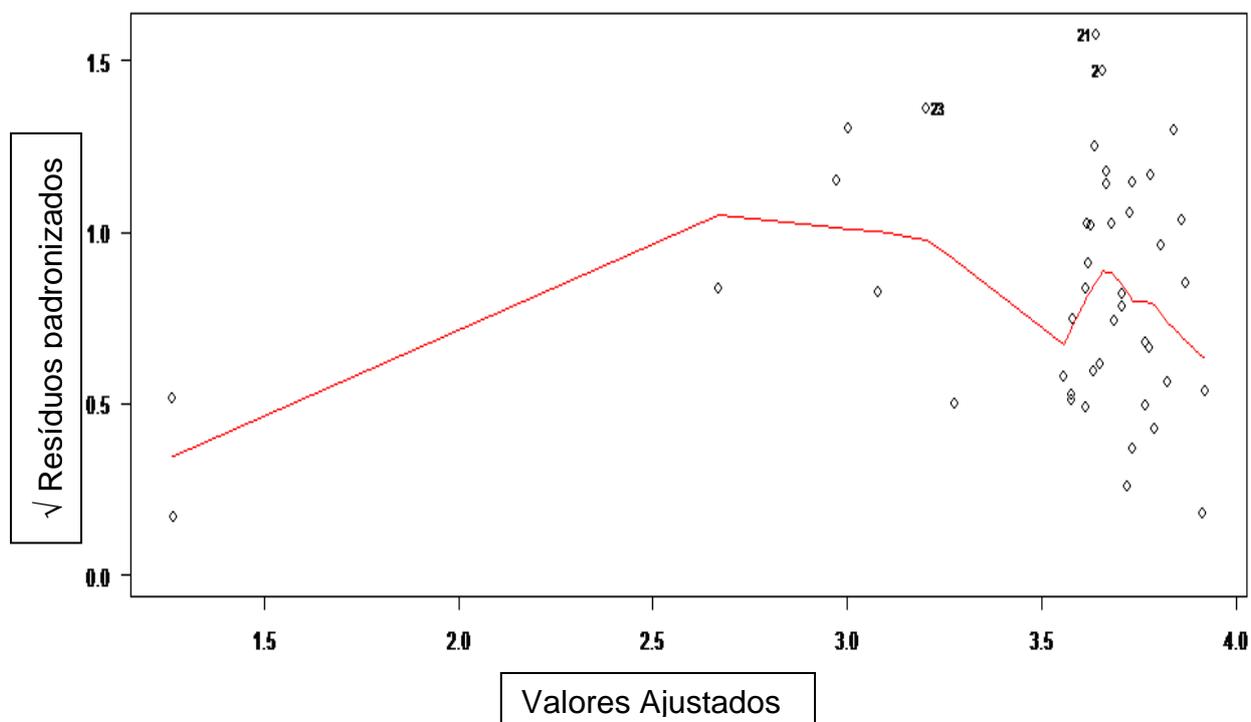
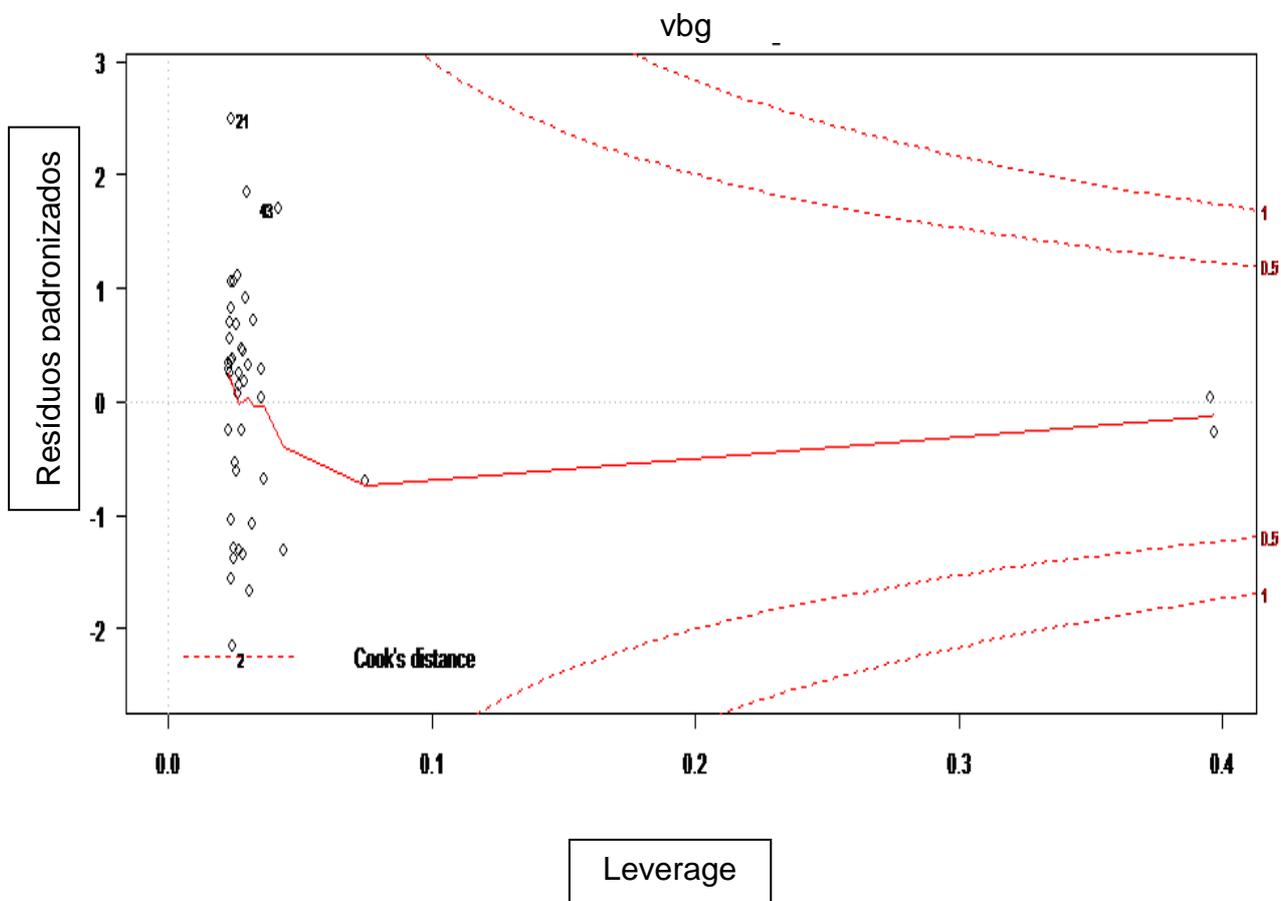
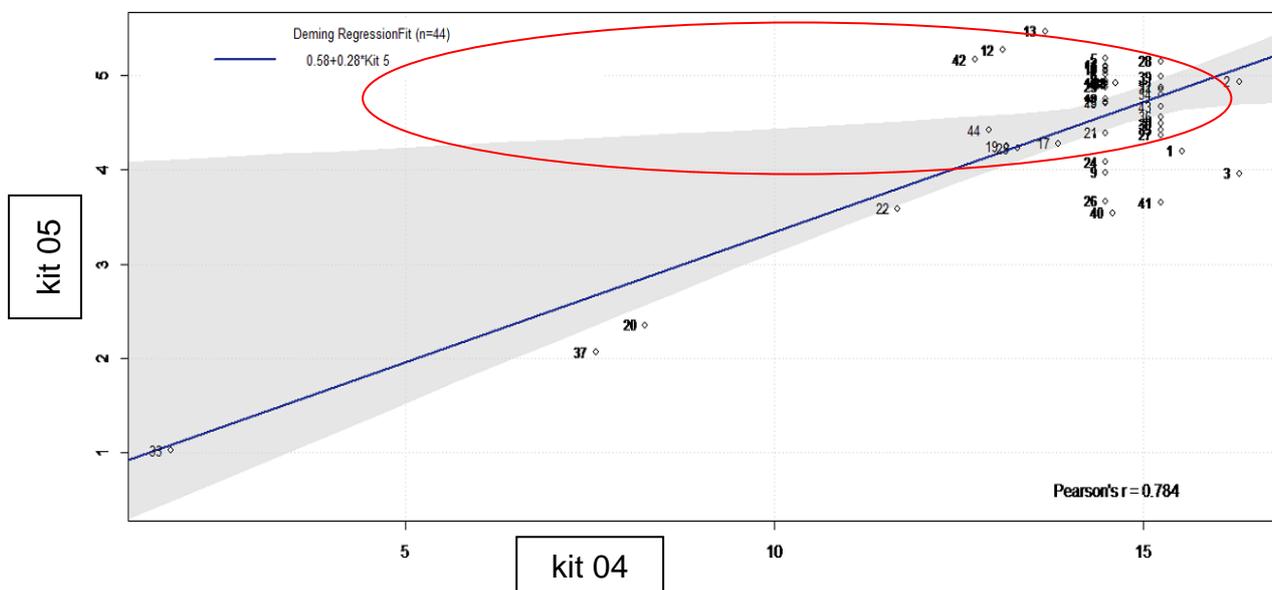


