



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

VICTOR CAMPANA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE UM REAGENTE PARA DIAGNÓSTICO ‘*IN VITRO*’ VISANDO A QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA
M (IgM) EM SORO HUMANO**

VICTOR CAMPANA LEITE

DESENVOLVIMENTO DE UM REAGENTE PARA DIAGNÓSTICO ‘*IN VITRO*’ VISANDO A QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA M (IgM) EM SORO HUMANO.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Helvécio Tótola

RESUMO

O setor de reagentes para diagnóstico *in vitro* vem crescendo e tem se tornado de grande relevância e inovação na última década, auxiliando no diagnóstico de diversas doenças autoimunes sistêmicas que, em paralelo, aumentam a cada dia e já afetam mais de 400.000 pessoas em todo o mundo. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver um reagente para diagnóstico *in vitro* visando a quantificação de imunoglobulina M (IgM) auxiliando no diagnóstico e tratamento de diversas doenças e comorbidades. Para isso, realizaram-se diversos testes de desempenho e eficácia do produto visando o registro do reagente para futura comercialização. Dentre as análises, realizaram-se os testes de sensibilidade analítica, linearidade, efeito prozona de alta dose, exatidão, especificidade analítica, repetibilidade, reprodutibilidade e estudos de estabilidade. Analisando os resultados obtidos foi possível constatar que o produto em desenvolvimento atendeu a todos os critérios de aceitabilidade propostos para cada uma das análises. O produto atingiu uma sensibilidade analítica de 15,357 mg.dL⁻¹, linearidade de 16,72 a 303,04 mg.dL⁻¹ e não houve ocorrência de efeito prozona até 549,01 mg.dL⁻¹ do analito. Além disso, o reagente demonstrou-se específico até as seguintes concentrações de interferentes: 2000 mg.dL⁻¹ de triglicérides, 100 mg.dL⁻¹ de hemoglobina, 20 mg.dL⁻¹ de bilirrubina e 150 UI.mL⁻¹ de Fator Reumatóide. A partir da análise de estabilidade acelerada, o prazo de validade obtido foi de 18 meses e será confirmado por meio do acompanhamento em tempo real. Por fim, o produto demonstrou-se eficiente, seguro e manteve sua capacidade reacional em todos os testes de desempenho.

Palavras chave: Diagnóstico *in vitro*, Imunoglobulina M, turbidimetria.

LISTA DE SIGLAS

AA	Amostra Alta
AB	Amostra Baixa
CBPFC	Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DIV	Diagnóstico <i>in vitro</i>
EP	Ensaio de Proeficiência
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cadeia de Rastreabilidade Metrológica e incerteza de medição associada a cada nível.....	16
Figura 2. Ilustração do efeito gancho ou efeito prozona representada por uma diminuição paradoxal do sinal quando as concentrações do analito começam a ficar muito elevadas. Essa perda de sinal se deve ao efeito prozona que pode gerar esses tipos de resultados imprecisamente baixos.....	20
Figura 3. Analisador bioquímico Smart 200+.....	23
Figura 4. Calibração do teste de sensibilidade.....	36
Figura 5. Calibração do teste de linearidade.....	38
Figura 6. Calibração do teste de prozona de alta dose.....	41
Figura 7. Calibração do teste de exatidão.....	44
Figura 8. Calibração do teste de exatidão.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Diluições utilizadas para o preparo da curva de calibração (6 pontos).....	24
Quadro 2. Data de realização da estabilidade em tempo real até a conclusão dos 18 meses a serem avaliados.....	34
Quadro 3. Relatório de controles utilizados durante os 3 dias de teste de sensibilidade contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	37
Quadro 4. Média aritmética ($\bar{X}_0$), desvio padrão (σ_0), LoD e LoQ resultantes das 21 determinações realizadas durante os 3 dias de análise.....	37
Quadro 5. Relatório de Controle utilizado para validação da calibração no teste de linearidade contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	39
Quadro 6. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de prozona, contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	41
Quadro 7. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de exatidão do produto em desenvolvimento e do kit de referência (IgM Plus), contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle durante os 3 dias de análise.....	44
Quadro 8. Leitura de amostras de soro humano de um lote piloto do produto em desenvolvimento (BioTécnica) em comparação com um kit de referência (IgM Plus). O quadro apresenta o lote e validade dos reagentes, a identificação de cada amostra de soro humano (sequência de letras) e a diferença de leitura entre os reagentes (%DIF).....	45
Quadro 9. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de interferentes, contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	47
Quadro 10. Concentração média de IgM obtida e porcentagem da interferência gerada em cada diluição preparada a medida que se aumenta a concentração de diferentes interferentes (Triglicérides, Hemoglobina, Bilirrubina e Fator Reumatóide).....	48
Quadro 11. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de repetibilidade durante os 10 dias em mg/dL.....	49
Quadro 12. Concentração de IgM obtida durante 10 dias para as alíquotas das amostras alta, média e baixa preparadas.....	50

Quadro 13. Relatório de Controle utilizado para validação da calibração na análise de reprodutibilidade durante os 5 dias em mg.dL-1 com os 3 pilotos.....	51
Quadro 14. Concentração de IgM obtida durante 5 dias de análise para as alíquotas das amostras alta, média e baixa em três diferentes pilotos.....	50
Quadro15. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 1 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	53
Quadro 16. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 2 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	54
Quadro 17. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 3 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	55
Quadro 18. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando os três pilotos para avaliação da estabilidade em tempo real contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	56
Quadro 19. Dosagem inicial de diferentes controles para avaliação da estabilidade em transporte contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	57
Quadro 20. Dosagem inicial duas amostras de soro para avaliação da estabilidade em transporte comparando a leitura da amostra do reagente “referencia” com o “transporte”.....	57
Quadro 21. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando o piloto 1 para avaliação da estabilidade em uso contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	57
Quadro 22. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando o piloto 1 para avaliação da estabilidade em <i>bulk</i> contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Segmentos da indústria de reagentes para diagnóstico <i>in vitro</i> , exemplos e tecnologias associadas a cada método	13
Tabela 2. Proporções de preparo utilizadas para cada uma das 11 diluições do teste de linearidade.....	26
Tabela 3. Proporções utilizadas nas diluições para a análise de prozona de alta dose.....	28
Tabela 4. Diluições preparadas em diferentes concentrações de triglicérides a partir de soro base com e sem o interferente.....	30
Tabela 5. Diluições preparadas em diferentes concentrações de hemoglobina a partir de soro base com e sem o interferente.....	31
Tabela 6. Diluições preparadas em diferentes concentrações de bilirrubina a partir de soro base com e sem o interferente	32
Tabela 7. Diluições preparadas em diferentes concentrações de fator reumatoide a partir de soro base com e sem o interferente	32
Tabela 8. Valoração da Amostra Baixa e da Amostra Alta a partir de leituras em quintuplicata.....	39
Tabela 9. Valor teórico, valor obtido e desvio da linearidade obtido para cada uma das 11 diluições preparadas.....	39
Tabela 10. Teste de significância da correlação.....	40
Tabela 11. Leituras em quintuplicata em duas diferentes diluições para valoração da amostra com alta concentração de IgM.....	42
Tabela 12. Valores teóricos e obtidos em cada ponto da curva de diluição preparada para o teste de prozona de alta dose.....	42
Tabela 13. Análise dos parâmetros obtidos em comparação com os critérios de aceitabilidade estabelecidos.....	46
Tabela 14. Coeficiente de variação e o desvio padrão da média total de cada amostra durante 10 dias de análise.....	51
Tabela 15. Coeficiente de variação e o desvio padrão da média total de cada amostra durante os 5 dias de análise.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. A indústria de diagnóstico <i>in vitro</i> e seus segmentos.....	12
2.2. Turbidimetria	14
2.3. Imunoglobulina M	14
2.4. Legislação	15
2.5. Rastreabilidade Metrológica.....	15
2.6. Materiais de referência, padrões ou calibradores	16
2.7. Materiais de controle	17
2.8. Validação de metodologias analíticas ou Estudos de desempenho	18
2.8.1. Exatidão	18
2.8.2. Precisão	19
2.8.3. Sensibilidade Analítica	19
2.8.4. Efeito prozona de alta dose	20
2.8.5. Linearidade	21
2.8.6. Especificidade analítica/ Interferentes	21
2.8.6.1 Hemólise.....	21
2.8.6.2. Lipemia.....	22
2.8.6.3. Icterícia	22
2.8.6.4. Fator Reumatóide	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. Preparo do reagente para quantificação de Imunoglobulina M.....	23
3.2. Equipamento/Analisador bioquímico	23
3.3. Procedimento de Ensaio para quantificação de IgM	24
3.4. Curva de calibração	24
3.5. Avaliação de desempenho do produto / testes para registro do reagente na Anvisa ..	25
3.5.1. Sensibilidade	25
3.5.2. Linearidade	26
3.5.3. Efeito prozona de alta dose	28
3.5.4. Exatidão	28
3.5.5. Especificade Analítica	29
3.5.5.1. Preparo das amostras com o interferente Triglicérides	29
3.5.5.2. Preparo das amostras com o interferente Hemoglobina.....	30
3.5.5.3. Preparo das amostras com o interferente Bilirrubina	31
3.5.5.4. Preparo das amostras com o interferente Fator Reumatóide.....	32
3.5.5.5. Determinação do analito nas amostras	32

3.5.6.	Repetibilidade	33
3.5.7.	Reprodutibilidade	33
3.5.8.	Estabilidade	33
3.5.8.1.	Estabilidade Acelerada.....	33
3.5.8.2.	Estabilidade em Tempo Real.....	34
3.5.8.3.	Estabilidade em Transporte.....	35
3.5.8.4.	Estabilidade em Uso.....	35
3.5.8.5.	Estabilidade em <i>Bulk</i>	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1.	Sensibilidade.....	36
4.2.	Linearidade	38
4.3.	Efeito prozona de alta dose.....	40
4.4.	Exatidão	43
4.5.	Especificidade Analítica	47
4.6.	Repetibilidade	49
4.7.	Reprodutibilidade	51
4.8.	Estudo de Estabilidade.....	53
4.8.1.	Estabilidade Acelerada.....	53
4.8.2.	Estabilidade em Tempo Real	56
4.8.3.	Estabilidade em Transporte.....	56
4.8.4.	Estabilidade em Uso	57
5.	CONCLUSÃO	58
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

O setor de reagentes para diagnóstico *in vitro* vem crescendo e tem se tornado de grande relevância e inovação na última década, transformando a prática médica em processos cada vez mais rápidos e automatizados, possibilitando a redução de erros e sendo fundamental na decisão sobre o estado de saúde ou doença dos indivíduos (Gottlieb e Woodcock, 2006). De acordo com o “Food and Drug Administration” (2004), as inovações tecnológicas das indústrias de dispositivos para diagnóstico irão revolucionar as formas de tratamento existentes, transformando a distribuição e os cuidados na saúde radicalmente.

Forsman e Regan, 2006, demonstram que os reagentes para diagnóstico *in vitro* contribuem com até 94% dos dados objetivos de um prontuário clínico e os resultados dos ensaios laboratoriais são responsáveis por embasar mais de 70% das decisões médicas (do diagnóstico à terapia).

Paralelamente ao desenvolvimento da indústria de DIV, o número de doenças autoimunes sistêmicas cresce a cada dia e já afeta mais de 400.000 pessoas em todo o mundo (RAMOS-CASALS et al, 2015). Estima-se que esse tipo de enfermidade atinge mais de 3% da população mundial (BOULON, 2012) e representa a terceira classe mais comum de doenças nos países industrializados (FAIRWEATHER, 2007). Além disso, doenças crônico-degenerativas como a do intestino (doença de Crohn), a diabetes, a obesidade e a Artrite Reumatóide estão diretamente relacionadas com doenças inflamatórias ao passo que o processo inflamatório é o elo entre a síndrome metabólica e as doenças autoimunes, cardiovasculares e obesidade (INCT, 2014)

Nesse contexto, o diagnóstico precoce é essencial para se aumentar as chances de sucesso e cura de uma doença e/ou enfermidade pois possibilita um rápido início de tratamento da comorbidade. A possibilidade de sucesso com o tratamento aumenta quanto mais precoce o diagnóstico da doença. Dessa forma, doenças cardiovasculares, da tireoide, do estômago e do intestino; até as metabólicas, depressão e o câncer, podem ser curadas e tratadas, se forem diagnosticadas precocemente (URURAHY, 2019).

Para isso, a quantificação de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM, IgA e IgE) representa o ponto inicial na verificação da imunidade humoral e possibilita o diagnóstico de deficiências quantitativas de imunoglobulinas como a agamaglobulinemia congênita, a imunodeficiência comum variável e deficiência de IgA, assim como alterações humorais associadas a outros distúrbios, como síndrome de hiper-IgE e a síndrome de hiper-IgM (ROXO-JUNIOR, 2006).

Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver um reagente para diagnóstico *in vitro* visando a quantificação de imunoglobulina M (IgM) de modo a auxiliar o diagnóstico e tratamento de diversas doenças e comorbidades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A indústria de diagnóstico *in vitro* e seus segmentos

Os testes para diagnóstico *in vitro* (DIV) são ferramentas utilizadas nas práticas clínicas para o diagnóstico e monitoramento de doenças e anomalias, que fornecem prognóstico e preveem resposta ao tratamento. Estes recursos possuem papel essencial nos cuidados da saúde e são amplamente utilizados para avaliar o potencial risco de desenvolver determinada doença ou distúrbio e para orientar o manejo do paciente (RAMAN; AVENDANO; CHEN; 2013).

A definição de produtos para diagnóstico de uso *in vitro* de acordo com Anvisa (2015):

“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;” (ANVISA, 2015, RDC Nº 36, de 26 de Agosto de 2015)”.

A indústria de reagentes para diagnóstico é um setor amplo que possui diversos segmentos e aplica diferentes técnicas e tecnologias (PAIVA, 2009) para que os quadros clínicos sejam analisados e prescritos. A Tabela 1 apresenta alguns dos principais segmentos e os métodos e tecnologias utilizadas.

Tabela 1. Segmentos da indústria de reagentes para diagnóstico *in vitro*, exemplos e tecnologias associadas a cada método.

Segmento	Descrição Técnica	Tecnologia(s)	Exemplos (ensaios)
Química clínica	Ensaios que utilizam os processos bioquímicos para medir os níveis dos componentes químicos no sangue.	Reações enzimáticas	Sódio e Glicose
Imunoensaios	São as técnicas em diagnósticos relacionadas às interações entre antígenos (Ag) e anticorpos (Ac).	Enzima-imunoensaio	Diagnóstico de Hepatites
Microbiologia	Ensaios para identificação de microrganismos a partir de seu crescimento em meios de cultura.	Cultura bacteriana	Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>
Urinálise	Ensaios que utilizam os processos químicos para medir os níveis dos componentes químicos na urina.	Reações enzimáticas	Corpos cetônicos
Coagulação	Ensaios para avaliar a hemostasia em pacientes	Polarização de luz	Tempo de coagulação
Hematologia	Ensaios para a contagem de hemácias, hematócrito, plaquetas, etc.	Citometria de fluxo	Hemograma
Testes laboratoriais remotos	São ensaios realizados próximo ao paciente e mais rápidos que os tradicionais	Testes rápidos	Testes rápidos para urinálise
Gasometria	Ensaios voltados para o manejo clínico de distúrbios respiratórios e metabólicos.	Eletrodo seletivo	pH PCO ₂
Diagnóstico Molecular	São ensaios para detecção e/ou quantificação de ácido nucléico.	Amplificação de ácidos nucléicos	Identificação de HIV
Monitoramento de glicose sanguínea	Ensaios para quantificação de glicose sanguínea (autoteste).	Biosensores	Glicose sanguínea

Fonte: (PAIVA, 2009)

A quantificação de imunoglobulinas (particularmente IgG, IgA e IgM) comumente é realizada por meio de imunoensaios ou métodos imunoquímicos dentro os quais encontram-se principalmente a imunodifusão radial simples, a nefelometria (taxa ou ponto final), a imunodifusão, a eletroimunodifusão e a turbidimetria (AKÇAY; KELES; KIZILTUNÇ, 1997). Tendo em vista que o presente trabalho se utilizou de métodos baseados em espectrofotometria, a turbidimetria foi o método imunoquímico empregado.

2.2.Turbidimetria

A turbidimetria baseia-se no princípio de aglutinação e respectivas alterações imunológicas em dispersão à luz. Apresenta resultados semelhantes à imunodifusão radial e se utiliza de métodos completamente automatizados, fator muito importante para redução do tempo de análise da amostra (TVARIJONAVICIUTE et al., 2013).

O método turbidimétrico, foi descrito em 1942 por Foster e é utilizado para se avaliar a concentração de partículas grandes como algumas proteínas séricas que não podem ser mensuradas por meio de espectroscopia de absorção. Esse método baseia-se na aplicação de um feixe de luz em partículas em suspensão. Quando um feixe de luz atinge uma partícula em suspensão, partes da luz são absorvidas, refletidas ou dispersas pela solução. A quantidade de luz absorvida por uma suspensão de partículas é proporcional a concentração e ao tamanho das partículas (CARNEIRO et al, 2017). Neste método, os ensaios são baseados no princípio de aglutinação cuja reação antígeno e anticorpo formam imunoprecipitados insolúveis e provocam turbidez que pode ser medida e mensurada em espectrofotômetro (LIMA et al., 2012).

2.3. Imunoglobulina M

As imunoglobulinas são moléculas formadas por 4 cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H), unidas por pontes dissulfídricas (S-S). São produzidas pelos linfócitos B e encontram-se no corpo humano sob duas formas: aderidas a membrana do linfócito ou na circulação sanguínea (AMBRÓSIO, 2014).

A IgM é uma molécula pentamérica e é a terceira imunoglobulina mais comum no soro, representando cerca de 5% a 10% das imunoglobulinas totais circulantes. Por conta de sua estrutura, é uma boa fixadora do sistema complemento e é muito eficaz na lise de microrganismos. Além disso, a IgM é a primeira imunoglobulina a ser produzida pelo feto durante a gestação e a primeira Ig a ser produzida por uma célula B virgem quando há um estímulo de um antígeno (MAYER, s.d.).

A quantificação das imunoglobulinas no soro é de extrema relevância para o diagnóstico e monitoramento das imunodeficiências primária ou secundária, e para o acompanhamento clínico do mieloma múltiplo. Ademais, disfunções nas concentrações de imunoglobulina M, em específico, podem estar relacionadas com imunodeficiências adquiridas e congênitas, problemas hepáticos, como a cirrose e a hepatite crônica, infecções virais primárias e outras infecções da corrente sanguínea (BIOTÉCNICA, 2015).

2.4. Legislação

Um dos elementos fundamentais durante o desenvolvimento e registro de um produto para diagnóstico *in vitro* é atender as exigências de Boas Práticas de Fabricação e Controle, estabelecidas pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 16, de 28 de março de 2013. Este requisito é obrigação de toda empresa que fabrica, importa ou comercializa produtos para DIV no Brasil, conforme estabelece a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 15, de 28 de março de 2014. A comprovação do cumprimento de BPF para os produtos suscetíveis a registro é realizada por meio da inspeção sanitária *in loco* (no próprio local) para obtenção do Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle – CBPFC (ANVISA, 2015).

Além da RDC nº16, a resolução que rege o desenvolvimento de um produto para diagnóstico *in vitro* é a RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015. Esta, tem por objetivo estabelecer 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. A legislação se aplica não só aos produtos produzidos no país, mas também para os importados.

A concessão do registro é dependente da publicação do Certificado de BPF (Boas Práticas de Fabricação) emitido pela ANVISA e ao atendimento aos requisitos indicados na RDC 36/2015, incluindo o laudo de análise prévia e estudo de desempenho do produto, que deve contar com resultados satisfatórios. Após ser deferido, o registro é válido por 10 anos contados a partir da data de concessão do mesmo. De acordo com a legislação vigente (RDC 36/2015), a revalidação deve ser requerida no primeiro semestre do último ano do quinquênio de validade (BRASIL, 2015)

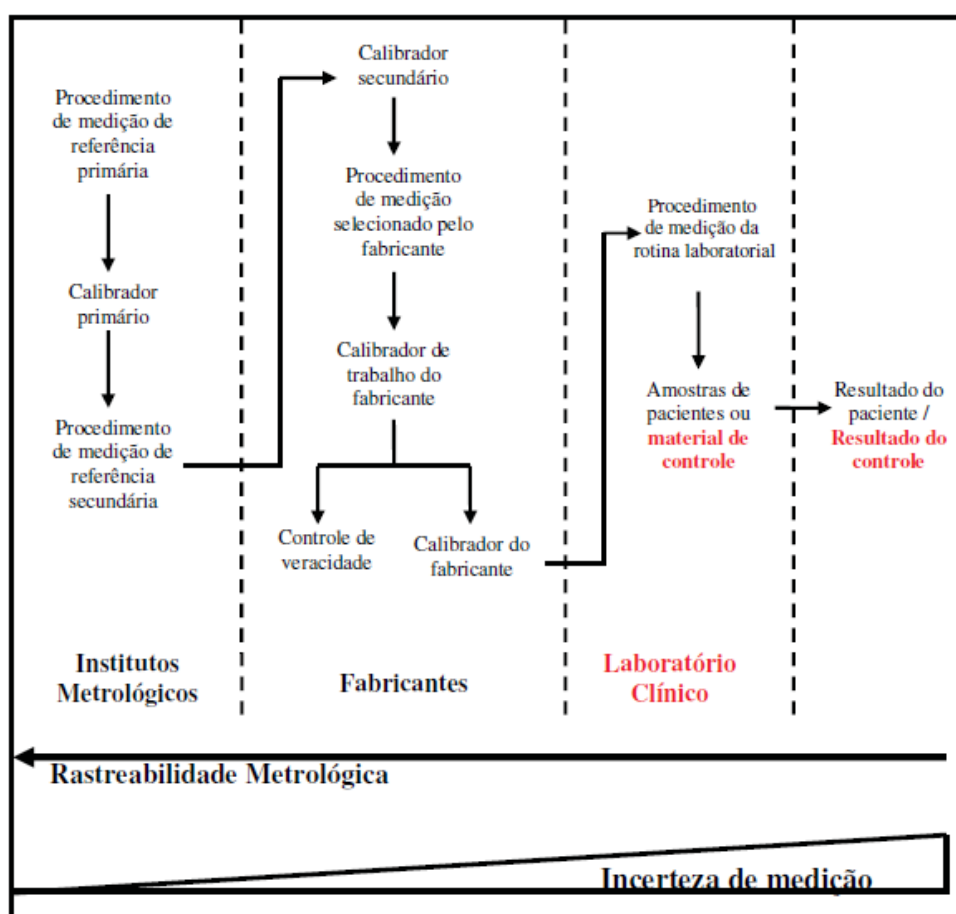
2.5. Rastreabilidade Metrológica

A Rastreabilidade Metrológica pode ser definida segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (2008) como a “Propriedade de um resultado de medição estar relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição” (OLIVEIRA, 2009; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). O principal objetivo da rastreabilidade metrológica em laboratório clínico é associar os resultados de uma amostra do paciente com um material de referência, de forma possibilitar a comparação por meio de um sistema de medição, de uma localização e do tempo (VESPER e THIENPONT, 2009).

Devido à importância da rastreabilidade, a União Européia implementou a obrigatoriedade da rastreabilidade dos dispositivos médicos de DIV, o que gerou impacto a nível mundial. (VESPER e THIENPONT, 2009). Segundo Bièvre e Gunzler (2003) a efetividade de um método de medição é obtida por uma rigorosa rastreabilidade metrológica de resultados, que levam em consideração a hierarquia de calibração.

A figura 1 adaptada por Tambwekar (2009) da ISO 17511:2003 demonstra a cadeia de rastreabilidade metrológica.

Figura 1- Cadeia de Rastreabilidade Metrológica e incerteza de medição associada a cada nível.



Fonte: Tambwekar (2009).

2.6. Materiais de referência, padrões ou calibradores

Os materiais de referência internacionais são as principais estruturas na cadeia e hierarquia de rastreabilidade em química analítica. Possuem a mais alta qualidade e são desenvolvidos de forma a preservar as características naturais dos analitos, manter a

estabilidade em longo prazo e a comutatividade com as amostras dos pacientes nos diferentes sistemas de ensaios utilizados para esses analitos (JOHNSON, 2010; ZSCHUNKE, 2000).

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR/ISO GUIA 30, os materiais de referência podem ser definidos como “Material ou substância, que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais”. Dessa forma, são os mais utilizados na especificação de valores de padrões e calibradores (OLIVEIRA, 2008).

Os padrões/ calibradores são soluções ou dispositivos de características quantitativas / qualitativas conhecidas (concentração, intensidade, reatividade, por exemplo) utilizados para calibrar, graduar ou ajustar um procedimento de medição ou para comparar a resposta obtida com a resposta de uma amostra (NCCLS, 1997).

Os padrões podem ser de três tipos: primários, secundários ou internos. O padrão primário é aquele determinado por meio de um procedimento de medição de referência primário. Dessa forma, possui a mais elevada qualidade metrológica e seu valor é aceito sem referência de outros padrões (BARWICH et al., 2001; KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). Normalmente são formados por substâncias químicas purificadas dissolvidas em solventes ideais (TAMBWEKAR, 2009). Já em um padrão secundário, a concentração do analito é calculada através de uma metodologia de referência aceitável utilizando o padrão primário como calibrador (KONIECKA e NAMIESNIK, 2009). O padrão interno é uma espécie de referência, química ou fisicamente semelhante ao analito, que é adicionada a amostras, padrões e brancos. A concentração do analito é determinada pela semelhança do resultado do analito e do padrão interno (SKOOG et al., 2006).

Na rotina dos laboratórios, os mais utilizados são os padrões secundários, pois estes são soluções com uma matriz que mimetiza de forma mais precisa as amostras humanas, diferentemente dos padrões primários que são soluções aquosas ou alcoólicas com o analito purificado (RICÓS et al., 1999).

2.7. Materiais de controle

Materiais de controle são definidos segundo o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) como “um dispositivo, solução, preparação liofilizada, ou pool coletado de amostras humanas ou animais, ou ainda material derivado artificialmente, destinados a serem utilizados no processo de controle de qualidade”.

As concentrações dos analitos nos materiais de controle devem ser escolhidos em níveis relevantes para as decisões clínicas e/ou limites críticos de desempenho dos métodos analíticos (duas ou três concentrações distintas podem ser necessárias para cada analito), como os limites superiores e/ou inferiores da linearidade (metodologia utilizada para validação do sistema analítico descrito mais detalhadamente no tópico 2.8.5) (QUAM, 2010). Além disso, para o controle de qualidade a Clinical Laboratories Improvement Amendments (CLIA'88) recomenda que os laboratórios recalibrem seus métodos analíticos pelo menos a cada seis meses (exceto na presença de alterações ou tendências quando estes também devem ser recalibrados) e utilizem pelo menos dois níveis de controle por dia como requisito mínimo necessário (DOOLEY, 2007; TAMBWEKAR, 2009).

2.8. Validação de metodologias analíticas ou Estudos de desempenho

Para que um método laboratorial tenha aplicabilidade na rotina clínica, este deve garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em amostras de pacientes e, para isso, devem atender a uma série de exigências avaliadas a partir parâmetros de desempenho que analisarão a eficácia do método e/ou equipamento utilizado (CENTERS FOR MEDICARE & MEDICAID SERVICES CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003) (OLIVEIRA & MENDES, 2010). Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

De acordo com RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015, o dossiê técnico do produto para diagnóstico *in vitro* em desenvolvimento deve conter, quando aplicável, estudos de desempenho que envolvem exatidão de medição, precisão de medição (incluindo repetibilidade; e reprodutibilidade), sensibilidade analítica ou limite de detecção, especificidade analítica; efeito pró-zona de alta dose, intervalo de medição ou linearidade e validação do procedimento de ensaio.

2.8.1. Exatidão

O termo exatidão refere-se à veracidade (certeza) de uma medição, ou seja, o quão perto valor medido de um analito se aproxima de seu valor real (KENKEL, 2003). Para avaliar a exatidão entre o produto para DIV em desenvolvimento e o valor real, o Sistema Nacional de Referência para Laboratórios Clínicos americano (NRSCL) recomenda a utilização de uma ordem de prioridade de métodos analíticos e de materiais de referência que permite definir a

precisão do método. Essa ordenação divide-se em: “método definitivo, método de referência, comparação entre métodos através de sua média, média de laboratórios de escolha e média por grupo para ensaios de proficiência”. (OLIVEIRA & MENDES, 2010).

Nessa hierarquia de metodologias, os métodos de referência podem ser menos exatos que os anteriores e assim por diante. Todavia, isto não impede que a indústria e os laboratórios de análises clínicas os utilizem, desde que os resultados possuam rastreabilidade (o método referência é rastreável aos métodos definitivos, por exemplo). O ensaio de proficiência (EP) também representa uma maneira de se avaliar a exatidão em um método laboratorial e consiste na comparação dos valores obtidos em um mesmo material ou amostra, analisados simultaneamente por diversos laboratórios, representando um controle de qualidade interlaboratorial (OLIVEIRA & MENDES, 2010).

2.8.2. Precisão

A estimativa da precisão, que engloba a repetibilidade e reprodutibilidade de um ensaio, são fundamentais para avaliar a robustez e a transferência do método entre laboratórios, além de representar uma análise imprescindível para o processo de validação (CARAGUEL et al., 2009).

As definições de repetibilidade e reprodutibilidade de acordo com a norma americana ASTM E691 *Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method* (ASTM, 2016):

Repetibilidade: “é a capacidade de se repetir um resultado em mesmas amostras, ensaiadas no mesmo local, com mesmos equipamentos e mesmo operador”.

Reprodutibilidade: “é a capacidade de se reproduzir um resultado em mesmas amostras, ensaiadas em locais diferentes, com equipamentos diferentes e operadores diferentes”.

2.8.3. Sensibilidade Analítica

A sensibilidade de um método está relacionada com a variação mínima que é preciso aplicar à concentração que está sendo medida para se obter uma variação significativa do resultado (MEHTA, 1989). Essa medição leva em consideração o ruído presente nos sinais de resposta e pode ser representada pela razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do sinal analítico (SKOOG et al, 2006). A sensibilidade do método também é comumente definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (RIBEIRO et al, 2008).

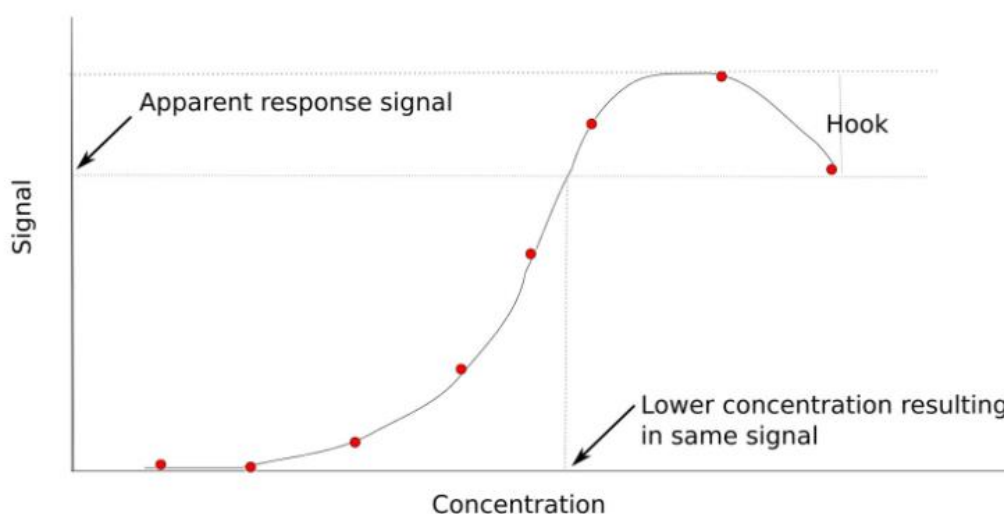
O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não obrigatoriamente quantificada (Buick *et al.*, 1990). Outra definição comum de LD é, o menor sinal no qual é possível distinguir a resposta do sinal do branco (MILLER, 1991).