Gráfico 16 - Valores discrepantes (*out liers*) - *kit 11 x kit 12*

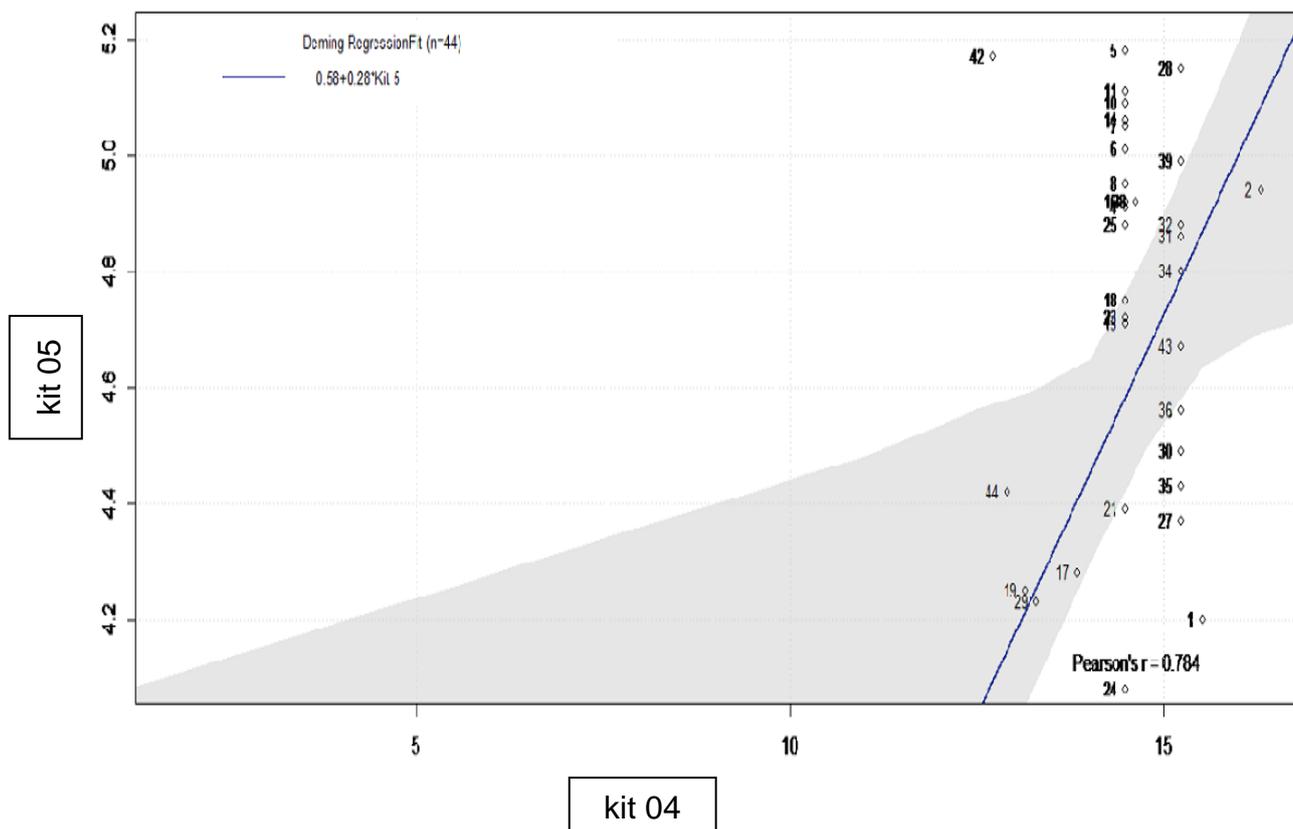
### Modelo de Regressão de Deming

Para os pares selecionados, *kit 04 x kit 05* e *kit 11 x kit 12*, ambos ensaios na metodologia ELISA, foi aplicado o modelo de Regressão Linear de Deming. O Gráfico 17 mostra as amostras que apresentaram grau de comutatividade com o referido ensaio.

Gráfico 17 - Regressão Linear de Deming para o par *kit 04* x *kit 05*

Com a finalidade de dar maior clareza na identificação das amostras no Gráfico 17, foi realizada expansão da área onde estas se concentraram, conforme Gráfico 18.

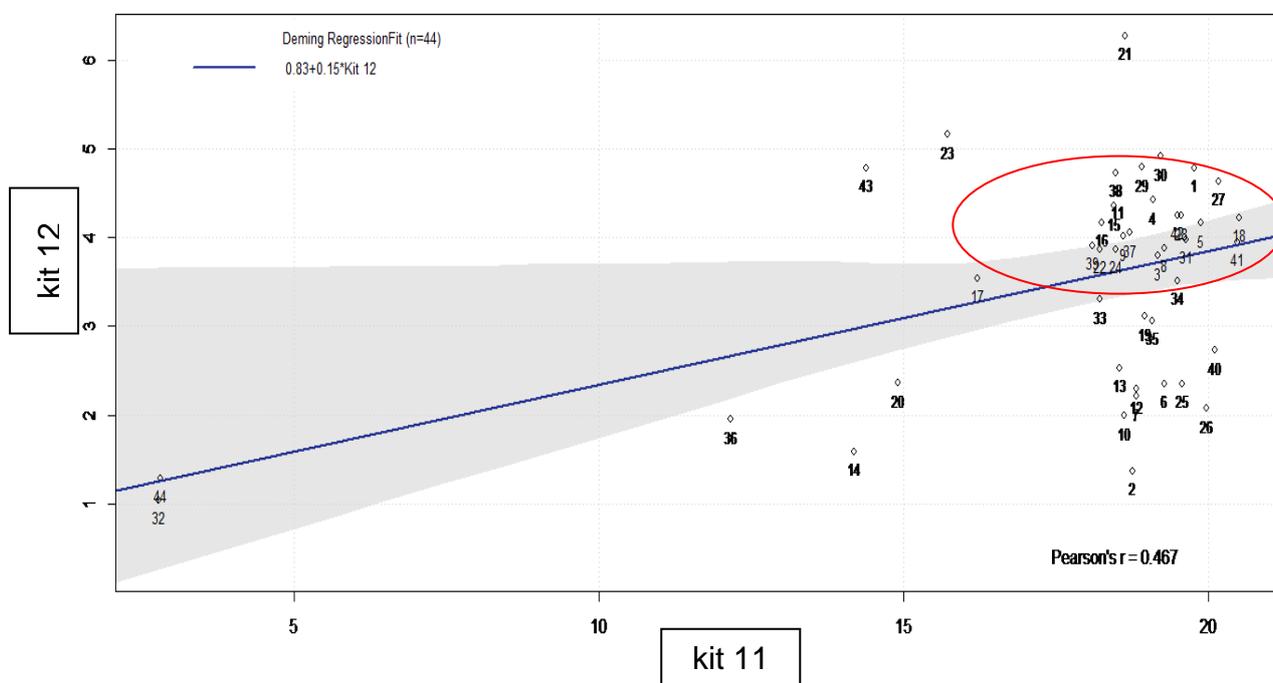
Gráfico 18 – Ampliação da área marcada no gráfico 17