O limite de quantificação (LQ), por outro lado, é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada em uma amostra com precisão e exatidão (BUICK *et al.*, 1990).

2.8.4. Efeito prozona de alta dose

O efeito gancho, também chamado efeito prozona, descreve a perda de sinal que pode ocorrer em imunoenaios na presença de altas concentrações de analito ou excesso de anticorpo. Este fenômeno imunológico ocorre, pois a eficiência dos anticorpos em formar complexos imunes é prejudicada quando as concentrações de um anticorpo ou antígeno são muito elevadas podendo gerar resultados falsos negativos ou resultados imprecisamente baixos (WU; HAYDEN, 2018; WARD *et al.*, 2017).

Figura 2. Ilustração do efeito gancho ou efeito prozona representada por uma diminuição paradoxal do sinal quando as concentrações do analito começam a ficar muito elevadas. Essa perda de sinal se deve ao efeito prozona que pode gerar esses tipos de resultados imprecisamente baixos.



Fonte: (HEALTH JADE, 2021)

2.8.5. Linearidade

A linearidade relaciona-se com à capacidade de uma metodologia analítica em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito analisado, dentro de uma determinada faixa/intervalo. A linearidade é o parâmetro que fornecerá a faixa operacional no qual o método/reagente pode ser aplicado e será representada pelos limites de quantificação inferior e superior do método analítico (BRASIL, 2003). A ANVISA recomenda que a linearidade seja definida a partir da análise de pelo menos cinco concentrações diferentes.

2.8.6. Especificidade analítica/ Interferentes

A especificidade de um método analítico é um importante parâmetro que visa garantir que a quantificação do analito analisado não sofra alterações provenientes de “metabólitos, produtos de degradação, fármacos ou compostos endógenos” (CASSIANO et al, 2009).

Os mecanismos de interferência podem ser oriundos de reações cruzadas, de competição ou inibição ou de interferências físicas, como alteração da viscosidade, turbidez e força iônica da matriz da amostra (OLIVEIRA & MENDES, 2010). A interferência por hemólise, lipemia e icterícia em laboratórios clínicos são as mais preocupantes. Estas alterações podem gerar resultados incorretos e consequentemente diagnósticos inadequados, intervenções equivocadas e desfecho desfavorável para os pacientes (JI & MENG, 2011).

2.8.6.1 Hemólise

A hemólise é consequência do rompimento da membrana da hemácia que ocasiona a liberação principalmente de hemoglobina no meio que está inserida. A hemólise é decorrente de erros na coleta, processamento, transporte ou armazenamento da amostra e caracteriza-se pela cor avermelhada do soro após a centrifugação do sangue. (BRAUNSTEIN, 2017; OLIVEIRA & MENDES, 2010).

Amostras hemolisadas podem gerar problemas de baixa sensibilidade, seletividade e resultados inespecíficos (SON et al., 2014) que ocorrem pela interferência na coloração da reação, pela diluição dos componentes do soro, alteração da turbidez ou interação química com os reagentes (ALLEMAN, 1990).

2.8.6.2. Lipemia

O termo lipemia caracteriza amostras de soro ou plasma com acúmulo de partículas de lipoproteínas, derivado do metabolismo dos lipídeos e de outros eventos fisiológicos e patológicos que podem resultar em um soro com características turva ou leitosa. (MARTÍNEZ-SUBIELA & CERON, 2005; NIKOLAC, 2014). A opacidade gerada pelo excesso de turbidez pode interferir e gerar prejuízos às análises fotométricas e bioquímicas (KROLL & ELIN, 1994; KERR, 2003).

2.8.6.3. Icterícia

A icterícia caracteriza-se pela coloração amarelada da pele e outras regiões devido à elevação excessiva de bilirrubina circulante no sangue. A icterícia torna-se visível normalmente em condições de hepatite inflamatória, obstrução biliar e uso de determinados fármacos quando o nível de bilirrubinas pode chegar de 2 a 3 mg.dL⁻¹ (HERRINE, 2018). A interferência pode ocorrer tanto devido as alterações colorimétricas geradas pela bilirrubina quanto a interação/reação química com os reagentes (PIYOPHIRAPONG *et al.*, 2010).

2.8.6.4. Fator Reumatóide

O fator reumatoide representa um tipo de anticorpo heterofilo que são aqueles originados em resposta a um antígeno e que podem reagir com outros antígenos ou com a porção Fc de outros anticorpos, sendo, os mais comuns IgM e IgG. Dessa maneira, o fator reumatoide é um interferente que pode estar presente em 30 a 40% das amostras, afetando positiva ou negativamente as mais variadas reações quantitativas ou qualitativas (MASSAKASU *et al.*, 2018).

2.8.7. Estudo de Estabilidade

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução RE 398 (2004), define testes de estabilidades como o “conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas”. Os testes de

estabilidade podem ser divididos em estudo de estabilidade acelerado, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de acompanhamento (ANVISA, 2004).

O shelflife (tempo de prateleira) ou prazo de validade, de acordo com o ICH (Guia Q1A(R2)), “é o período de tempo durante o qual um medicamento deve manter-se dentro da especificação, desde que seja armazenado nas condições definidas no rótulo do recipiente”.

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo do reagente para quantificação de Imunoglobulina M

Em respeito à propriedade intelectual interna da empresa e o segredo industrial de formulação, tanto os materiais quanto as proporções utilizadas para desenvolvimento da fórmula não serão detalhados. Assim, para o desenvolvimento do reagente utilizou-se um tampão (componente A), um catalisador (componente B), um surfactante (componente C) e o princípio ativo (componente D).

3.2. Equipamento/Analizador bioquímico

Para realização de todas as análises e testes de validação do reagente utilizou-se o analisador bioquímico Smart 200+ da empresa Biotécnica que possui 18 posições para amostras, 26 posições refrigeradas para reagente, uma probe para pipetagem dos reagentes e das amostras e um mixer para homogeneização. Permite uma pipetagem de reagente de 10 a 400µL e de 2 a 50µL para amostras. Além disso, possui software integrado, controle da temperatura e monitoramento da reação e lavagem automática que possibilita uma maior precisão nos resultados.

Figura 3. Analisador bioquímico Smart 200+



Fonte: (BIOTÉCNICA, 2021)

3.3. Procedimento de Ensaio para quantificação de IgM

A quantificação de Imunoglobulina M em amostras foi realizada a partir de reações turbidimétricas utilizando o analisador bioquímico Smart 200+. Para isso, programou-se o equipamento para utilizar o comprimento de onda de 340nm, temperatura de 37 °C, um volume de amostra/calibrador de 2,5 µL para 250 µL de reagente e um tempo de reação da amostra com o reagente de 180 segundos. Após esse período de tempo a reação chega em um ponto final pois os imunoprecipitados insolúveis já foram totalmente formados e a turbidez da solução pode ser mensurada por meio da leitura de absorbância. Esta leitura de absorbância é proporcional a concentração de IgM na amostra e quando aplicada a curva padrão preparada e gerada no analisador bioquímico (item 3.4), retornará à concentração de IgM automaticamente pelo próprio equipamento.

3.4. Curva de calibração

A curva de calibração foi construída utilizando o Multicalibrador Plus da Biotécnica (Lote: 02A020) com concentração de IgM de 431 mg.dL⁻¹ diluído em NaCl 9 g.L⁻¹ conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Diluições utilizadas para o preparo da curva de calibração (6 pontos):

Diluição	1	2	3	4	5	6
Calibrador(µL)	-	10	25	50	75	100
NaCl (µL)	100	90	75	50	25	-
Fator	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1

A concentração de IgM do calibrador é rastreável ao Standard Reference Materials ERM DA470k/IFCC. O analisador bioquímico Smart 200+ calcula automaticamente a concentração do analito em cada amostra e projeta a curva de calibração. Na ausência de analisador bioquímico, a concentração de IgM indicada na instrução de uso do Multicalibrador PLUS deve ser multiplicada pelo fator correspondente para obter a concentração de IgM de cada diluição. Visando a validação da calibração e as corridas analíticas utilizou-se os controles quantitativos Biorad nível 1 (Lote: 68901), Biorad nível 2 (Lote: 68902), Controle Multi Médio (L:02C290).

3.5. Avaliação de desempenho do produto / testes para registro do reagente na Anvisa

3.5.1. Sensibilidade

Para se determinar a sensibilidade analítica do método em soro humano utilizou-se um lote piloto para quantificação do analito. Tendo em vista que a sensibilidade é representada pela determinação do Limite de Detecção (LoD) e do Limite de Quantificação (LoQ), estes parâmetros foram calculados.

O LoD foi calculado a partir da dosagem de 01 amostra de branco (sem o analito) em 07 repetições por dia, incluindo um controle, durante 03 dias e os resultados aplicados a Equação (1).

$$\text{LoD} = X_0 + K \cdot \sigma_0 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

X_0 = média aritmética das 21 determinações.

σ_0 = desvio padrão das 21 determinações.

$K = 3,3$ (para um nível de confiança de cerca de 99,7% considerando uma distribuição normal).

O LoQ foi calculado a partir da dosagem de 01 amostra com concentração baixa (13,94 mg.dL⁻¹) preparada a partir da diluição de 1:8,75 de um soro com concentração 122 mg.dL⁻¹ em 07 repetições por dia, incluindo um controle, durante 03 dias, e os resultados aplicados a Equação (2):

$$\text{LoQ} = X_0 + K \cdot \sigma_0 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

X_0 = média aritmética das 21 determinações

σ_0 = desvio padrão das 21 determinações

$K = 10$ (correspondente a um Desvio Padrão Relativo de 10%).

As metodologias e critérios de aceitabilidade adotados para análise dos parâmetros de sensibilidade analítica foram realizados segundo INMETRO (2010).

Os resultados obtidos para os controles deverão estar dentro do intervalo de variação permitido, a variação percentual (%DIF) entre o valor médio obtido para a amostra baixa e seu valor teórico deve ser de no máximo $\pm 10\%$ e o coeficiente de variação (%CV) obtido nas 21 determinações deve ser de no máximo 10%.

A variação percentual e o coeficiente de variação são calculados a partir da Equação 3 e 4 indicadas abaixo e dos valores de σ_0 e X_0 obtidos.

$$\%DIF = \frac{\sigma_0}{X_0} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\%CV = \left(\frac{C_{\text{obtido}} - C_{\text{teórico}}}{C_{\text{teórico}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Em que, $C_{\text{teórico}}$ é a concentração teórica obtida da diluição de 1:8,75 realizada e C_{obtido} é a média das 21 determinações.

3.5.2. Linearidade

Para determinar a linearidade do produto, preparou-se uma amostra com concentração próxima ao limite inferior do intervalo operacional desejado – denominada Amostra Baixa (AB) – e uma amostra com concentração próxima ao limite superior do intervalo operacional desejado – denominada Amostra Alta (AA). A valoração dessas amostras foi realizada a partir da leitura em quintuplicata de cada uma delas, definindo seu valor teórico. A partir dessas amostras, preparou-se 11 diluições como exposto na Tabela 2.

Tabela 2: Proporções de preparo utilizadas para cada uma das 11 diluições do teste de linearidade.

DILUIÇÃO	PARTES DE AMOSTRA BAIXA	PARTES DE AMOSTRA ALTA
1 (AB)	1,0	0
2	0,9	0,1
3	0,8	0,2
4	0,7	0,3
5	0,6	0,4
6	0,5	0,5
7	0,4	0,6
8	0,3	0,7
9	0,2	0,8
10	0,1	0,9
11 (AA)	0,0	1,0

Tabela 2. *AB refere-se a amostra baixa (amostra diluída ou pouco concentrada) e AA refere-se a amostra alta (amostra com alta concentração do analito). Fonte: Próprio autor

Realizou-se a determinação das 11 diluições em triplicata, incluindo um controle para validar a corrida. Com base na proporcionalidade das diluições, determinou-se as concentrações

teóricas para cada diluição a partir da concentração inicial das amostras AB e AA utilizando a Equação 5. Os volumes foram determinados a partir da pesagem em balança analítica, considerando que a densidade é igual a 1,00 para volumes consideravelmente pequenos. O Desvio da Linearidade (diferença entre o valor teórico e o obtido pela média das determinações) para cada diluição foi calculado a partir da Equação 6.

$$C_{\text{teórico}} = \frac{(C_{AB} \cdot V_{AB} + C_{AA} \cdot V_{AA})}{(V_{AB} + V_{AA})} \quad \text{Equação (5)}$$

$$DL\% = \left(\frac{C_{\text{obtido}} - C_{\text{teórico}}}{C_{\text{teórico}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

C_{AB} = concentração da Amostra Baixa

V_{AB} = volume de Amostra Baixa

C_{AA} = concentração da Amostra Alta

V_{AA} = volume de Amostra Alta

DL% = Desvio da Linearidade

C_{obtido} = Média da triplicata de cada diluição

Os resultados teóricos e obtidos foram transferidos para uma planilha específica, obtendo o gráfico de linearidade, considerando os resultados obtidos no eixo Y e os valores teóricos no eixo X. Na mesma planilha, obtiveram-se também os resultados do desvio da linearidade em função da concentração teórica do analito, obtendo o Gráfico de Resíduos, considerando os DL% no eixo Y e os valores teóricos do analito no eixo X.

Foram adotados os seguintes critérios como parâmetros de aprovação da linearidade:

- Coeficiente angular (a): $0,9 < a < 1,1$;
- Intercepto (b): $|b| < LQ$ (Limite de Quantificação definido no Estudo de Sensibilidade).
- Coeficiente de Correlação (R): $R > 0,990$ ($R^2 > 0,9801$);
- p-valor $< 0,05$ (5% de nível de significância);
- Desvio da Linearidade (DL) $< 35\%$ do Erro Total para o analito, seguindo o método EP6-A do Clinical And Laboratory Standards Institute(2003). O erro total para o analito (IgM) é de $\pm 16,8\%$ (WESTGARD, 2004).

3.5.3. Efeito prozona de alta dose

Visando realizar a análise de prozona de alta dose, inicialmente preparou-se uma solução de IgM concentrada, concentrando um pool de amostras de soro humano até uma concentração de aproximadamente 600 mg.dL⁻¹. Determinou-se a concentração de IgM presente na amostra a partir da média da dosagem, em 5 replicatas, das diluições de 1:10 e 1:8 multiplicadas pelo seu fator de diluição.

Com a solução concentrada de IgM preparada, realizou-se uma série de diluições conforme estabelecido na Tabela 3.

Tabela 3. Proporções utilizadas nas diluições para a análise de prozona de alta dose.

Diluição	Partes de Solução concentrada – P₁	Partes de Água Purificada – P₂
100%	1,000	-
75%	0,750	0,250
50%	0,500	0,500
25%	0,250	0,750
12,5%	0,125	0,875

Anotou-se o peso P₁, após a adição da Solução 1, e o peso P₂, após a adição da água purificada. A partir dos pesos obtidos, determinou-se a concentração teórica de IgM presente em cada uma das diluições utilizando a Equação 7.

$$\text{Concentração do analito} = \frac{P_1 \cdot \text{Concentração da solução concentrada}}{P_1 + P_2} \quad \text{Equação (7)}$$

Calibrou-se o equipamento, determinou-se um controle em triplicata para validar o teste e realizou-se a determinação da série de diluições em triplicata. Por fim, plotou-se um gráfico de dispersão representando no eixo Y as concentrações obtidas e no eixo X os respectivos valores teóricos de concentração de IgM para as diluições.

O critério de análise do efeito de prozona de alta dose foi definido a partir da maior concentração do analito cuja resposta em concentração, mesmo que falsamente baixa, ainda seja maior que a concentração determinada pela linearidade do método. Dessa forma, este valor será definido como a concentração até a qual não ocorre efeito prozona.