As amostras, cujos resultados se encontram dentro dos limites previstos pelo intervalo de confiança (faixa azul), apresentam grau de comutatividade em relação ao método em questão. Neste pareamento, entre os *kits* 04 e 05, encontramos 12 amostras comutáveis: **2, 15, 17, 18, 19, 23, 29, 31, 32, 34, 43 e 44**

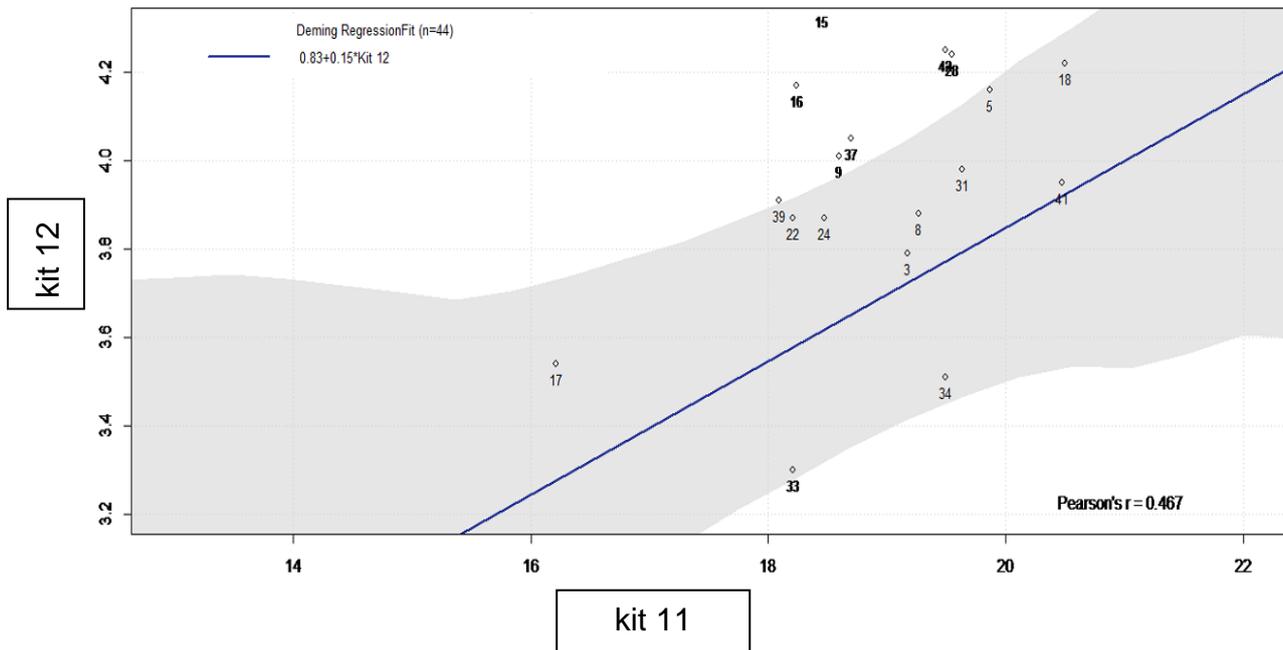
Para o outro par selecionado, *kit* 11 x *kit* 12, também, foi aplicado o modelo de Regressão Linear de Deming. O Gráfico 19 mostra as amostras que apresentaram grau de comutatividade com o ensaio usando a metodologia ELISA.

Gráfico 19 - Regressão Linear de Deming para o par *kit* 11 x *kit* 12



Da mesma forma que anteriormente, foi necessário fazer ampliação da área no Gráfico 19 para que as amostras que apresentaram grau de comutatividade fossem mais bem identificadas, conforme mostradas no Gráfico 20.

Gráfico 20 – Ampliação da área marcada no gráfico 19



As amostras, cujos resultados se encontram dentro dos limites previstos pelo intervalo de confiança (faixa azul), apresentam grau de comutatividade em relação ao método em questão. Neste pareamento entre os *kits* 11 e 12, foram encontradas 13 amostras comutáveis: 3, 5, 8, 17, 18, 22, 24, 31, 32, 33, 34, 41 e 44.

Com isso, confeccionamos o Painel Sorológico de Referência contendo amostras verdadeiro positivas para HCV, com resultados comutáveis, conforme Quadro 06.

Quadro 06 - Amostras verdadeiro positivas para HCV comutáveis

Kit 04 x kit 05	2	15	17	18	19	23	29	31	32	33	34	43	44
Kit 11 x kit 12	3	5	8	17	18	22	24	31	32	33	34	41	44

No total foram encontradas 19 amostras positivas comutáveis (2, 3, 5, 8, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 29, 31, 32, 33, 34, 41, 43 e 44), conforme quadro acima. As amostras evidenciadas em verde são comuns aos dois pares de *kits* (04x05 e 11x12), totalizando 7 amostras: 17, 18, 31, 32, 33, 34 e 44.

## 5 DISCUSSÃO

---

A realização deste trabalho teve como objetivo contribuir com as ações de Vigilância Sanitária propostas pelo LSH/DI/INCQS/FIOCRUZ, no que se refere a avaliação do grau de comutatividade de amostras de soro/plasma, que compõem o painel sorológico positivo de referência para controle da qualidade de kits para diagnóstico *in vitro* do HCV pelo LSH, com a finalidade de atender às demandas propostas pela ANVISA.

Os primeiros estudos envolvendo determinação da comutatividade, segundo Oliveira e Mendes (2010) tiveram início na década de 60, na química clínica, com a padronização das medidas do colesterol, devido à falta de comparabilidade nos resultados clínicos e epidemiológicos. No entanto, observamos que foram os estudos realizados por Fasce (1973) e Rej (1984) que demonstraram as propriedades de comutatividade dos MR quando comparadas com amostras clínicas autênticas, ou seja, amostras de pacientes, não processadas.

A determinação do grau de comutatividade é um processo importante na redução de viés nos ensaios, e podem causar grande impacto no tratamento diagnóstico sorológico de doenças. Poucos laboratórios no Brasil realizam esse procedimento, apesar de possibilitar melhorias no processo de gestão da qualidade, por garantir comparabilidade de resultados de testes realizados em diferentes metodologias.

Os dados obtidos neste trabalho se baseiam em resultados de ensaios retrospectivos de ELISA e quimioluminescência realizados no período 2009-2014.

O número inicial de amostras para avaliação, que atenderam aos critérios de aceitação estabelecidos, foi de 162 amostras positivas, sendo reduzidas para 44 amostras para procedermos à análise estatística. Observamos na Tabela 07, que as amostras de mesmo número apresentaram diferentes resultados de razão DO/CO nos 15 kits escolhidos. Este fato evidenciado neste trabalho, provavelmente, se deve a heterogeneidade e grande variabilidade de amostras biológicas, que Linnet (1998), descreve como "peptídeos e proteínas antigênicas como um problema para padronização de imunoenaios, por ex. ELISA e quimioluminescência, devido a heterogeneidade e complexidade dos fluídos biológicos".

Também, observou-se que as sensibilizações da fase sólida dos kits exercem grande influência nos resultados da razão DO/CO, fato, possivelmente, atribuído aos diferentes processos tecnológicos empregados pelos fabricantes dos kits. As amostras que compõem o painel sorológico positivo para HCV, para os kits escolhidos, apesar de a sensibilização ser baseada nas proteínas das regiões estrutural (core) e não estrutural (NS3, NS4 e NS5) do HCV, também, apresentam diferenças nos resultados da razão DO/CO.

Outro fator que gera interferência nos resultados dos ensaios é o efeito matriz, que está presente nos MR provenientes de amostras de plasma processadas, decorrentes do processo de estabilização das mesmas, por exemplo, o congelamento. Autores como Thienpont e colaboradores (2005), descobriram que o processamento de amostras clínicas de pacientes (autênticas) pode desestabilizar as ligações proteicas existentes no soro.

O efeito matriz, também, tem sido relacionado às possíveis causas de não comutatividade dos MR, fato relatado por autores como Vesper e colaboradores (2007). Este fator pode estar relacionado ao fato do painel sorológico de referência de amostras verdadeiro positivas conter apenas 19 amostras comutáveis para dois pares de kits, tendo iniciado com 44 amostras.

O grande número de métodos estudados, um total de 15, conforme proposto neste estudo, gerou, também, um grande número de pareamentos. Foram gerados 71 pares de *kits*, correspondendo a 69 pares para ELISA e 3 pares para quimioluminescência, resultando em uma mistura de amostras comutáveis e não comutáveis. A maioria destas, de acordo com Heath (apud WHO, 2013, p.7) gera dificuldades na interpretação e, este autor, cita que algumas deveriam ser tratadas por abordagens multivariadas para melhorar a avaliação, mas a interpretação desses resultados nem sempre é muito clara.

Não foi possível estabelecer o pareamento entre *kits* ELISA e quimioluminescência, devido ao fato da comutatividade ser uma característica método específica e, de acordo Vesper e colaboradores (2007), alguns MR são comutáveis para alguns procedimentos de medida, mas não comutáveis para outros.

Diversas metodologias vêm sendo utilizadas para determinar a comutatividade de MR. Neste trabalho foram seguidas as metodologias contidas nos guias elaborados pelo CLSI, sendo, portanto, amplamente utilizado pelos laboratórios clínicos, recomendado pelas agências regulatórias para fabricantes de *kits*. O guia em questão

utilizado foi o EP 14 - A3, que recomenda que a análise de dados seja realizada no modelo de regressão linear baseado no MMQO e no modelo de Regressão Linear de Deming.

Apesar do uso frequente do modelo de regressão linear baseado nos MMQO na avaliação do grau de comutatividade, este apresenta limitações porque assume que as variações só ocorrerão no eixo dos Y. Também, apresenta variância relativa constante e é afetado pela faixa e magnitude de valores numéricos, com poucos tendo influência desproporcional nos coeficientes estatísticos. O modelo de Regressão Linear de Deming aceita variação nos dois eixos, X e Y.

A aplicação das premissas propostas demonstrou que, dos 71 pareamentos entre *kits* realizados, apenas dois pares (04 x 05 e 11 x 12) apresentaram resultados que atendem aos critérios de aceitação propostos.

O modelo de Regressão Linear de Deming aplicado aos pares de kits escolhidos produziu resultados mostrados nos gráficos 16 e 18. Os gráficos mostram, que para a maioria das amostras foi observado uma forte influência do efeito matriz nas amostras, uma vez que o intervalo de confiança do coeficiente linear não continha a origem dos eixos, que é o zero.

Isto reforça a importância de inclusão de amostras clínicas de pacientes (autênticas) em comparação com amostras processadas na determinação de comutatividade em MR.

As dificuldades na obtenção das amostras clínicas de pacientes têm ocasionado limitações nas determinações de comutatividade

Como dito anteriormente, a principal atividade do LSH está baseada na análise prévia de *kits* para diagnóstico sorológico de marcadores biológicos, como HIV, Hepatites B e C, entre outros, uma exigência da Anvisa para concessão do registro para comercialização.

Na avaliação dos *kits*, são utilizadas amostras de plasma processado que compõem os painéis sorológicos positivos de referência. Isto mostra a importância do nosso trabalho, tendo em vista que os *kits* aprovados serão utilizados pela rede de laboratórios públicos e privados em amostras clínicas autênticas (pacientes) visando o diagnóstico de doenças.

É importante ressaltar a falta de publicações relacionadas à determinação do grau de comutatividade de amostras (MR) utilizadas no controle de qualidade de *kits* para diagnóstico, o que dificulta a discussão dos resultados obtidos.

## 6 CONCLUSÃO

---

Com base nos resultados da análise retrospectiva proposta neste trabalho, podemos concluir que utilizando este procedimento para avaliação da comutatividade, foi possível obter as **19 amostras** de plasma comutáveis (2, 3, 5, 8, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 29, 31, 32, 33, 34, 41, 43 e 44), que constituem o painel de referência estabelecido no LSH.

Para os dois pares de *kits* obtivemos 7 amostras comuns, que são 17,18, 31, 32,33, 34 e 44. Só foi possível estabelecer grau de comutatividade entre uma das metodologias escolhida, ELISA, podendo constituir um painel de amostras verdadeiro positivas comutáveis e usadas na análise prévia de *kits* para diagnóstico do HCV, requisito obrigatório para registro desses produtos.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

---

1. Incluir avaliação da variabilidade intra métodos;
2. Avaliação do grau de comutatividade das amostras que compõem o painel sorológico positivo para outros marcadores biológicos, como instrumento para a melhoria da qualidade dos resultados;
3. Introduzir, se possível, nas avaliações futuras do grau de comutatividade dos MR que compõem o painel sorológico positivo, a comparação com amostras clínicas de pacientes, devido ao fato delas apresentarem reduzido efeito matriz, considerado um elemento que pode causar interferência nos resultados das análises. A falta de comparação entre amostras clínicas processadas e amostras clínicas de pacientes, constitui-se uma das principais limitações nos estudos realizados para estabelecimento de MR;
4. Estabelecer e validar procedimentos para minimizar o efeito matriz e, conseqüentemente, a não comutatividade nas amostras de plasma congeladas (amostras processadas), utilizando as recomendações contidas no guia do CLSI - C37-A, quanto à preparação cuidadosa do material, a fim de evitar aglomerados de fibrina após o descongelamento.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ADCOCK, R.J. A Problem in Least Square. **The Analyst**. Detroit (MI), V.5, n.2, p.53-54, mar.1878. Disponível em: [http://www.jstor.org/stable/2635646?origin=crossref&seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/2635646?origin=crossref&seq=1#page_scan_tab_contents). Acesso em: 25 janeiro 2016.

ARMBRUSTE, D.; MILLER, R.R. The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A Global Approach to Promote the Standardization of Clinical Laboratory Test Results. *Clinical Biochemistry Review*. Bethesda (MD), vol. 28, n. 3, p. 105-114, Aug. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1994110/>. Acesso em: 17 abril 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 9001**: Sistemas de Gestão da Qualidade. Rio de Janeiro, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 34:2012**: Requisitos gerais para a competência de produtores de materiais de referência. Rio de Janeiro, 2012.