3.5.4. Exatidão

Para realizar o estudo de Exatidão, comparou-se os resultados de leitura de amostras de soro humano de um lote piloto do produto em desenvolvimento com um kit de referência devidamente regulamentado disponível no mercado. Para isso, utilizou-se o reagente IgM Plus

comercializado pela empresa Biotécnica Indústria e Comércio LTDA. Em ambos os produtos, realizou-se a determinação de 35 amostras em duplicata, por 3 dias, sendo 17 amostras no primeiro dia, 8 amostras no segundo dia e 10 amostras no terceiro dia, incluindo pelo menos um controle por dia.

Os resultados obtidos foram analisados a partir do gráfico de correlação, considerando o lote em teste no eixo Y e o referência no eixo X. Para isso, encontrou-se o coeficiente angular (inclinação) e o intercepto da reta, o R (coeficiente de correlação) e realizou-se um teste de significância da correlação. Por meio da equação de regressão, determinou-se também a porcentagem de erro metodológico (%DIF) em três níveis de decisão, sendo X o valor esperado e Y o valor calculado.

Para o teste de exatidão adotou-se os seguintes critérios de aceitabilidade: Coeficiente angular (a): $0,9 < a < 1,1$, Intercepto (b): $|b| < \text{LoQ}$ (Limite de Quantificação definido no Estudo de Sensibilidade), Coeficiente de Correlação (R): $R > 0,990$ ($R^2 > 0.9801$), p-valor $< 0,05$ (5% de nível de significância) e a porcentagem encontrada para os níveis de decisão escolhidos (%DIF), em módulo, deve ser menor que o erro total para o analito (16,8% para a IgM utilizando Westgard (2004) como referência).

3.5.5. Especificade Analítica

Para o estudo da especificidade analítica, utilizou-se um lote piloto do produto e realizou-se a determinação do analito em amostras com incremento de interferentes endógenos potenciais: triglicérides, hemoglobina e bilirrubina e fator reumatóide.

3.5.5.1. Preparo das amostras com o interferente Triglicérides

a) Preparo da diluição concentrada do interferente

Inicialmente realizou-se a diluição da solução concentrada do interferente. Para isso, utilizou-se uma solução comercial a 20%. Esta solução mostra uma turbidez que é aproximadamente equivalente à de uma concentração de Triglicérides em soro de 49.463 mg.dL⁻¹. Dilui-se a solução Lipídica para 40.000 mg.dL⁻¹.

b) Preparo do soro base

O soro base é um pool de soros que contenha o analito. Os soros selecionados para compor o pool não podem apresentar-se visualmente hemolisados, lipêmicos nem ictéricos.

c) Preparo das diluições do interferente

Preparou-se as seguintes soluções:

- Soro base sem interferente (s/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL de água.
- Soro base com interferente (c/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL da diluição concentrada do interferente.

As concentrações de triglicérides de interesse foram obtidas pela mistura dos soros base com e sem interferente, c/i e s/i, respectivamente, conforme indicado na Tabela 4:

Tabela 4. Diluições preparadas em diferentes concentrações de triglicérides a partir de soro base com e sem o interferente.

Diluição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Soro base s/i (mL)	0,500	0,462	0,412	0,375	0,325	0,275	0,250	0,187	0,125	0,000
Soro base c/i (mL)	0,000	0,038	0,088	0,125	0,175	0,225	0,250	0,313	0,375	0,500
Triglicérides (mg/dL)	0	150	350	500	700	900	1000	1250	1500	2000

3.5.5.2.Preparo das amostras com o interferente Hemoglobina

a) Preparo da diluição concentrada do interferente

Mediu-se 5 mL de sangue total em EDTA e centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm. Eliminou-se o plasma e ressuspendeu-se o precipitado com 10 mL de solução isotônica salina (NaCl 154 mmol/L). Homogeneizou-se por inversão. Centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o processo de lavagem com solução salina mais 2 vezes. Após a lavagem, ressuspendeu-se as células centrifugadas com 2,5 mL de água purificada e misturou-se por inversão. Congelou-se a -20°C por no mínimo 12 horas. Descongelou-se e homogeneizou-se. Centrifugou-se por 30 min a 3000 rpm para eliminar os estromas celulares. Recuperou-se o sobrenadante hemolisado. Mediu-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante empregando o método de Drabkin. Ajustou-se a concentração a 100 g/L de hemoglobina utilizando como diluente água purificada.

b) Preparo do soro base

O soro base é um pool de soros que contenha o analito. Os soros selecionados para compor o pool não podem apresentar-se visualmente hemolisados, lipêmicos nem ictericos.

c) Preparo das diluições do interferente

Preparou-se as seguintes soluções:

- Soro base sem interferente (s/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL de água.
- Soro base com interferente (c/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL da diluição concentrada do interferente.

As concentrações de hemoglobina de interesse foram obtidas pela mistura dos soros base com e sem interferente, c/i e s/i, respectivamente, conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Diluições preparadas em diferentes concentrações de hemoglobina a partir de soro base com e sem o interferente.

Diluição	1	2	3	4	5	6
Soro base s/i (mL)	0,500	0,450	0,400	0,350	0,300	0,250
Soro base c/i (mL)	0,000	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250
Hemoglobina (mg/dL)	0	100	200	300	400	500

3.5.5.3. Preparo das amostras com o interferente Bilirrubina

a) Preparo da diluição concentrada do interferente

Pesou-se 10 mg de bilirrubina não-esterificada e dissolveu-se em 500 μ L de NaOH 0,1 mol/L, protegendo a solução da luz e mantendo a 2-8 °C e utilizando em um período máximo de 24 horas. A concentração final da solução é 2000 mg.dL⁻¹ (13,68 mmol/L).

b) Preparo do soro base

O soro base é um pool de soros que contenha o analito. Os soros selecionados para compor o pool não podem apresentar-se visualmente hemolisados, lipêmicos nem ictéricos.

c) Preparo das diluições do interferente

Preparou-se as seguintes misturas:

- Soro base sem interferente (s/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL de água.
- Soro base com interferente (c/i): 4,75 mL de soro base + 0,25 mL da diluição concentrada do interferente.

As concentrações de bilirrubina de interesse foram obtidas pela mistura dos soros base com e sem interferente, c/i e s/i, respectivamente, conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6. Diluições preparadas em diferentes concentrações de bilirrubina a partir de soro base com e sem o interferente.

Diluição	1	2	3	4	5	6	7
Soro base s/i (mL)	0,500	0,487	0,475	0,450	0,400	0,350	0,300
Soro base c/i (mL)	0,00	0,013	0,025	0,050	0,100	0,150	0,200
Bilirrubina (mg/dL)	0	2,5	5,0	10	20	30	40

3.5.5.4. Preparo das amostras com o interferente Fator Reumatóide

a) Preparo da diluição concentrada do interferente

Pelo método imunoturbidimétrico foi realizada a determinação da concentração de Fator Reumatoide de uma amostra concentrada. A concentração obtida foi: 560 UI/mL

b) Preparo do soro base

O soro base é um pool de soros com reação negativa para o analito em questão. Os soros selecionados não podem apresentar hemólise, lipemia ou icterícia sob inspeção visual.

c) Preparo das diluições do interferente

- Soro base sem interferente (s/i): 0,278 mL de soro base + 0,327 mL de água.
- Soro base com interferente (c/i): 0,278 mL de soro base + 0,327 mL da amostra de Fator Reumatoide
- Preparar a continuação das diluições de cada interferente de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Diluições preparadas em diferentes concentrações de fator reumatoide a partir de soro base com e sem o interferente.

Diluição	1	2	3	4	5
Soro base s/i (µL)	200	166,6	133,3	100	66,6
Soro base c/i (µL)	0	33,4	66,7	100	133,4
Fator Reumatóide (UI/mL)	0	50	100	150	200

3.5.5.5. Determinação do analito nas amostras

De acordo com o procedimento de uso do produto e com protocolo específico do equipamento, realizou-se com a determinação do analito em cada uma das diluições preparadas. Analisou-se as diluições de forma aleatória e na mesma série analítica, incluindo um controle para validar a corrida. Para cada interferente, calculou-se a porcentagem de interferência (%Int), em todas as diluições, utilizando a Equação 8.

$$\%Int = \left(\frac{C_d - C_i}{C_i} \right) \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Em que:

C_d : Média dos valores das concentrações obtidas para cada diluição com interferente.

C_i : Média da concentração obtida para a diluição 1 (s/i).

Foram adotados como parâmetros de análise da Especificidade Analítica: o limite máximo de variação permitido pela ação do interferente é de $\pm 10\%$ seguindo a metodologia de Ji e Meng (2011).

3.5.6. Repetibilidade

Os testes de repetibilidade foram realizados durante 10 dias com uma corrida por dia, sendo utilizado um lote piloto e três amostras de diferentes concentrações (alta, média e baixa). Em cada corrida, realizou-se a determinação de cinco alíquotas de cada amostra, incluindo um controle para validar a corrida. Foi adotado o seguinte critério como parâmetro de aprovação da repetibilidade: Coeficiente de Variação (CV%): $< 5\%$, seguindo a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

3.5.7. Reprodutibilidade

Os testes de reprodutibilidade foram realizados durante 5 dias com uma corrida por dia, sendo utilizado três lotes pilotos, três amostras de diferentes concentrações (alta, média e baixa) e um diferente analisador bioquímico (BS-240). Em cada corrida, realizou-se a determinação de cinco alíquotas de cada amostra, incluindo um controle para validar a corrida. Foi adotado o seguinte critério como parâmetro de aprovação da repetibilidade: Coeficiente de Variação (CV%): $< 5\%$, seguindo a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

3.5.8. Estabilidade

3.5.8.1. Estabilidade Acelerada

O Estudo de Estabilidade Acelerada foi realizado com base no princípio de que as reações químicas obedecem à equação de Arrhenius, a qual prevê que, em um processo homogêneo, um incremento de 10°C na temperatura resulta em dobrar a velocidade de degradação química (RUSSEL, 1994). Neste estudo, o produto foi submetido a uma elevação de temperatura por um período de tempo pré-determinado e avaliado quanto à capacidade de manter o seu desempenho. Por meio do estudo foi possível estimar a validade do produto, a

qual será comprovada pelo Estudo de Estabilidade em Tempo Real. O prazo de validade estimado foi obtido pela equação:

$$\text{Prazo de validade estimado} = \text{Período estudado (dias)} \cdot 2^{(T_2 - T_1)/10} \quad \text{Equação (8)}$$

Em que:

T₂ = Temperatura do Estudo

T₁ = Temperatura de Armazenamento do Produto

Para isso, utilizou-se três lotes do reagente e realizou-se a avaliação periódica dos três lotes nos seguintes períodos: Inicial, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 35 dias. O produto permaneceu armazenado em temperatura de 45°C e retirado apenas no momento da realização dos testes. Em cada período referido, realizou-se a inspeção visual e a dosagem de controles. Todos os resultados obtidos para os controles devem estar dentro dos intervalos de variação estabelecidos e o reagente deve permanecer como um líquido claro e transparente.

3.5.8.2. Estabilidade em Tempo Real

Para determinar a validade do produto por meio do estudo de estabilidade em tempo real, utilizou-se três lotes pilotos, acondicionados em frasco de vidro âmbar e armazenados em temperatura de 2 a 8°C. Realizou-se a avaliação periódica de cada um dos lotes a cada três meses no primeiro ano de estudo e, em seguida, a cada seis meses até o vencimento. Em cada período referido, realizou-se a inspeção visual e a dosagem de controles. Todos os resultados obtidos para os controles devem estar dentro dos intervalos de variação estabelecidos e o reagente deve permanecer como um líquido claro e transparente. As datas programadas para realização dos testes em Tempo Real estão indicadas no Quadro 2. Estas mesmas datas serão utilizadas para realização das estabilidades em Transporte, Uso e *Bulk*.

Quadro 2. Datas de realização da estabilidade em tempo real até a conclusão dos 18 meses a serem avaliados.

Período de teste	Data de realização
Inicial	jul/20 (realizada)
3 meses	out/20 (programado)
6 meses	jan/21(programado)
9 meses	abr/21(programado)
12 meses	jul/21(programado)
18 meses	jan/22(programado)

3.5.8.3. Estabilidade em Transporte

Com intuito de verificar a capacidade reacional do produto após ser submetido a condições simuladas de transporte, uma unidade denominada “transporte” do produto em análise foi mantida por 7 dias à 37°C, retornando após esse período ao armazenamento em temperatura de 2 a 8°C. Em paralelo, uma unidade denominada “referência” do mesmo lote do produto em análise foi mantida em temperatura de 2 a 8°C. Para verificar o impacto da condição de transporte sobre o desempenho do produto, realizou-se a determinação de pelo menos um controle e duas amostras de soro com as unidades transporte e referência nos períodos: inicial, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses. Ao final de cada teste, analisou-se os resultados obtidos evidenciando as porcentagens de variação entre as determinações das amostras obtidas pela unidade “transporte” frente à “referência”. Foram adotados os seguintes critérios como parâmetros de aprovação do estudo de estabilidade do produto em transporte: o resultado obtido na dosagem do controle para as unidades de “referência” e “transporte” deve estar dentro do intervalo de variação estabelecido, validando a corrida analítica, e o percentual da diferença (%DIF) entre os resultados obtidos para as amostras de soro com a unidade “transporte” em relação à unidade “referência” não deve ultrapassar $\pm 10\%$.

3.5.8.4. Estabilidade em Uso

Para verificar a capacidade reacional do produto em uso (estabilidade do produto após aberto), separou-se uma alíquota de um lote piloto do reagente em frasco de vidro âmbar e acondicionou-se em temperatura de 2 a 8°C. Realizou-se a avaliação periódica do produto a cada três meses no primeiro ano de estudo e em seguida, a cada 6 meses até o vencimento pretendido. O reagente permaneceu armazenado em temperatura de 2 a 8°C e foi retirado apenas no momento da realização dos testes. Em cada período referido, realizou-se a inspeção visual e a dosagem de controles. Todos os resultados obtidos para os controles devem estar dentro dos intervalos de variação estabelecidos e o reagente deve permanecer como um líquido claro e transparente.

3.5.8.5. Estabilidade em Bulk

Para realizar o estudo de estabilidade do produto em *bulk*, acondicionou-se o reagente em um boeco transparente de boro 3,3 de 250 mL em temperatura de 2 a 8°C. Realizou-se a avaliação periódica do produto a cada três meses no primeiro ano de estudo e, em seguida, a cada seis meses até o vencimento pretendido. O reagente permaneceu armazenado em temperatura de 2 a 8°C e foi retirado apenas no momento da realização dos testes. Em cada período referido, realizou-se a inspeção visual e a dosagem de controles. Todos os resultados obtidos para os controles devem estar dentro dos intervalos de variação estabelecidos e o reagente deve permanecer como um líquido claro e transparente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sensibilidade

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado para a análise de sensibilidade (Controle Multi Médio) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos durante os 3 dias, validando as corridas analíticas, conforme ilustrado no Quadro 3 e a Figura 4.

Figura 4. Curva de calibração do teste de sensibilidade

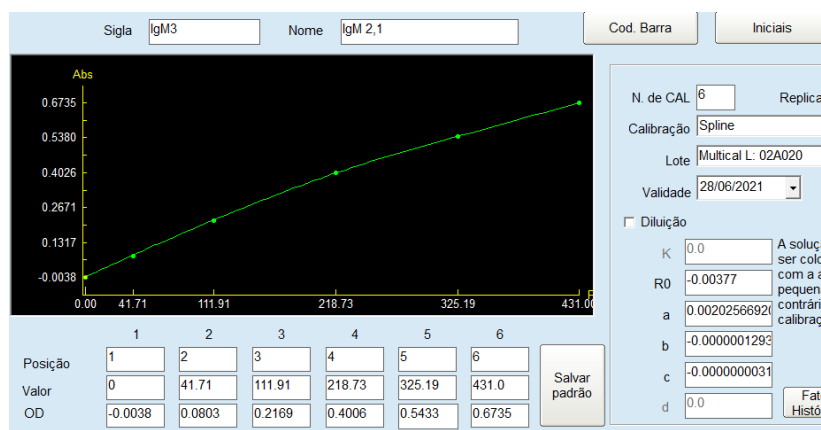


Figura 4. Na imagem da calibração resultante gerada pelo equipamento é possível se observar a densidade ótica ou absorbância (OD) e o valor de concentração de IgM (mg.dL^{-1}) obtida em para cada uma das 6 diluições preparadas para a calibração do teste de sensibilidade. A curva padrão gerada é indicada pela linha verde e os parâmetros da equação associada estão indicados a direita pelas letras a,b, c.

Quadro 3. Relatório de controles utilizados durante os 3 dias de teste de sensibilidade contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

Dia 1: 13/07/2020							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL ⁻¹)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,78	150,10	148,96	149,13
Dia 2: 14/07/2020							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL ⁻¹)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,78	159,00	157,87	154,27
Dia 3: 15/07/2020							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL ⁻¹)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,78	152,52	157,42	152,04

A partir das 21 determinações, realizadas durante 3 dias, no branco e na amostra com concentração baixa, obteve-se o limite de detecção (LoD) e o limite de quantificação (LoQ) do método, apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Média aritmética (X_0), desvio padrão (σ_0), LoD e LoQ resultantes das 21 determinações realizadas durante os 3 dias de análise.

LoD (mg/dL)			LoQ (mg/dL)		
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
0,28	0,00	0,00	14,01	14,08	14,46
0,13	0,06	0,00	14,02	14,09	14,15
0,87	0,00	0,00	14,16	14,01	14,15
0,16	0,00	0,00	13,96	14,16	14,12
0,17	0,05	0,00	14,14	14,07	14,20
0,33	0,00	0,27	13,99	13,80	13,97
0,39	0,18	0,19	14,10	14,02	14,16
X ₀ =	0,147		X ₀ =	14,087	
σ ₀ =	0,208		σ ₀ =	0,127	
K =	3,3		K =	10	
LoD = X ₀ + K x σ ₀			LoQ = X ₀ + K x σ ₀		
LoD =	0,832		LoQ =	15,357	

Analisando a variação percentual (%DIF) entre o valor médio obtido para a amostra baixa (14,087 mg.dL⁻¹), seu valor teórico (13,940 mg.dL⁻¹) e o coeficiente de variação (%CV) das 21 determinações, obtivemos a porcentagem de 1,052 % e 0,902%, para a variação

percentual e para o coeficiente de variação, respectivamente. Ambos os resultados apresentam um valor dentro do critério de aceitabilidade proposto na metodologia de até 10%, indicando um resultado positivo para o teste de sensibilidade.

Também é importante ressaltar que o limite de quantificação obtido ($15,357 \text{ mg.dL}^{-1}$) apresenta uma margem significativa abaixo ao limite inferior da faixa de referência da imunoglobulina M que é de 40 a 230 mg.dL^{-1} (GONZALEZ-QUINTELA et al., 2007) o que garante mais segurança e precisão nos diagnósticos, principalmente nos casos de carência do anticorpo.

4.2.Linearidade

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado para a análise de linearidade (Bio Rad nível 2, L:68902) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 5 e a Figura 5.

Figura 5. Calibração do teste de linearidade

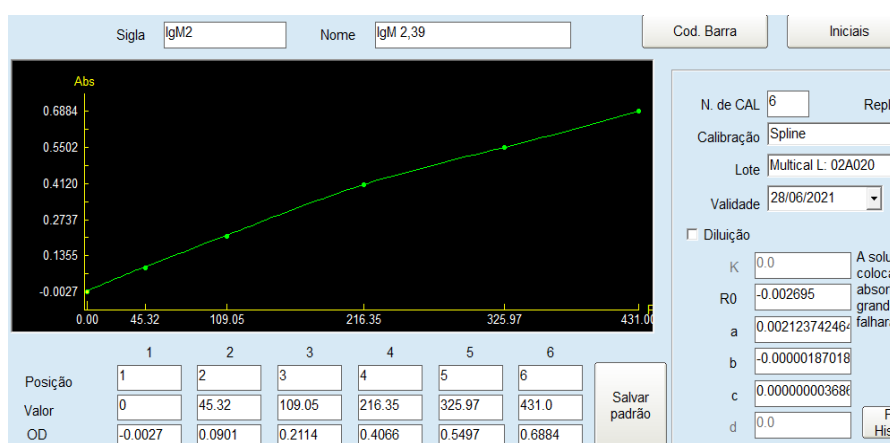


Figura 5. Na imagem da calibração resultante gerada pelo equipamento é possível se observar a densidade ótica ou absorvância (OD) e o valor de concentração de IgM (mg.dL^{-1}) obtida para cada uma das 6 diluições preparadas para a calibração do teste de linearidade. A curva padrão gerada é indicada pela linha verde e os parâmetros da equação associada estão indicados a direita pelas letras a,b, c.

Quadro 5. Relatório de Controle utilizado para validação da calibração no teste de linearidade contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL^{-1})		
			Mín	Máx			
Bio Rad 2	68902	out/20	88,40	132,00	111,42	114,66	113,17

A Tabela 9 ilustra o valor teórico das 11 diluições do teste de linearidade calculados a partir da valoração da amostra baixa e da amostra baixa (Tabela 8), os valores obtidos da triplicata da leitura de cada diluição e o desvio da linearidade.

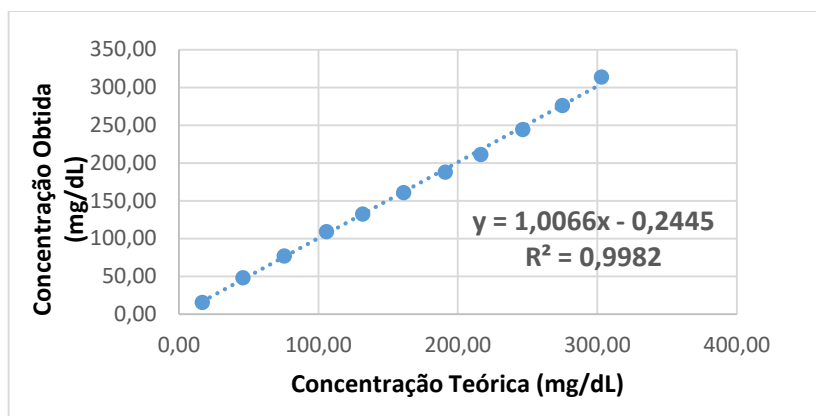
Tabela 8. Valoração da Amostra Baixa e da Amostra Alta a partir de leituras em quintuplicata.

Amostra Baixa (mg/dL)		Amostra alta (mg/dL)	
Replicata 1	16,95	Replicata 1	309,82
Replicata 2	16,48	Replicata 2	301,18
Replicata 3	17,04	Replicata 3	304,49
Replicata 4	16,72	Replicata 4	300,97
Replicata 5	16,40	Replicata 5	298,73
Média	16,72	Média	303,04

Tabela 9. Valor teórico, valor obtido e desvio da linearidade obtido para cada uma das 11 diluições preparadas.

Amostras	Valores teóricos (mg/dL)	Valores obtidos (mg/dL)				
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Média	Erro (%)
-						
Amostra Baixa	16,72	15,76	16,02	15,97	15,92	-4,8
0,1 AA + 0,9 AB	45,87	48,52	48,07	48,13	48,24	5,2
0,2 AA + 0,8 AB	75,62	76,88	76,43	78,29	77,20	2,1
0,3 AA + 0,7 AB	105,79	111,89	107,82	108,74	109,48	3,5
0,4 AA + 0,6 AB	131,88	133,18	133,43	130,64	132,42	0,4
0,5 AA + 0,5 AB	161,13	163,76	160,70	158,61	161,02	-0,1
0,6 AA + 0,4 AB	191,04	190,18	187,19	186,84	188,07	-1,6
0,7 AA + 0,3 AB	216,52	206,60	212,46	215,17	211,41	-2,4
0,8 AA + 0,2 AB	246,53	243,40	244,84	245,03	244,42	-0,9
0,9 AA + 0,1 AB	275,00	281,06	276,81	270,30	276,06	0,4
Amostra Alta	303,04	312,48	315,63	313,37	313,83	3,6

Por meio do Gráfico 2, pode-se observar que nenhum erro associado às determinações realizadas ultrapassou o erro permitido (%DL) para a análise de linearidade. Ainda, por meio da regressão linear exposta no Gráfico 1 e Tabela 11, pode-se verificar que os parâmetros da equação obtida atendem aos critérios de aceitabilidade pré-estabelecidos e os valores teóricos apresentam boa correlação com os valores obtidos ($R^2 = 0,9982$). Por fim, observando que o p-valor obtido foi inferior ao nível de significância pré-determinado ($< 0,05$), confirmou-se a linearidade do produto em teste. Assim, o intervalo operacional estabelecido para o lote em estudo é de 16,72 a 303,04 mg.dL⁻¹.

Gráfico 1. Regressão Linear obtida para o teste de linearidade.**Tabela 10. Teste de significância da correlação**

Parâmetros	Obtido
Coefficiente angular (a)	1,0066
Intercepto (b)	-0,2445
Coefficiente de Correlação (R)	0,9991
Número de amostras (n)	11
Graus de Liberdade (GL)	9
Nível de significância (α)	5%
t0	69,70631
p-valor	1,3E-13

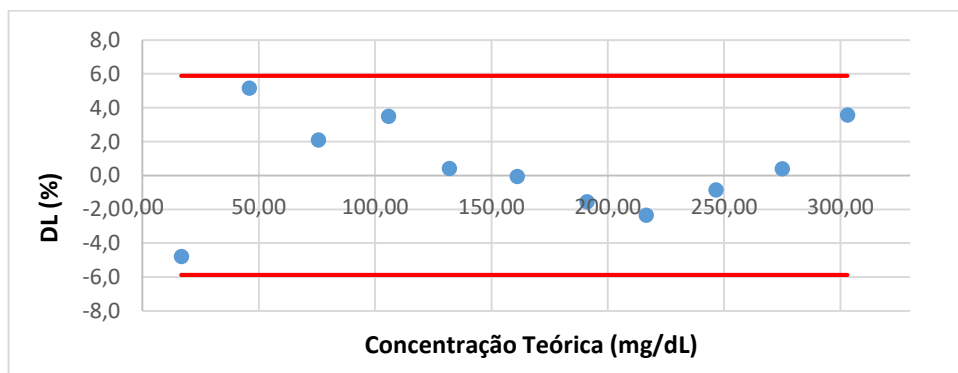
Gráfico 2. Gráfico de Resíduos (desvio da linearidade das 11 diluições).

Gráfico 2. As linhas avermelhadas representam o limite máximo permitido para o desvio da linearidade (35%do erro total do analito = $\pm 5,88\%$) e os pontos em azul o erro obtido em cada uma das diluições.

4.3.Efeito prozona de alta dose

A calibração do teste foi realizada e os controles utilizados para a análise de prozona de alta dose (Bio Rad nível 1, L:68902 e Controle Multi Médio L:02C290) apresentaram-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 6 e a Figura 6.

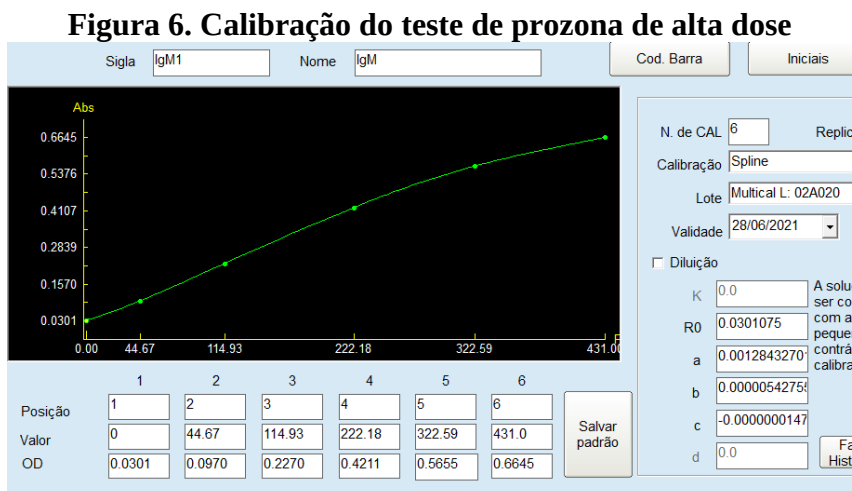


Figura 6. Na imagem da calibração resultante gerada pelo equipamento é possível se observar a densidade ótica ou absorbância (OD) e o valor de concentração de IgM (mg.dL⁻¹) obtida em para cada uma das 6 diluições preparadas para a calibração do teste de prozona. A curva padrão gerada é indicada pela linha verde e os parâmetros da equação associada estão indicados a direita pelas letras a,b, c.

Quadro 6. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de prozona, contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL ⁻¹)		
			Mín	Máx			
Bio Rad 1	68901	out/20	49,79	69,90	57,44	57,25	57,85
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	146,74	139,81	145,68

A valoração da amostra com alta concentração de IgM calculada a partir das diluições de 1:8 e 1:10 é representada na Tabela 11, resultando em uma concentração de 549,01 mg.dL⁻¹ de IgM. A partir desta valoração obteve-se os valores teóricos e obtidos (reais) da curva de diluição do teste de prozona de alta dose, conforme ilustrado na Tabela 12

Tabela 11. Leituras em quintuplicata em duas diferentes diluições para valoração da amostra com alta concentração de IgM.

Diluição	Concentração(mg/dL)
1:10,43	51,22
	53,62
	51,45
	51,65
	52,20
1:8,39	65,32
	65,66
	67,70
	65,83
	66,57

Tabela 12. Valores teóricos e obtidos em cada ponto da curva de diluição preparada para o teste de prozona de alta dose.

Curva de Diluição				
Diluição	P1 (mg)	P2 (mg)	Fator de Diluição	Valor Teórico (mg/dL)
12,50%	27,3	174,8	0,14	74,16
25%	57,8	149,1	0,28	153,37
50%	102,2	100,5	0,50	276,81
75%	149,3	50,9	0,75	409,43
100%	200	0	1	549,01

Concentração das Amostras				
Diluição	Triplicatas (valor obtido)			Média
12,50%	74,37	74,66	75,86	75,26
25%	162,52	161,48	163,09	162,29
50%	269,16	263,83	260,93	262,38
75%	405,10	394,82	400,69	397,76
100%	473,56	477,18	472,86	475,02

Tabela 12. *P1: Partes de Solução concentrada (em mg) e P2: Partes de Água Purificada (em mg).

Analisando as respostas em absorbância de IgM, podemos observar que até o valor de concentração de 549.01 mg.dL⁻¹, as respostas em concentração, mesmo que falsamente baixas, mostraram-se maiores que a resposta em concentração da linearidade do reagente (303,04 mg.dL⁻¹), efeito que pode ser melhor analisado por meio do Gráfico 3. Assim, definiu-se que, para o lote em estudo, não há ocorrência de efeito prozona de alta dose até concentrações de 549.01 mg.dL⁻¹ de IgM, todavia, é possível observar que em altas concentrações a medida que se aumenta a concentração teórica da amostra de IgM, menor é a concentração obtida, sinalizando o efeito prozona.