BARTENSCHAGER, J.; LOHMANN, V. Replication of Hepatitis C Virus. **Journal of General Virology**, v.81, p. 1631-1648, 2000.

BORDIN, J.O; JÚNIOR, D.M.L.; COVAS, D.T. **Hemoterapia: Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

BRANDÃO, A.B.M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington (DC), v. 9, n. 3, p. 161-68, mar. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA nº 6360 de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set.1976. Seção 1, p. 12647. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 20 março 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 12 de dezembro de 1993, Seção 1.

BRASIL. 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 cancelamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de novembro de 2006, Seção 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b1295e00499991ce90dab66dcbd9c63c/RESOLU%C3%87%C3%83O+ANVISA+RDC+N%C2%BA+206-06+REGISTRO+DE+PRODUTOS+IN+VITRO.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 fevereiro 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília, DF, julho 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 2.712, de 12 de novembro de 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de novembro de 2013, Seção 1, p. 106. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt2712\\_12\\_11\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt2712_12_11_2013.html). Acesso em: 20 março 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 34, de 11 de junho de 2014. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de junho de 2014, Seção 1, p. 113. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f613c5804492c25a9989db281231adba/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+342014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 março 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 27 junho 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico in vitro, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. **Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 27 de agosto de 2015, Seção 1, p.43 (2015a). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/areas/coges/legislacao/2015/RDC\\_36\\_2015.pdf](http://www.anvisa.gov.br/areas/coges/legislacao/2015/RDC_36_2015.pdf). Acesso em: 15 dezembro 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 27 junho 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Ampliação do tempo de tratamento HCV – Genótipo 3 com Cirrose, para 24 semanas. **Relatório de Recomendação nº 265**. Brasília: Ministério da Saúde, abr. 2017.

BUKH, J.; MILLER, R. H.; PURCELL, R. H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Seminars in Liver Disease**. [S.l.], v. 15, n. 1, p. 41- 63, 1995.

CARROBENE, A.; GUERRA, E.; CERIOTTI, F. A mechanism-based way to evaluate commutability of control materials for enzymatic measurements. The example of gamma-glutamyltransferase. **Chimica Clinica Acta**, Milano, v.424, p.153-158, 18 jun 2013. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim). Acesso em: 20 setembro 2015.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J.M. Hepatitis C Virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World Journal Gastroenterology**, v. 13, n.17, p.2461-66, may, 2007.

CHOO, Quin-Lin. et al. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. **Science**, Washington (DC), v. 244, n. 4902, p. 359-69, apr. 1989.

CHUAN-MO Lee, M.D et al. Hepatitis C Virus Genotypes: Clinical Relevance and Therapeutic Implications. **Chang Gung Medical Journal**, v.31, n.1, p.16-24, fev, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **EP 30-A: Characterization and Qualification of Commutable Reference Material for Laboratory Medicine; Approved Guideline - Third Edition**. Wayne (PA), 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **EP 14-A3: Evaluation of Commutability of Processed Samples; Approved Guideline - Third Edition**. Wayne (PA), 2014.

COELHO, H.C. **Presença dos vírus HBC e HCV e seus fatores de risco nos presidiários masculinos na Penitenciária de Ribeirão Preto**. 2008. 121 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CROSBY, P. B. **Qualidade é investimento**, São Paulo: José Olympo, 1994.

DEMING, W. E. *Statistical Adjustment of Data*. Reprint of 1943, Ed. Wiley, New York: Dover, 1964.

DIRECTIVE 98/79/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. *in vitro* diagnostic medical devices. **Journal of European Community**, 27 October 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0079&from=EN>. Acesso em: 16 fevereiro 2016.

DUBUISSON, J. Hepatitis C Virus proteins. **World Journal Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p.2406-2415, may, 2007. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2406.asp>>. Acesso em: 30 março 2015.

FASCE JR. C.F.; REJ R.; COPELAND W.H.;VANDERLINDE R.L. A discussion of enzyme reference materials: applications and specifications. **Clinical Chemistry**, v.19, n.1, p. 5–9, jan. 1973. Disponível em: <http://www.clinchem.org/content/19/1/5.full.pdf+html>. Acesso em: 28 dezembro 2015

FEIGENBAUM, A. V. Controle da Qualidade Total - Estratégias Para o Gerenciamento e Tecnologia da Qualidade. Makron, 4ª ed., 1994.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-ímmunes**, 2º edição Guanabara Koogan, 2001.

FIVEPHOTON. ELISA Kits Cell Biology. Disponível em: [http://fivephoton.com/index.php?route=product/product&product\\_id=138](http://fivephoton.com/index.php?route=product/product&product_id=138). Acesso em: 21 abril 2015.

GADELHA, Carlos et. al. **Saúde e Inovação: Uma Abordagem Sistêmica das Indústrias da Saúde**. Rio de Janeiro, 2002.

GAILBRAITH, J. W. et al. Unrecognized Chronic Hepatitis C Virus Infection among Baby Boomers in the Emergency Department. **Hepatology**, [S.l.], v. 61, n. 3, p. 776-82, 2015.

GONÇALES, N.S.L. **Hepatite C em doadores de sangue: diagnóstico por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase e sua correlação com os testes imunoenzimático e “immunoblot” recombinante**. Campinas: UNICAMP,

1997. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Curso de Pós-Graduação em Anatomia Patológica. Campinas.

HEATH, A. **Statistical Approaches to Assessing Commutability**. Apud: OMS. World Health Organization (WHO). EXPERT Committee on Biological Standardization. WHO Consultation on Commutability of WHO Biological Reference Preparations for *In Vitro* Detection of Infectious Markers. WHO/BS/2013.2230 Addendum 1, p.7-8 Geneva, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes**. São Paulo, 2011. Disponível em: [http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/pd/pd1\\_manual\\_sangue.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/pd/pd1_manual_sangue.pdf). Acesso em: 27 abril 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **POP 65.3420.013**: Cadastro, Distribuição e Armazenamento de Plasma para Confecção de Painéis Sorológicos, Revisão 04, Rio de Janeiro, 2012, 05 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **65.0001.002**: Manual da Organização, Revisão 16, Rio de Janeiro, 2015, 65 p. Disponível em: [https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?view=download&alias=1127-65-1000-002-rev-15-1&category\\_slug=pops-1&option=com\\_docman&Itemid=112](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?view=download&alias=1127-65-1000-002-rev-15-1&category_slug=pops-1&option=com_docman&Itemid=112). Acesso em: 15 dezembro 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). Página da INTERNET. 2015a. Análises. Disponível em: [https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=84&Itemid=92](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84&Itemid=92). Acesso em: 15 dezembro 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **Laboratório de Sangue e Hemoderivados**. Documento Interno: Cadastro de Cadastro de Plasma, 2015b.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy**. 2014. Disponível em: [http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?tax\\_node\\_id=20093616&taxa\\_name=Hepatitis%20C%20virus](http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?tax_node_id=20093616&taxa_name=Hepatitis%20C%20virus). Acesso em: 15 abril 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 17511:2003**. In vitro diagnostic medical devices—measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva, Switzerland: ISO, 2003.

JENKS, P.J.; HAMMOND, J. Quality Matters - Into the future: changes to ISO 17025 and ISO Guide 34. **SPECTROSCOPYEUROPE**, v.26, n.5, oct. 2014. Disponível em: [www.spectroscopyeurope.com](http://www.spectroscopyeurope.com). Acesso em: 25 setembro 2015.

JENKS, P.J.; NICHOLS, A.W. Quality Matters - BERN 14: it's that time again! **SPECTROSCOPYEUROPE**, v.27, n. 3, 17 jun 2015. Disponível em: [www.spectroscopyeurope.com](http://www.spectroscopyeurope.com). Acesso em: 25 setembro 2015.

JOINT COMMITTEE FOR TRACEABILITY IN LABORATORY MEDICINE (JCTLM). **Quality Control Manual**. 2011. Disponível em: <http://www.bipm.org/en/committees/cc/wg/jctlm-wg1.html>. Acesso em: 24 setembro 2015.

KOOPMANS, T.C. *Linear regression analysis of economic time series* (Netherlands Economic Institute, Haalen (NL),1937). In: HENDRY, D.F.; MORGAN, M.S. (Org.). **The Foundation of Econometrics Analysis**, Cambridge University Press, West Nyack (NY), cap. 24, p.274-291. Disponível em: <http://ebooks.cambridge.org/chapter.jsf?bid=CBO9781139170116&cid=CBO9781139170116A037>. Acesso em: 25 janeiro 2016.

KUMMELL, C.H. REDUCTION OF OBSERVATION EQUATIONS WICH CONTAIN MORE TAN ONE OBSERVED QUANTITY. **The Analyst**. Detroit (MI), V.6, n.4, p. 97-105, jul.1879. Disponível em: [http://www.jstor.org/stable/2635646?origin=crossref&seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/2635646?origin=crossref&seq=1#page_scan_tab_contents). Acesso em: 25 janeiro 2016.

LABORATÓRIO DE SANGUE E HEMODERIVADOS (LSH). Registro em documentos internos. 2015.

LAVANCHY, D. Evolving Epidemiology of Hepatitis C Virus. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 107-15, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x>>. Acesso em: 27 julho 2017.

LAVANCHY, D. The Global Burden of Hepatitis C. **Liver International**, [S.l.], v. 29, Suppl. 1, p. 74-81, 2009.

LINNET, K. Evaluation of Regression Procedures for Methods Comparison Studies. **Clinical Chemistry**. V. 39, N.3, p. 424-432, Março 1993.

LINNET, K. Performance of Deming regression analysis in case of misspecified analytical error ratio in method comparison studies. **Clinical Chemistry**. Nº 44, V.5, p. 1024–1031, 1998.

LYRA, A.C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A.M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, Ribeirão Preto (SP), v. 37, n. 5, p. 691-695, maio, 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjmb/v37n5/5291.pdf>>. Acesso em: 30 março 2015.

MADEJ, R. M. et al. International Standards and Reference Materials for Quantitative Molecular Infectious Disease Testing. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda (MD), v. 12, n. 2, p. 133-143, março 2010.

MAGIORKINIS, G. et al. The Global Spread of Hepatitis C Virus 1a and 1b: A Phylodynamic and Phylogeographic Analysis. **PLoS Med**, v.6, n.12, dez,2009. Disponível em: <<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000198>>. Acesso em: 28 março 2015.

MALUF, C. B.; SILVA, I. O.; VIDIGAL, P. G. Avaliando a comutatividade: importante requisito da qualidade para laboratórios clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 6, p. 595-601, 2011.

MARWAHA, N.; SACHDEV, S. Current Testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. **World Journal of Gastroenterology**. Bethesda (MD). v. 20, n. 11, p. 2948-54, mar. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3961983/>. Acesso em: 18 janeiro 2016.

MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares with Pestviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington (DC), v. 87, n. 6, p. 2057-61, mar.1990.

MILLER, W.G. Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. **Clin Chim Acta** 2003; 327:25–37.

MILLER, W.G.; MYERS, G.L.; REJ, R. Why commutability matters. **Clinical Chemistry**, Washington (DC), v. 52, n. 4, p. 553–54, apr. 2006.

MILLER, W. G. et al. Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures. **Clinical Chemistry**, Washington (DC), v. 57, n. 8, p. 1108-17, may 2011.

MILLER, W.G.; MYERS, G.L. Commutability still matters. **Clinical Chemistry**, Washington (DC), v. 59, n. 9, p. 1291-1293, jun. 2013.

MILLER, W.G. et al. Harmonization: the Sample, the Measurement, and the Report. Review Article. General Laboratory Medicine. **Annals of Laboratory Medicine**, v.34, p.187-197, mar. 2014. Disponível em: [www.annlabmed.org](http://www.annlabmed.org). Acesso em:

OLIVEIRA, C.A.; MENDES, M.E. Gestão da Fase Analítica do Laboratório como assegurar a qualidade na prática. Volume I, 1ª Edição Digital, Controlab 2010. Disponível em: [http://www.controllab.com.br/pdf/gestao\\_fase\\_analitica\\_vol1.pdf](http://www.controllab.com.br/pdf/gestao_fase_analitica_vol1.pdf). Acesso em: 31 março 2015.

OLIVEIRA, F.M. et al. Projeto de Extensão “Faça as mãos, faça os pés: embeleze com segurança”. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, Aracaju (SE), v.5, n.2, p.61-68, jul – dez. 2014

OLIVEIRA, C.C. et al. Comutatividade de materiais de referência. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, v.23, n.1, :46-47, 2013.

OMS. World Health Organization (WHO). [WHO Expert Committee on Biological Standardization](#). **Collaborative study for the calibration and commutability assessment of the proposed 1st international standard for diphtheria antitoxin human**. WHO\_BS\_2012.2192. Geneva, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/96607#sthash.ORwE715e.dpuf>. Acesso em: 10 abril 2015.

OMS. World Health Organization (WHO). [WHO Expert Committee on Biological Standardization](#). **Collaborative study to establish the first WHO international standard for detection of hepatitis C virus Core Antigen**. WHO/BS/2014.2247. Geneva, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/137477#sthash.nwhGksHJ.dpuf>. Acesso em: 10 abril 2015.

OMS. World Health Organization (WHO). WHO Collaborating Centre for Quality Assurance of Blood Products and in vitro Diagnostic Devices. Collaborating centre annual Report - **Report Year from 07-2013 to 07-2014**. 2014a. Disponível em: [www.who-collaborating-centre-annual-report-2014.pdf](http://www.who-collaborating-centre-annual-report-2014.pdf). Acesso em: 08 abril 2015.

PLAILLY, P. Science Photo Library. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/media/274030/view> . Acesso em: 2 outubro 2015.

POZZOBON, R.C.R; BECK, S.T; CECCIM, A.D.F. Desempenho de um método para detecção simultânea de antígenos e anticorpos para o vírus da Hepatite C em doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 1, p. 003-006, 2011. Disponível em: < [http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_43\\_01/rbac\\_43\\_01\\_01.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_43_01/rbac_43_01_01.pdf)>. Acesso em: 30 março 2015.

QUIS. Qualidade Industrial e Serviços 2012. Disponível em: <http://www.qis.pt/index.php?id=162>. Acesso em: 31 janeiro 2016

REJ R.; JENNY R.W.; BRETAUDIÈRE J.P. Quality control in clinical chemistry: characterization of reference materials. **Talanta**, v.31, n.10B, p. 851–862, oct. 1984. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039914084802143>. Acesso em: 28 dezembro 2015.

ROTH, C. W. **Qualidade e Produtividade**. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011, 73p.

RODRIGUES, P.I.S. **Proposta de Abordagem para Gestão de Ocorrências em Serviços de Sangue**. 2013. 76p. Dissertação (Mestrado em Organização e Qualidade em Laboratório de Análises Clínicas) - Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2013.

RYAN, K.J.; RAY, C.G. (editors). **Hepatitis C**. Sherris Medical Microbiology. 4<sup>a</sup> ed. [S.l.]: McGraw Hill, 2004, p. 551–2.