Gráfico 3. Tendência de surgimento do efeito prozona a medida que se eleva a concentração do analito

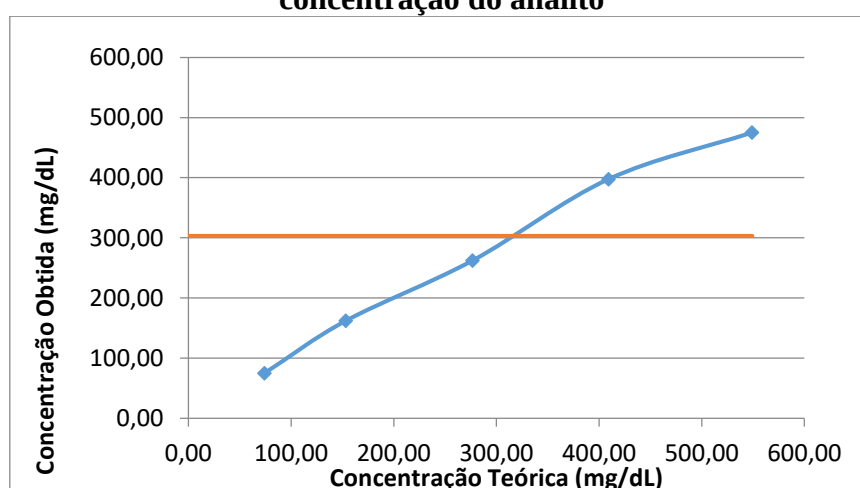


Gráfico 3. A linha alaranjada representa o limite superior da linearidade e a linha azul a curva gerada plotando-se a concentração teórica *versus* a concentração obtida dos pontos de diluição preparados. Pode-se observar uma diminuição do sinal ocorre a medida que as concentrações do analito começam a ficar muito elevadas. Quando essa perda de sinal se torna elevada o suficiente para que a curva representada em azul cruze a linha da linearidade (linha laranja), falsos resultados podem ser obtidos dentro da faixa de linearidade indicando a ocorrência do efeito prozona ou efeito gancho.

Considerando o limite superior da faixa de referência da imunoglobulina M que é de 40 a 230 mg.dL⁻¹ (GONZALEZ-QUINTELA et al., 2007), podemos considerar o valor de 549,01 mg.dL⁻¹ para o teste de prozona como um valor aceitável por representar um valor bem alto de IgM, representando quase o dobro do limite superior da linearidade (303,04 mg.dL⁻¹). É válido ressaltar que na rotina laboratorial, amostras cujas concentrações estão acima da linearidade do reagente devem ser diluídas visando obter um resultado preciso (BIOTÉCNICA, 2015).

Analisando o gráfico 3, é possível observar que resultados ainda melhores podem ser obtidos tendo em vista que o último ponto da linha azul (549 mg.dL⁻¹) ainda se encontra acima da linha alaranjada, possibilitando a comprovação de não ocorrência do efeito prozona até níveis mais elevados de IgM. Todavia, o elevado custo para obtenção de amostras altamente concentradas e purificadas com o analito tornam o processo inviável economicamente se comparado ao benefício que tal resultado retornaria, tendo em vista que 549 mg.dL⁻¹ já é considerado um valor aceitável para o teste de prozona.

4.4. Exatidão

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado, durante os 3 dias, para o teste de exatidão (Bio Rad nível 2, L:68902) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 7 e a Figura 7

Figura 7. Calibração do teste de exatidão

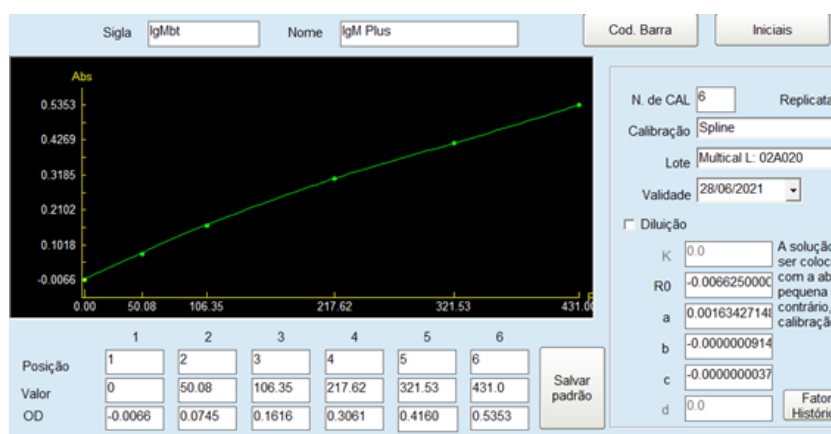


Figura 7. Na imagem da calibração resultante gerada pelo equipamento é possível se observar a densidade ótica ou absorbância (OD) e o valor de concentração de IgM (mg.dL⁻¹) obtida em para cada uma das 6 diluições preparadas para a calibração do teste de exatidão. A curva padrão gerada é indicada pela linha verde e os parâmetros da equação associada estão indicados a direita pelas letras a,b, c.

Quadro 7. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de exatidão do produto em desenvolvimento e do kit de referência (IgM Plus), contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle durante os 3 dias de análise.

BioTécnica								
Data das corridas	Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL⁻¹)		
				Mín	Máx			
15/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	115,93	115,14	112,85
16/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	113,05	112,88	111,94
17/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	114,18	110,29	109,45
IgM Plus - BioTécnica								
Data das corridas	Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL⁻¹)		
				Mín	Máx			
15/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	109,59	110,01	113,21
16/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	108,54	109,27	104,62
17/07/2020	Bio Rad 2	68902	01/10/2020	88,4	132	112,04	111,17	110,93

Os resultados de leitura de amostras de soro humano utilizando-se um lote piloto do produto em desenvolvimento com um kit de referência devidamente regulamentado disponível no mercado é ilustrado no Quadro 8.

Quadro 8. Leitura de amostras de soro humano de um lote piloto do produto em desenvolvimento (BioTécnica) em comparação com um kit de referência (IgM Plus). O quadro apresenta o lote e validade dos reagentes, a identificação de cada amostra de soro humano (sequência de letras) e a diferença de leitura entre os reagentes (%DIF).

1º Dia - 15/07/2020								
IgM Plus – BioTécnica				BioTécnica				
Lote:	06H030	Validade:	out/21	Lote:	IgMa1507	Validade:	jan/22	%DIF
Amostra	Replicata 1	Replicata 2	Média	Amostra	Replicata 1	Replicata 2	Média	
JARG	106,58	106,52	106,55	JARG	106,01	105,31	105,66	-0,8
IRS	116,89	111,44	114,17	IRS	111,84	113,70	112,77	-1,2
SGA	107,20	104,09	105,65	SGA	103,39	103,68	103,54	-2,0
DDAN	70,24	68,72	69,48	DDAN	64,10	62,14	63,12	-9,2
LBS	75,10	78,65	76,88	LBS	73,52	73,53	73,53	-4,4
RSF	79,69	76,56	78,13	RSF	81,19	78,76	79,98	2,4
DCT	264,49	262,10	263,30	DCT	245,44	262,57	254,01	-3,5
LMR	185,22	181,55	183,39	LMR	176,35	176,61	176,48	-3,8
WHC	235,07	238,10	236,59	WHC	228,66	238,93	233,80	-1,2
OOB	17,69	17,00	17,35	OOB	17,42	17,07	17,25	-0,6
ACMS	15,30	14,78	15,04	ACMS	13,56	13,60	13,58	-9,7
JLS	29,02	28,64	28,83	JLS	30,51	29,32	29,92	3,8
RDSC	30,19	29,70	29,95	RDSC	28,02	28,14	28,08	-6,2
SAB	156,16	153,65	154,91	SAB	150,13	147,80	148,97	-3,8
AOG	71,50	71,30	71,40	AOG	68,97	69,90	69,44	-2,8
AAS	212,94	215,10	214,02	AAS	209,04	207,23	208,14	-2,7
MCSR	235,10	233,73	234,42	MCSR	233,89	233,96	233,93	-0,2
2º Dia - 16/07/2020								
EO	58,94	56,89	57,92	EO	51,59	52,33	51,96	-10,3
DJS	130,48	129,69	130,09	DJS	101,31	101,79	101,55	-21,9
JET	246,82	246,93	246,88	JET	208,42	204,60	206,51	-16,4
ACG	121,69	120,30	121,00	ACG	107,38	108,40	107,89	-10,8
MCSR	56,56	57,51	57,04	MCSR	54,60	54,69	54,65	-4,2
LRMS	33,61	34,81	34,21	LRMS	34,07	34,05	34,06	-0,4
CLS	111,65	110,29	110,97	CLS	112,16	111,69	111,93	0,9
NNR	36,12	36,60	36,36	NNR	30,81	31,13	30,97	-14,8
3º Dia - 17/07/2020								
PHL	210,45	214,13	212,29	PHL	213,48	206,51	210,00	-1,1
MIRC	200,42	206,64	203,53	MIRC	196,29	204,93	200,61	-1,4
JJP	157,66	158,80	158,23	JJP	149,09	142,59	145,84	-7,8
JRGR	32,83	31,97	32,40	JRGR	25,78	25,49	25,64	-20,9
DMPO	76,55	74,09	75,32	DMPO	67,82	66,14	66,98	-11,1
TMSO	233,18	229,08	231,13	TMSO	240,66	238,09	239,38	3,6
ISM	114,88	114,14	114,51	ISM	121,65	121,11	121,38	6,0
AHS	34,37	34,36	34,37	AHS	34,31	33,67	33,99	-1,1
MDM-	156,61	158,87	157,74	MDM-	147,01	147,65	147,33	-6,6
AAMO	30,94	29,52	30,23	AAMO	31,31	30,91	31,11	2,9

Quando 8. * A unidade das duplicatas e das média encontradas é mg.dL⁻¹.

O gráfico de correlação entre o lote do produto em desenvolvimento e o kit comercial (IgM Plus) comparando as 35 amostras foi gerado e o teste de significância foi realizado a partir dos parâmetros obtidos pela reta, conforme ilustrado no Gráfico 4 e Tabela 13.

Gráfico 4. Gráfico de Correlação

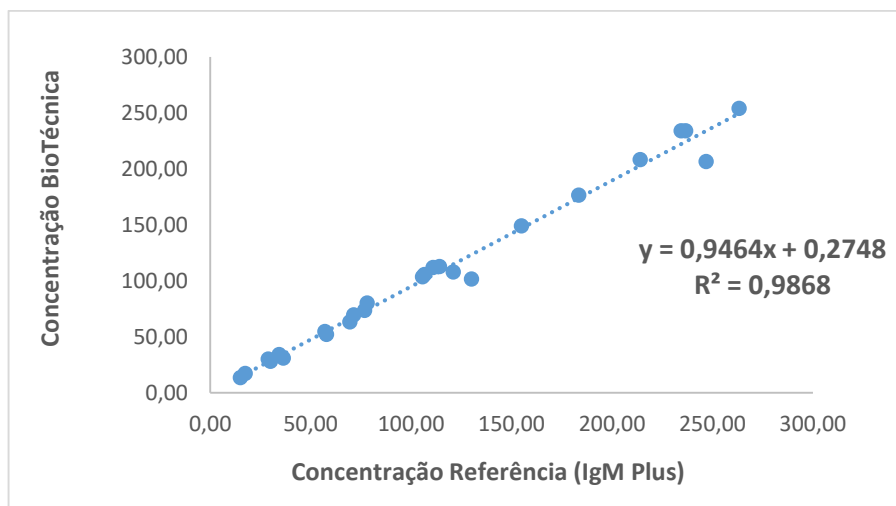


Gráfico 4. O gráfico plota as concentrações obtidas pelo reagente em desenvolvimento versus as concentrações obtidas com a reagente referência gerando uma correlação entre eles e a equação da reta. Enquanto mais próximo de 1 o coeficiente angular e enquanto mais próximo de 0 o coeficiente linear melhor será a exatidão do método e a correlação entre os reagentes.

Tabela 13. Análise dos parâmetros obtidos em comparação com os critérios de aceitabilidade estabelecidos.

Parâmetros	Critério de aceitabilidade	Obtido
Coefficiente angular	0,9 - 1,1	0,9464
Intercepto	< LoQ	0,2748
R	> 0,9901	0,9934
p-valor	< 0,05	1,39E-32

Analisando os parâmetros obtidos da equação da reta pôde-se observar que todos critérios de aceitabilidade foram aprovados. Além disso, observou-se que o p-valor obtido foi inferior ao nível de significância pré-determinado, confirmando a correlação do produto em teste frente ao produto referência.

Utilizando a equação da reta obtida no Gráfico 3, o erro inerente ao sistema para diferentes níveis de decisão foi calculado. Encontrou-se um erro metodológico total estimado de -4.7% para um nível de 40 mg.dL⁻¹, -5.2% para um nível de 230 mg.dL⁻¹ e -5.3% para um nível de 300 mg.dL⁻¹. Estes resultados demonstram que os erros encontrados foram menores que o erro total para o analito que é $\pm 16,8\%$ (WESTGARD, 2004).

4.5. Especificidade Analítica

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado para a análise de interferentes (Controle Multi Médio L:02C290) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 9 e a Figura 8.

Figura 8. Calibração do teste de especificidade analítica

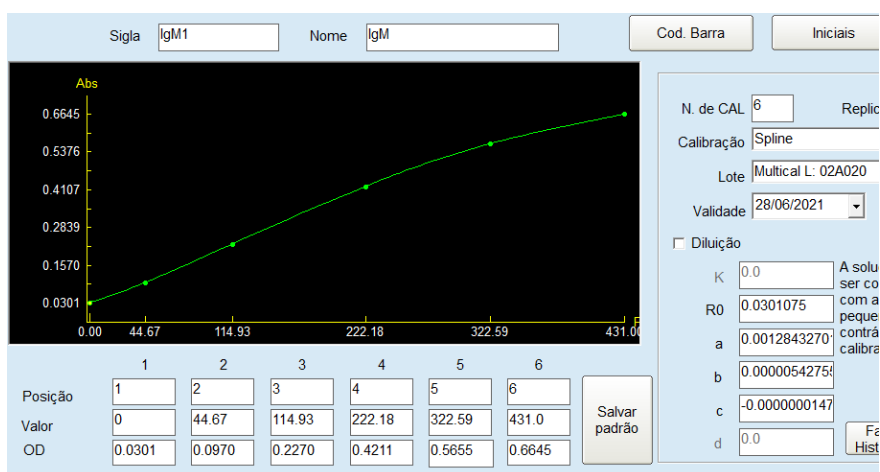


Figura 8. Na imagem da calibração resultante gerada pelo equipamento é possível se observar a densidade ótica ou absorbância (OD) e o valor de concentração de IgM (mg.dL^{-1}) obtida em para cada uma das 6 diluições preparadas para a calibração do teste de especificidade analítica. A curva padrão gerada é indicada pela linha verde e os parâmetros da equação associada estão indicados a direita pelas letras a,b, c.

Quadro 9. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de interferentes, contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

Amostra	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg.dL^{-1})		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	147,15	142,46	144,35

A média de concentração de IgM obtida para cada diluição preparada para os interferentes analisados bem como a porcentagem de interferência gerada em cada diluição é ilustrada no Quadro 10.

Quadro 10. Concentração média de IgM obtida e porcentagem da interferência gerada em cada diluição preparada a medida que se aumenta a concentração de diferentes interferentes (Triglicérides, Hemoglobina, Bilirrubina e Fator Reumatóide).

TRIGLICÉRIDES										
Diluição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Triglicérides (mg/dL)	0	150	350	500	700	900	1000	1250	1500	2000
Média Obtida (mg/dL)	177,97	175,30	174,98	175,69	173,05	175,25	175,96	175,50	167,61	175,97
% Interferência	0	-1,50	-1,68	-1,28	-2,76	-0,03	0,56	-0,11	-3,14	0,41
HEMOGLOBINA										
Diluição				1	2	3	4	5	6	7
Hemoglobina (mg/dL)				0	50	100	150	200	300	500
Média Obtida (mg/dL)				160,79	163,24	173,87	177,17	183,36	189,33	212,68
% Interferência				0	1,52	8,13	10,19	14,04	15,98	22,32
BILIRRUBINA										
Diluição				1	2	3	4	5	6	7
Bilirrubina (mg/dL)				0	2,5	5	10	20	30	40
Média Obtida (mg/dL)				114,17	115,37	117,00	120,39	123,00	134,40	145,42
% Interferência				0	1,05	2,48	5,45	7,73	16,49	24,29
FATOR REUMATOIDE										
Diluição						1	2	3	4	5
Fator reumatoide (UI/mL)						0	50	100	150	200
Média Obtida (mg/dL)						191,17	192,75	200,98	209,65	213,84
% Interferência						0	0,83	5,13	9,67	11,86

Tendo em vista, o limite máximo de variação permitido pela presença do interferente de $\pm 10\%$, foi possível demonstrar que o lote testado do reagente em desenvolvimento é específico até as seguintes concentrações de interferentes: 2000 mg.dL⁻¹ de triglicérides, 100 mg.dL⁻¹ de hemoglobina, 20 mg.dL⁻¹ de bilirrubina e 150 UI.mL⁻¹ de fator reumatoide.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) (2016), o nível desejado de triglicérides no soro é menor 150 mg.dL⁻¹ com jejum ou menor que 175 mg.dL⁻¹ mg.dL⁻¹ sem jejum, dessa forma, é possível observar que o reagente em desenvolvimento conseguiu performar bem mesmo em níveis de triglicérides extremamente elevados (2000 mg.dL⁻¹).