SECKO, D. Culturing Hepatitis C. **The Scientist**, oct. 2006. Disponível em: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/24336/title/Culturing-Hepatitis-C/>. Acesso em: 20 abril 2015.

SETO, W.W.et al. Natural History of Chronic Hepatitis C: Genotype 1 versus Genotype 6. **Journal of Hepatology**, v.53, n.3, p.444-448, set, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827810004563>>. Acesso em: 20 fevereiro 2015.

SILVA, K.L.T. **Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em doadores de sangue do estado do Amazonas**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-25062009-092024/fr.php>>. Acesso em: 01 abril 2015.

SINK, D. S.; TUTTLE, T. C. Planejamento e medição para a performance. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1993.

STEINMANN, E. et al. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. **PLoS Pathog**, Beijing (CH), v.3, n.7, july, 2007. Disponível em: < <http://www.plospathogens.org>>. Acesso em: 28 março 2015.

The R-Project for Statistical Computing. **R version 3.1.3 (Smooth Sidewalk)**, 03 sept. 2015. Disponível em: <https://www.r-project.org/about.html>. Acesso em: 25 janeiro 2016.

THIENPONT, L.M. et al. Feasibility study of human sera in split-sample comparison of immunoassays with candidate reference measurement procedures for total thyroxine and total triiodothyronine measurements. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 2303-11, 2005.

VESPER, H.W; MILLER, W.G; MYERS,G.L. Reference Materials and Commutability. **Clinical Biochemistry Review**, Bethesda, v. 28, n. 4, p.139-147, Nov. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/314/> Acesso em: 09 abril 2015.

VILLANO, S. A. et al. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. **Hepatology**, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 908-4, 1999.

ZEGERS, Ingrid et al. The importance of commutability of reference materials used as calibrators: the example of ceruloplasmin. **Clinical Chemistry**, Washington (DC), v. 59, n.9, p. 1322–29, sep. 2013.

ZEIN, N.N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.2, p.223-235, apr.2000.

## ANEXO A – REGISTRO DOS RESULTADOS CORRESPONDENTES ÀS 130 AMOSTRAS

Sensibilização		core, NS3, NS4, NSS	core, NS3, NS4 e NSS													
		L.A. 510_09	L.A. 780_09	L.A. 861_09	L.A. 1923_09	L.A. 4271_09	L.A. 525_11	L.A. 1706_11	L.A. 1914_11	L.A. 4170_11	L.A. 3321_12	L.A. 2326_14	L.A. 2475_14	L.A. 1603_12	L.A. 2623_12	L.A. 3947_12
		kit 1	kit 2	kit 3	kit 4	kit 5	kit 6	kit 7	kit 8	kit 9	kit 10	kit 11	kit 12	kit 13	kit 14	kit 15
AMOSTRA	AMOSTRA	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO	RATIO									
LID 01		3,95	5,99	2,46	16,3	4,58			5,85	21,43	8	18,55	2,66	8,18	11	87,27
LID 05		3,95	2,16	3,71	14,03	4,11	27,42	4,29	4,89	20,43						40,94
LID 06		3,95	4,81	3,61	16,3	4,82	27,67	4,29	4,89	20,43		19,08	5,21			100,69
LID 07		SR	4,95	3,48	15,68	4,25					8	18,91	3,97		11	50,79
LID 08		3,95	4,47	3,4	16,3	5,19	28,3		5,82	20,43			19,66	4,8	8,85	77,68
LID 09		3,95	3,03	2,19	12,35	3,08	21,75	4,29	3,74	7,93	1,49	14,85	3,37			11,46
LID 10		SR	2,65	SR	2,54	2,67	22,81	4,29	4,89	7,12		5,69	3,5			12,54
LID 19		3,95	4,83	3,88	16,3	5,12	28,3				8			10,34	11	
LID 22	1	3,95	5,22	2,46	15,52	4,2	26,28	4,29	4,89	21,43	8	19,76	4,78	6,73	11	52,59
LID 23		3,95	5,52	1,32	15,52	4,09	25,88	4,29	4,89	21,43	8	19,08	4,24		11	
LID 27		3,95	4,56	3,81	15,78	4,43	26,7	4,29	4,89	21,43	8				11	
LID 28		3,95	3,82	3,36	16,3	4,55	26,77	4,29	4,89	21,43						132,59
LID 30		3,95	4,97	2,94	16,3	4,85	26,9	4,29	4,89	21,43		19,24	4,68	8,35		
LID 32		3,95	5,05	1,35	16,3	5,11	28,3	4,29	4,89	21,43	4,23	19,36	2,21	8,05		122,4
LID 34		3,95	3,24	3,81	16,3	4,38	23,54	4,29	4,89	21,43		17,27	3,22			60,65
LID 35		3,95	4,29	4,28	16,3	4,92	27,44	4,29	4,89	21,43	4,2	16,74	2,33	10,2		101,27
LID 38		3,95	5,09	3,44	16,3	4,86	26,7	4,29	4,89	21,43	4,78	1,47				119,49
LID 44		3,95	4,92	4,47	16,3	4,93	26,71			21,43	8	16,75	4,64	8,18	11	
LID 48	2	3,95	5,56	3,78	16,3	4,94	26,71	4,29	4,89	21,43	8	18,76	1,37	11,05	11	97,2
LID 49	3	3,95	5,7	1,9	16,3	3,96	28,3	4,29	4,89	21,43	8	19,17	3,79	9,4	11	74,38
LID 50	4	3,95	6,59	1	14,49	4,91	28,3	4,29	4,89	20,46	8	19,09	4,42	9,72	11	76,07
LID 51	5	3,95	5,11	4,62	14,49	5,18	27,46	4,29	4,89	21,43	8	19,87	4,16	8,34	11	132,09
LID 53		3,95	4,77	4,16	13,52	4,9	27,25	4,29	4,89	18,25	8	19,37	3,77	9,55		98,77
LID 54	6	3,95	4,75	4,31	14,49	5,01	28,3	4,29	4,89	21,43	8	19,27	2,35	6,7	11	115,23
LID 55		3,95	4,63	4,48	14,49	5,45	23,33	4,29	4,89	21,43	8	19,28	2,25	10,08	11	
LID 56	7	3,95	5,19	4,29	14,49	5,05	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,82	2,21	9,56	11	121,98
LID 57		3,95	4,43	2,91	12,86	3,94	22,64	4,29	4,89	12,17	8	2,65		8,1	11	34,61
LID 60		3,95	1,76	2,94	14,49	5,25	24,34	4,29	4,89	21,43	5,76			7,17		110,06
LID 61		3,95	4,62	3,55	14,49	4,97	24,58	4,29	4,89		8	19,46	3,84	9,53	11	87,79
LID 64	8	3,95	5,26	3,8	14,49	4,95	26,15	4,29	4,89	21,43	8	19,27	3,88	10,36	11	82,49
2164	9	3,95	5,89	2,78	14,49	3,97	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,6	4,01	10,84	11	102,78
2279		3,95	SR	1,58	14,49	4,18	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,63	1,73	8,35	11	
2293		3,95	1,26	1,36	14,49	SR	19,69	4,29	3,75	9,33	4,42	14,26	3,04	1,68	2,79	
2447		3,95	4,84	3,05	13,04	4,94	24,96	4,29	4,89	19,27	8	18,85	2,37	10,31	11	
2448	10	3,95	4,71	3,37	14,49	5,09	26,82	4,29	4,89	21,43	8	18,62	1,99	7,96	11	90,38
2450		3,95	4,39	SR	SR	SR	26,81	4,29	4,89	21,43	8	18,42	3,77	10,56	11	98,44
2481			6,74	4,37	14,49		28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,67	4,31	8,45	11	108,72
2483			5,35	3,87	11,6		28,3	4,29	4,89	8,01	8	18,77	2,44	9,19	11	105,03
2487			5,96	1,84	14,49		28,3	4,29	4,89	21,43	8	16,38		7,09	11	43,29
2488		3,95	4,91	3,99	13,53		26,15	4,29	4,89	21,43		17,76	2,25		11	73,12
2786		3,95	4,61	3,24	14,49	4,74	22,77	4,29	4,89	18,6	8			8,2	11	80,78
2885		3,95	5,55	4,15	14,49		28,3	4,29	4,89		8	19,1	3,85	8,78	11	111,7
2888		3,95	3,01	2,79	3,71	2,69	28,3	4,29	4,58	17,54	5,08	15,04	4,3	5,26		115,85
2981		3,95	2,2	1,69	13,49	1,31	10,31	3,9		6,54	3,27			2,01	3,53	2,68