A hemólise ocorre devido à presença para a hemoglobina livre em concentrações acima de 30 mg.dL⁻¹, o que confere uma tonalidade avermelhada ao soro (LIPPI, et al., 2008; DAVES, et al., 2012). Assim, o valor de 100 mg.dL⁻¹ obtido garante que mesmo em casos de erros de coleta ou manipulação, o reagente opere sem interferências.

Já a icterícia torna-se evidente quando a concentração plasmática de bilirrubina encontra-se acima de 2,5 a 3,0 mg.dL⁻¹ (MARTELLI, 2012). Dessa forma, o diagnóstico para

peessoas ou pacientes com problemas hepáticos, biliares ou outras enfermidades que alterem os níveis de bilirrubina não sofrerá alteração tendo em vista que o reagente atingiu um nível de não interferência até 20 mg.dL⁻¹ de bilirrubina.

Em casos de pessoas com artrite reumatoide/vasculite reumatóide que podem apresentar concentração de fator reumatoide de até três vezes o limite superior da normalidade (20 UI.mL⁻¹) (PECLY et al., 2015) foi possível demonstrar que o reagente em desenvolvimento apresentou boa performance sendo específico até a concentração de 150 UI.mL⁻¹ de fator reumatoide.

4.6. Repetibilidade

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado, durante os 10 dias, para o teste de repetibilidade (Controle Multi Médio, L:02C290) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 11.

Quadro 11. Relatório de Controles utilizados para validação da calibração na análise de repetibilidade durante os 10 dias em mg.dL⁻¹.

Intervalor de Variação (Min:117,38 - Máx: 164,79)					
	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Data	21/07/2020	22/07/2020	23/07/2020	24/07/2020	27/07/2020
Replicata 1	135,45	136,54	138,55	136,90	136,84
Replicata 2	134,74	137,44	136,90	135,32	137,94
Replicata 3	133,98	137,73	136,21	135,45	136,56
	6° DIA	7° DIA	8° DIA	9° DIA	10° DIA
Data	28/07/2020	29/07/2020	30/07/2020	31/07/2020	03/08/2020
Replicata 1	137,21	138,52	135,98	138,63	136,35
Replicata 2	138,10	136,83	135,71	135,70	136,49
Replicata 3	136,49	135,57	136,05	137,85	135,16

O resultado obtido para as alíquotas das amostras alta, média e baixa, durante os 10 dias de análise, encontra-se exposto no Quadro 12.

Quadro 12. Concentração de IgM obtida em quintuplicata durante 10 dias para as alíquotas das amostras alta, média e baixa preparadas.

	Resultados em mg/dL				Resultados em mg/dL		
	AB	AM	AA		AB	AM	AA
1º DIA 21/07/2020	63,15	145,70	261,93	6º DIA 28/07/2020	63,58	146,41	266,00
	62,14	145,81	258,70		63,42	146,69	262,46
	62,12	145,20	258,43		64,03	145,43	263,11
	62,21	145,18	260,14		63,88	146,24	260,16
	63,35	145,04	258,07		63,88	147,32	262,92
2º DIA 22/07/2020	62,70	145,73	260,46	7º DIA 29/07/2020	63,66	144,99	262,80
	62,48	146,25	258,49		63,73	146,52	263,12
	62,38	145,72	261,43		63,12	144,66	263,47
	62,72	144,71	259,87		63,56	146,15	262,56
	62,69	146,52	258,10		64,54	145,99	262,07
3º DIA 23/07/2020	63,79	145,24	259,86	8º DIA 30/07/2020	64,68	147,02	264,46
	64,25	145,92	260,59		63,33	145,21	262,02
	63,29	146,16	259,32		64,37	145,92	263,81
	63,74	146,52	260,56		64,82	145,10	261,74
	62,78	147,79	261,11		64,78	145,48	262,47
4º DIA 24/07/2020	64,41	145,58	260,89	9º DIA 31/07/2020	64,62	146,87	264,67
	64,43	146,54	261,01		65,49	145,71	264,16
	63,97	146,64	259,04		64,79	148,62	264,93
	63,89	146,70	259,33		64,93	146,11	263,82
	63,53	148,50	258,84		64,16	148,26	263,94
5º DIA 27/07/2020	63,91	147,05	261,81	10º DIA 03/08/2020	63,88	147,13	268,50
	63,74	148,32	257,64		64,13	143,08	263,44
	63,33	147,24	260,84		64,21	146,13	265,57
	63,72	147,40	262,59		64,25	146,54	263,89
	64,12	146,70	260,18		64,75	147,80	263,22
AB = Amostra Baixa, AM = Amostra Média, AA = Amostra Alta							

Analisando o Quadro 11, podemos observar que o método apresentou a capacidade de repetir um resultado nas mesmas amostras, ensaiadas no mesmo local, com mesmos equipamentos e mesmo operador. O coeficiente de variação e o desvio padrão da média total de cada amostra, ilustrados na Tabela 14, demonstram a precisão intraensaio do método e que este atendeu aos critérios de aceitabilidade estabelecidos (CV <5%).

Tabela 14. Coeficiente de variação e o desvio padrão obtido da média total de cada amostra resultante dos 10 dias de análise.

Parâmetros	Amostra Baixa	Amostra Média	Amostra Alta
Média Total	63,75	146,27	261,77
DP Total	0,79	1,09	2,34
%CV	1,2%	0,7%	0,9%

Tabela 14. *DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação

4.7. Reprodutibilidade

A calibração do teste foi realizada e o controle utilizado, durante os 5 dias, para o teste de reprodutibilidade (Controle Multi Médio, L:02C290) apresentou-se dentro dos intervalos de referência exigidos, validando as corridas analíticas, conforme demonstra o Quadro 13.

Quadro 13. Relatório de Controle utilizado para validação da calibração na análise de reprodutibilidade durante os 5 dias em mg.dL⁻¹ com os 3 pilotos.

Controle Multi Médio (L:02C290)			
Intervalo de Variação			
Min:	117,38	Máx:	164,79
Piloto	Piloto 1	Piloto 2	Piloto 3
Dia 1 21/07/2020	134,68	133,22	134,15
	134,09	133,28	135,84
	135,02	135,18	135,36
Dia 2 22/07/2020	134,87	136,96	137,58
	134,77	137,47	137,37
	136,2	136,57	137,79
Dia 3 23/07/2020	136,24	135,76	136,00
	135,85	136,93	135,82
	135,73	137,10	135,48
Dia 4 24/07/2020	137,19	135,70	135,10
	135,62	136,25	131,42
	134,15	135,37	135,57
Dia 5 27/07/2020	136,18	135,52	135,15
	135,42	135,88	136,72
	135,96	135,32	136,49

O resultado obtido para as alíquotas das amostras alta, média e baixa, durante os 5 dias de análise, é ilustrado no Quadro 14.

Quadro 14. Concentração de IgM obtida durante 5 dias de análise para as alíquotas das amostras alta, média e baixa em três diferentes pilotos.

Datas	Resultados em mg/dL								
	Amostra Baixa			Amostra Média			Amostra Alta		
	Piloto 1	Piloto 2	Piloto 3	Piloto 1	Piloto 2	Piloto 3	Piloto 1	Piloto 2	Piloto 3
1º DIA 21/07/2020	63,10	61,26	61,71	145,37	145,69	145,29	257,18	263,14	257,24
	61,90	61,37	61,61	145,13	145,45	144,88	257,43	262,36	258,12
	62,17	61,28	60,81	144,44	145,35	145,62	260,79	263,47	256,06
2º DIA 22/07/2020	61,91	61,68	62,55	145,10	145,84	146,11	262,43	262,79	258,62
	61,95	61,90	63,40	143,77	145,59	145,22	258,17	265,18	255,92
	61,53	61,56	63,60	144,92	145,99	145,56	258,96	262,36	259,46
3º DIA 23/07/2020	62,76	62,56	63,27	143,74	146,47	147,20	260,90	261,27	259,06
	62,77	62,49	63,36	143,46	145,27	146,79	261,41	263,52	260,66
	62,94	62,97	62,71	144,37	144,97	146,64	260,74	264,69	260,70
4º DIA 24/07/2020	62,72	62,36	63,80	145,11	145,70	145,38	260,78	263,81	259,36
	63,06	62,36	63,85	144,74	146,84	146,63	258,56	265,76	258,43
	62,60	62,73	63,20	144,87	147,66	147,13	259,83	261,80	262,24
5º DIA 27/07/2020	62,52	62,03	64,38	145,15	147,01	147,26	262,12	262,18	260,50
	62,96	62,72	63,63	145,67	146,06	146,71	263,50	262,99	260,20
	62,65	62,38	63,85	145,66	146,88	147,88	264,08	261,23	259,69

Analisando o Quadro 13, podemos observar que o método demonstrou a capacidade de reproduzir um resultado nas mesmas amostras, com equipamentos diferentes, utilizando três lotes diferentes e operadores diferentes. O coeficiente de variação e o desvio padrão da média total de cada amostra, ilustrados na Tabela 15, demonstram a precisão interensaio do método e que este atendeu aos critérios de aceitabilidade estabelecidos ($CV < 5\%$).

Tabela 15. Coeficiente de variação e o desvio padrão da média total resultante de cada amostra durante os 5 dias de análise.

Parâmetros	Amostra Baixa	Amostra Média	Amostra Alta
Média Total	62,55	145,70	260,88
DP Total	0,80	1,03	2,41
%CV	1,3%	0,7%	0,9%

Tabela 15. DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação

4.8. Estudo de Estabilidade

4.8.1. Estabilidade Acelerada

Após 35 dias, o teste de estabilidade acelerada foi finalizado para os três pilotos avaliados e o resultado dos controles podem ser visualizados nos Quadros 15 , 16 e 17.

Quadro 15. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 1 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 1 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	139,95	141,75	137,55
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	92,66	91,10	92,20
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	168,37	164,50	166,70
Radox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	242,38	244,56	233,10
14 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	143,14	140,73	139,68
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	55,97	54,26	55,44
Biorad 2	68902	out/20	88,40	132,00	113,81	110,19	111,86
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	83,16	83,05	84,07
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	158,97	169,76	159,77
Radox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	235,30	228,97	236,38
21 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	84,53	80,61	83,43
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	163,19	167,01	159,06
28 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	50,52	50,27	49,98
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	150,67	150,78	150,59
35 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	55,15	55,73	55,33
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	157,51	152,46	153,88

Quadro 16. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 2 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 2 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	148,01	146,20	143,74
Randox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	94,84	92,61	93,40
Randox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	173,98	171,89	175,18
Randox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	245,23	242,80	238,09
14 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	142,43	141,05	142,00
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	56,02	53,51	55,18
Biorad 2	68902	out/20	88,40	132,00	109,41	107,65	109,69
Randox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	83,95	83,75	83,21
Randox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	164,86	167,33	165,39
Randox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	234,63	236,46	237,37
21 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Randox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	77,01	76,50	75,91
Randox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	170,40	168,88	167,99
28 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	53,42	54,76	53,42
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	156,65	153,24	152,41
35 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	54,43	55,64	54,56
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	151,26	150,27	153,75

Quadro 17. Dosagem de diferentes controles utilizando o Piloto 3 ao longo de 35 dias de estabilidade acelerada contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 3 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	153,76	152,29	151,97
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	94,02	94,12	94,35
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	172,27	167,43	170,23
Radox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	242,46	239,84	238,78
14 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	143,40	143,10	142,68
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	55,66	53,71	54,68
Biorad 2	68902	out/20	88,40	132,00	112,33	110,70	111,03
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	85,24	81,61	84,26
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	166,96	162,74	160,41
Radox 3	566LPC	dez/22	203,00	305,00	236,90	238,17	234,22
21 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Radox 1	506LPC	nov/21	70,60	106,00	78,47	76,01	78,78
Radox 2	526LPC	jun/21	143,00	215,00	153,51	154,65	157,02
28 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	52,18	52,44	51,10
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	151,53	150,09	152,42
35 DIAS							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	56,46	56,45	55,55
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	160,69	157,47	157,54

Observando os resultados da estabilidade acelerada, foi possível concluir que os três lotes analisados mantiveram sua capacidade reacional, segurança e eficácia após serem expostos à temperatura de 40°C acima da temperatura de armazenamento (2-8°C) durante 35 dias, uma vez que todos os controles ficaram dentro do intervalo de variação permitido. Aplicando a equação de Arrhenius, chegou-se a uma validade de 18 meses em geladeira (35 dias x 2⁴), validade que será definida ao final do Estudo de Estabilidade em Tempo Real.

4.8.2. Estabilidade em Tempo Real

Os resultados do acompanhando em tempo real dos três pilotos do reagente em desenvolvimento é ilustrado no Quadro 18. As análises de 3, 6, 9, 12 e 18 meses estão programadas e serão realizadas nas datas específicas conforme indicado na metodologia.

Quadro 18. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando os três pilotos para avaliação da estabilidade em tempo real contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 1 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	61,15	60,91	60,84
Controle Multi. Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	146,02	145,41	142,76
PILOTO 2 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	55,32	56,71	55,52
Controle Multi. Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	145,53	146,98	144,84
PILOTO 3 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	57,10	57,98	55,76
Controle Multi. Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	148,59	148,47	146,75

Compilados os resultados, foi possível concluir que os lotes analisados atenderam a todos os critérios de aceitabilidade e mantiveram sua capacidade reacional, segurança e eficácia em seu teste inicial quando armazenado em frasco de vidro âmbar fechado e mantido em temperatura de 2 a 8°C.

4.8.3. Estabilidade em Transporte

A comparação entre a unidade denominada “transporte” e a unidade “referência” após 7 dias à 37°C utilizando pelo menos um controle e duas amostras de soro são ilustradas no Quadro 19 e 20. As análises de 3, 6, 9, 12 e 18 meses estão programadas e serão realizadas nas datas específicas conforme indicado na metodologia.

Quadro 19. Dosagem inicial de diferentes controles para avaliação da estabilidade em transporte contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

INICIAL										
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		"Referência" (mg/dL)			"Transporte" (mg/dL)		
			Mín	Máx						
Controle Multi Médio	02C290	set/21	117,4	164,8	146,74	139,81	145,68	144,57	140,63	140,60
Biorad 1	68901	out/20	49,8	69,9	57,44	57,25	57,85	58,54	59,56	58,09

Quadro 20. Dosagem inicial duas amostras de soro para avaliação da estabilidade em transporte comparando a leitura da amostra do reagente “referencia” com o “transporte”.

AMOSTRA 1				AMOSTRA 2			
Tempo (meses)	Resultados Obtidos		Variação (%)	Tempo (meses)	Resultados Obtidos		Variação (%)
	"Referência" mg/dL	"Transporte" mg/dL			"Referência" mg/dL	"Transporte" mg/dL	
INICIAL	93,57	95,30	1,85	0	99,16	98,21	-0,96

O resultado obtido demonstra que o lote em estudo manteve a sua capacidade reacional, segurança e eficácia em seu teste inicial, mesmo tendo sido exposto a temperatura de 37°C durante 7 dias, tendo em vista que ambos os controles se mantiveram dentro do intervalo especificado e porcentagem de variação nas amostras foi de no máximo 1,85%.

4.8.4. Estabilidade em Uso

Os resultados do acompanhando inicial do reagente em uso (após aberto) utilizando o piloto 1, é ilustrado no Quadro 21. As análises de 3, 6, 9, 12 e 18 meses estão programadas e serão realizadas nas datas específicas conforme indicado na metodologia.