3015		3,95	3,64	1,66	14,49		17,51	4,16	1,56	8,72	6,16	7,87		3,91	11	3,66
3031	11	3,95	4,62	3,19	14,49	5,11	26,73	4,29	4,89	21,43	8	18,51	4,49	10,02	11	114,9
3036		3,95	5,87	3,04	11,97	5,24	28,3	4,29	4,89		8	20,43	4,47		11	117,88
3122	12	3,95	5,75	4,34	13,09	5,27	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,82	2,29	8,92	11	96,71
3173	13	3,95	4,74	1,91	13,67	5,47	28,3	4,29	4,89	21,43	8	18,54	2,53	7,71	11	113,82
3174	14	3,95	4,42	2,74	14,49	5,06	28,3	4,29	4,89	21,43	8	14,18	1,59	9,83	11	112,95
3185		3,95	5,55	2,45	11,12	4,86		4,29	4,89	21,43		18,64	3	8,75	11	58,61
3313		3,68	3,59	3,66	14,49	2,5	18,19	1,46		12,06	1,98	1,11		3,28	1,59	1,97
3343		3,95	2,07		14,49		10,15	3,05	2,03		3			7,08	9,54	3,13
3350			5,16		14,49	4,74	27,52		7,28	21,43	8	17,77	2,24	10,01	11	107,76
3373	15	3,95	4,49	5,26	14,49	4,71	26,74	4,29	7,28	21,43	8	18,45	4,35	7,55	11	93,41
3388	16	3,95	4,42	4,73	14,49	4,92	27,52	4,29	7,28	21,43	8	18,24	4,17	9,98	11	109,08
3492		3,95	4,35	4,41	14,49	4,78	27,52	4,29	7,28	21,43		18,49	2,32	9,16	11	
3504		3,95	5,11	4,07	14,49	4,97				21,43	8	18,46	2,3	10,25		
3505		4,00	4,52	2,72	3,21	4,66	27,02	4,29	7,28	21,43	8	18,09	1,86	9,08	11	
3751		4,00	5,09	1,94	5,19	4,13	27,52	4,33	4,8	21,43	8,22	18,34	3,04	8,66	11	
3755		2,52	1,86		14,49	1,14	11,83	4,03	2,22	4,76	6,64	2,15		2,01	2,52	1,38
3756		1,12	1,36		5,07		7,2	4,33		2,06	3,04	1,9		1,21	2,71	3,14
3757		4,00	3,93	4,6	4,26	4,61	25,65		7,28	21,43	8,22	19,1	5,86	10,08	11	94,81
3760		2,99	1,82	3,38	3,53		13,26	2,04	1,06	3,48	6,56	5,17	1,06	3,05	2,52	1,99
3777		1,62	1,79	1,45	14,49		10,27	2,28		4,46	4,38	9,7	1,62			2,31
3779		4,00	5,98	3,4	3,13	4,59	27,52	4,33	7,28	21,43	8,22	18,96	2,54		11	
3782		1,39	1,67		14,49		10,89	1,71	1,35	1,4	3,72	5,78		10,56	1,02	1,21
3785		2,51	2,27		14,49	1,18	2,17	3,38		1,77	4,44	6,93		1,71		1,85
3788		4,00	4,83		11,44	3,94	27,52	4,33	6,19	21,43	8,22	17,67	5,62	7,56	11	92,06
3797		1,86	1,87		14,49	4,74	27,52	4,33	6,42	21,43	8,22	20,02	5,9		6,56	129,98
3799		4,00	2,65	3,7	14,49	2,02	23,38	4,33		14,96	8,22	14,63	2,23	2,85	2,48	18,39
3800	17	4,00	4,42	4,54	13,85	4,28	26,82	4,33	6,85	21,43	8,22	16,21	3,54	7,03	11	69,64
4281		4,00	4,37	4,41	14,49	4,44	26,79			21,43	8,22	20,25	4,32	8,49	11	
4299		4,00	5,31	3,33	14,49	4,61	26,73	4,33	7,28	21,43	8,22			6,47	11	69,13
4303	18	4,00	4,6	1,98	14,49	4,75	26,49	4,33	5,82	21,43	8,22	20,5	4,22	9,92	11	152,57
4306		4,00	5,07			2,52	27,52	4,33	5,39	21,43	8,22	20,36	3,73	9,93		85,87
4308		4,00	3,37		13,37		27,52	4,33	3,84	14,73	8,22	11,55	3,43	3,66	11	8,87
4311		4,00	4,72		14,49	4,38	27,52	4,33	6,25	21,43	8,22	20,49	4,51	8,87	11	106,33
4315	19	4,00	4,1	3,98	13,15	4,25	26,68	4,33	6,96	21,43	8,22	18,96	3,11	8,97	11	80,25
4325		4,00	3,68	1,22	1,97		27,52	4,33	6,82		4,67	18,8	5,45	9,28		113,25
4331		4,00	4,4	3,9	14,49	4,81	27,52		3,98	21,43	8,22	19,79	4,94	9,27	11	124,3
4332	20	4,00	3,6	2,82	8,25	2,35	23,92	4,33	5,82	11,7	8,22	14,9	2,36	4,5	11	6,15
4334		4,00		3,52	14,49	4,83	25,36	4,33	5,84	21,43	8,22	18,91	4,24	7,69	11	145,49
4339		4,00	4,75	2,13	14,49	4,29	27,52	4,33	5,95	21,43	8,22	18,61	2,28	8,85	11	
4344	21	4,00	4,83	6	14,49	4,39	27,52	4,33	5,99	21,43	8,22	18,63	6,27	8,45	11	79,91
4345	22	4,00	4,57	2,97	11,67	3,59	23,07	4,33	3,49	19,81	8,22	18,21	3,87	8	11	90,62
4346		4,00	3,95	2,34	8,6	2,35	21,13	4,33	6,87	17,15	8,22	8,19	3,06	5,64	6,19	
4357	23	4,00	3,45	4,47	14,49	4,72	26,89	4,33	7,28	21,43	8,22	15,72	5,16	10,93	11	123,66
4359		4,00	4,46	4,59	14,49	4,44	27,52	4,33	5,3	21,43		18,34	4,97	9,02		107,65
4360	24	4,00	5,63	3,82	14,49	4,08	26,61	4,33	5,45	21,43	8,22	18,47	3,87	9,17	11	89,95
4361		4,00	4,75	1,96	14,49	4,25	26,49	4,33	2,32	21,43	8,22			1,91		1,05
4374		2,22	4,74		1,11		2,35	4,33	5,98		8,22	17,28	2,55	8,67	11	132,74
4375																
4376	26	4,00	4,84	2,1	14,49	3,67	22,79	4,33	6,97	21,43	8,22	19,97	2,07	9,69	11	126,57