Quadro 21. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando o piloto 1 para avaliação da estabilidade em uso contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 1 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	61,15	60,91	60,84
Controle multi. Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	146,02	145,41	142,76

É possível observar que o lote analisado atendeu a todos os critérios de aceitabilidade e manteve sua capacidade reacional, segurança e eficácia em seu teste inicial em uso quando armazenado em frasco de vidro âmbar e mantido em temperatura de 2 a 8°C.

4.8.5. Estabilidade em *Bulk*

Os resultados do acompanhamento inicial do reagente em *bulk* utilizando o piloto 1, é ilustrado no Quadro 22. As análises de 3, 6, 9, 12 e 18 meses estão programadas e serão realizadas nas datas específicas conforme indicado na metodologia.

Quadro 22. Dosagem inicial de diferentes controles utilizando o piloto 1 para avaliação da estabilidade em *bulk* contendo lote, validade, intervalo de variação permitido e as leituras obtidas em triplicata para o controle.

PILOTO 1 - INICIAL							
Controle	Lote	Validade	Intervalo de Variação		Obtido (mg/dL)		
			Mín	Máx			
Biorad 1	68901	out/20	49,79	69,90	61,15	60,91	60,84
Controle Mult. Médio	02C290	set/21	117,38	164,79	146,02	145,41	142,76

A partir do lote analisado pode-se observar que este atendeu a todos os critérios de aceitabilidade e manteve sua capacidade reacional, segurança e eficácia em sua análise inicial quando armazenado em boeco transparente de boro 3.3 fechado e mantido em temperatura de 2 a 8°C.

5. CONCLUSÃO

O setor de reagentes para diagnóstico *in vitro* vem crescendo e tem se tornado de grande relevância e inovação na última década, auxiliando no diagnóstico de diversas doenças autoimunes sistêmicas. Nesse contexto, o presente trabalho possibilitou o desenvolvimento de uma formulação para diagnóstico e quantificação *in vitro* de imunoglobulina M, a principal imunoglobulina de resposta primária aos antígenos e a primeira a se elevar na fase aguda dos processos imunológicos. Para isso, realizou-se todos os estudos de desempenho exigidos pela Anvisa, contidos na Resolução - RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015, dentre os quais encontram-se as análises de linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, especificidade analítica, efeito prozona de alta dose e estabilidade. Verificou-se que o reagente desenvolvido apresentou boa performance quando os resultados foram analisados junto a faixa de referência da IgM (40 a 230 mg.dL⁻¹) e aos critérios de aceitabilidade impostos. O produto atingiu uma sensibilidade analítica de 15,357 mg.dL⁻¹, possibilitando a análise de amostras de soro de forma

precisa mesmo em concentrações muito baixas do analito. A faixa operacional (linearidade) obtida de 16,72 a 303,04 mg.dL⁻¹ permitiu ao reagente englobar toda a faixa de referência da imunoglobulina M com uma margem significativa importante de trabalho para análise de amostras com concentração maiores ou menores que a faixa de referência. Comprovou-se também a não ocorrência do efeito prozona até pelo menos 549,01 mg.dL⁻¹ do analito, impedindo que amostras com concentrações “falsamente baixas” dentro da linearidade possam surgir e gerar diagnósticos incorretos. Além disso, o reagente demonstrou-se específico até as seguintes concentrações de interferentes: 2000 mg.dL⁻¹ de triglicérides, 100 mg.dL⁻¹ de hemoglobina, 20 mg.dL⁻¹ de bilirrubina e 150 UI.mL⁻¹ de Fator Reumatóide, o que possibilita mais segurança e confiabilidade para os diagnósticos, considerando que o reagente suportou elevadas concentrações dos principais interferentes da turbidimetria. O produto também se demonstrou apto nos testes de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), conseguindo reproduzir os resultados tanto em ensaios no mesmo local, com os mesmos equipamentos e o mesmo operador quanto utilizando locais, equipamentos e operadores diferentes. De acordo com os resultados de estabilidade acelerada, o reagente apresentou um bom prazo de validade próxima ou superior a maioria dos kits comerciais, com “*shelflife*” de aproximadamente 18 meses. Todavia, é de suma importância que o produto continue sendo acompanhado em tempo real, em transporte, em uso e em *bulk* por 18 meses, visando comprovar a validade prevista pela equação de Arrhenius e estes resultados sejam atualizados na Anvisa a medida que são realizados.

Assim, a formulação desenvolvida do reagente para diagnóstico *in vitro* de imunoglobulina M mostrou-se eficiente, segura e manteve sua capacidade reacional em todos os testes de desempenho exigidos para registro do produto na Anvisa. Pôde-se observar que o produto atendeu a todos os critérios de aceitabilidade e parâmetros estatísticos exigidos e, dessa forma, a solicitação de registro do reagente pôde ser requerida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) (Brasília). **Manual para Regularização de Produtos para Diagnóstico *in Vitro* na Anvisa**: Gerência de Produtos Diagnósticos de Uso *in vitro* – GEVIT. Brasília: [s. n.], 2015. 76 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E691/92**. Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1992. 20p.

AMBRÓSIO, A. R. **Estudo da expressão de um receptor da progesterona nas populações major linfocitárias**. Dissertação (Faculdade de Ciências e Tecnologia) - Universidade de Coimbra, [s. L.], 2014.

AKÇAY, Fatih; KELES, M Sait; KIZILTUNÇ, Ahmet. Evaluation of serum IgG, IgA, IgM and C3 values by nephelometric methods. **Erciyes Medical Journal**, Yakutiye/Erzurum, p. 260-265, 1997.

ALLEMAN, A. The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents. **Veterinary Medicine**, v. 85, p. 1272-1284, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR/ISO GUIA 30: Termos e Definições Relacionados com Materiais de Referência, Rio de Janeiro, 2001.

BARWICH, V.; BURKE, S.; LAWN R.; ROPER, P.; WALKER, R. **Applications of reference materials in analytical chemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 147p. 2001.

BIÈVRE, P.DE; GUNZLER, H. **Measurement uncertainty in chemical analysis**. New York: Ed. Springer, 2003. 285p.

BIOTÉCNICA (Varginha, Minas Gerais). **Smart 200+**. [S. l.], 21 jul. 2021. Disponível em: <https://biotecnica.ind.br/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BOLON B. Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Diseases, **Journal of Toxicologic Pathology**; (40), p. 216-229, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. [on-line] [consultado em 24 out 2012]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RE nº 398, de 12 de novembro de 2004. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. [on-line] [consultado em 24 out 2012]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0398_12_11_2004.html

BRAUNSTEIN, E.M. Visão geral da anemia hemolítica. **Manual MSD**, 2017. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/hematologia-e-oncologia/anemias-causadas-por-hem%C3%B3lise/vis%C3%A3o-geral-da-anemiahemol%C3%ADtica>

BUICK, A.R. et al. - Method validation in bioanalytical laboratory. **J. Pharm. Biom. Anal.** 8. p.629-637. 1990

CARAGUEL, C.; STRYHN, H.; GAGNÉ, N.; DOHOO, I.; HAMMELL, L. Traditional descriptive analysis and novel visual representation of diagnostic repeatability and reproducibility: Application to an infectious salmon anaemia virus RT-PCR assay. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.92, n.2, p.9-19, 2009.

CARNEIRO, M. C.; SILVA, F.; BIZELLI, D.. INFORME TÉCNICO - Método Turbidimétrico. **INFORME TÉCNICO - Método Turbidimétrico**, Fernandópolis - São Paulo, ano 6, n. 22, p. 1-4, 2017.

CENTERS FOR MEDICARE & MEDICAID SERVICES CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (USA). Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid, and CLIA Programs; Laboratory Requirements Relating to Quality Systems and Certain Personnel Qualifications; Final Rule. **Federal Register** , [S. l.], v. 68, n. 16, p. 3640-3713, 24 jan. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (Pennsylvania, USA). Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes). **Approved Guideline—Second Edition**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 1-35. 2004.

CLSI. **Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline**. CLSI document EP06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.

DAVES, M. *et al.* Influence of Hemolysis on Routine Laboratory Cardiac Marker Testing. **Clin. Lab.** V. 58 p. 333-336, 2012.

DOOLEY, K.C. **Frequency of QC**: a patient safety perspective, 2007. Disponível em: <http://www.westgard.com/lesson.htm>. Acesso em: 21 fev.2009.

FAIRWEATHER, D. Autoimmune Disease: Mechanisms. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, Maryland, USA, p. 1-6, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Innovation or Stagnation? Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products**. US Department of Health and Human Services. 2004.

FORSMAN R, REGAN M. The Impact of the Laboratory on Disease Management. **Dis Manage.** 2006; 9:122-130.

FOSTER, J. W. Quantitative estimation of penicilin. **J. Biol. Chem.**, v. 144. 1261-1265, 1942.
PAIVA, Leonardo Batista. **Análise estratégica da indústria brasileira de reagentes para diagnóstico e das potencialidades do Instituto de tecnologia em imunobiológicos frente aos desafios da saúde no brasil**. Orientador: Prof.^a Dr^a. Rosiceli Barreto Gonçalves Baetas. 2009. Dissertação (Mestrado em tecnologia de imunobiológicos) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

GONZALEZ-QUINTELA, A. et al. Erum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. **Clin Exp Immunol** , [S. l.], v. 1, n. 151, p. 42-50, 2007.

GOTTLIEB S, WOODCOCK J. A regulatory perspective on *in vitro* diagnostics. **Nature Biotechnology** 2006; 24 (8):

HEALTH JADE. **Hook effect**. [S. l.],. Disponível em: <https://healthjade.net/hook-effect/>. Acesso em: 29 jun. 2021.

HERRINE, S.K. **Icterícia**. Manual MSD, 2018. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/doen%C3%A7as-hep%C3%A1ticas-e-daves%C3%ADcula-biliar/manifesta%C3%A7%C3%B5es-da-doen%C3%A7a-hep%C3%A1tica/icter%C3%ADcia-em-adultos?query=Vis%C3%A3o%20geral%20da%20anemia>.

IgM PLUS. Responsável técnico Dr. Gilson Sérgio Pizzo. Biotécnica Ind.Com. Ltda. Varginha, Minas Gerais, 2015. Bula de remédio. Disponível em: http://www.biotecnica.ind.br/downloads/TURBIDIMENTRIA/IgM_2002000/IU/IgM.pdf

INCT-TeraNano. **DOENÇAS METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS**. Teranóstica e Nanobiotecnologia (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia). Uberlândia, 2014. 1 p.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. **Quality assurance and quality control in the analytical chemistry laboratory: a practical approach**. New Work: Taylor & Francis, LLC, 2009. 233p.

Jl, J.Z.; MENG, Q.H. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. **Clinica Chemica Acta**, v. 412, n. 17-18, p. 1550-1553, 2011.

JOHNSON, A. M. Necessity for high-quality reference materials in the harmonization of laboratory assays. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 48, n. 6, p. 747-748, 2010.

KENKEL, J. **Analytical chemistry for technicians**. 3rd ed. Flórida: Lewis Publisher, 2003. 554 p.

KERR, M.G. Exames laboratoriais em medicina veterinária. São Paulo: Rocca, **Capítulo 16**, 2003.

KROLL, M.H., ELIN, R.J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry** v. 40, n. 11, p. 1996-2005, 1994.

LIMA, M.; RIBEIRO, P.; MEDEIROS, J.; SILVA, I.; MEDEIROS, A.; DIMENSTEIN, Roberto. Influência da suplementação pós parto de vitamina A sobre os níveis de imunoglobulina A no colostro humano. **Jornal de Pediatria**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 115-118, 2012.

LIPPI, G., *et al.* Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. **Clin Chem Lab Med**.V.46 n. 6 p. 764-772, 2008.

MARTELLI, A. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. **Rev Med Minas Gerais**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 216-220, 9 set. 2012.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S., CERÓN J.J. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubinemia, and anticoagulants is canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. **Can. Vet. J.**, v. 46, p. 625-629, 2005.

MASSAKASU, N. *et al.* Fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML)**, Barueri [SP], n. 1, p. 464, 2018.

MAYER, Gene. IMUNOGLOBULINAS – ESTRUTURA E FUNÇÃO. *In: IMUNOLOGIA*. [S. l.: s. n.], [s.d.]. cap. Capítulo 4, p. 1 - 13.

MEHTA , A C. The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. *J Clin Pharm Ther* . , [S. l.], v. 14, n. 6, p. 465-73, 24 jun. 1989.

MILLER, J.N. - Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2: Calibration and regression methods. *Analyst*.116 p.3-14. 1991

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 36, de 26 de Agosto de 2015**. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências.

NCCLS. Evaluation Methods and Analytical Performance Characteristics of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies of Defined Allergen Specificities; **Approved Guideline. NCCLS document I/LA20-A** (ISBN 1-56238-343-4), NCCLS, Pennsylvania 19087-1898 USA, v. 17, n. 24. 1997.

NIKOLAC, N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem. Med. (Zagreb)* v. 24, p. 57-67, 2014.

OLIVEIRA, C.; MENDES, M.. **Gestão da fase analítica do laboratório::** como assegurar a qualidade na prática. 1. ed. Rio de Janeiro: ControlLab Controle de Qualidade para Laboratórios LTDA, 2010. 144p. p. v. 1. ISBN 978-85-63896-00-1.

OLIVEIRA, J. C. V et al. **Vocabulário Internacional de Metrologia:** conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). Rio de Janeiro: INMETRO, 2009. 78 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica>.

PECLY , I. D. *et al.* Vasculite reumatoide – Relato de caso. *Rev. Bras. Reumatol.*, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 528-530, set. 2015.

PIYOPHIRAPONG, S.; WONGTIRAPORN, W.; SRIBHEN, K. Factitious results in clinical chemistry tests caused by common endogenous interferents. *Siriraj Medical Journal*. v. 62, n. 4, p. 185-188, 2010.

Q1A(R2) (2003), Guidance for Industry – Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH **International Conference on Harmonization**, Revision 2, November 2003.

QUAM, E. F. QC: The materials. In: WESTGARD, J. O. **Basic QC practices**. 3rd ed. Madison: Westgard QC, 2010. 352 p.

RAMAN, G.; AVENDANO, E.; CHEN, M. Update on Emerging Genetic Tests Currently Available for Clinical Use in Common Cancers. **Agency for Healthcare Research and Quality**, Rockville(MD), p. 1-104. 2013.

RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERÓN, P., KOSTOV, B., SISÓ-ALMIRALL, A., BOSCH, X., BUSS, D.; TRILLA A.;STONE J.; KHAMASHTA M.; SHOENFELD, Y. Google-driven

search for big data in autoimmune geoepidemiology: Analysis of 394,827 patients with systemic autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, 14(8), p.670–679, 2015.

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] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2015. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2862781/RDC_36_2015_COMP.pdf/7c073709-b482-4493-b486-16e9940b1665?version=1.0>. Acesso em: 02/06/2017

ROXO-JUNIOR, P. **Imunodeficiências predominantemente humorais: Alergia e imunodeficiências em pediatria - abordagem prática**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 237-70, 2006.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RICÓS, C.; JUVANY, R.; SIMÓN, M.; HERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ, V.; JIMÉNEZ, C. V.; MINCHINELA, J.; PERICH, C. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. **Clin. Chem. Acta**, v. 280, n. 1-2, p. 135-145, 1999.

RUSSEL, John B. **Química Geral**: Volume 2. 2 ed. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. 621 p.

SKOOG, A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS (SBAC). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico. **Acompanhamento Político, Assessoria Jurídica, Posicionamento SBAC**, [S. l.], dez. 2016.

SON, J.H.; LEE, S>H.; HONG, S.; PARK, S.; LEE, J.; DICKEY, A.M.; LEE, L.P. Hemolysis-free blood plasma separation. **Lab Chip**, v. 14, p. 2287-2292, 2014.

TAMBWEKAR, S. **Handbook of quality assurance in laboratory medicine**. New Delhi: Ed. BI Publications PVT, 2009. 201p.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Evaluation of automated assays for immunoglobulin G, M, and A measurements in dog and cat serum. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 3, p. 270-280, 2013.

URURAHY, G. A importância do diagnóstico precoce. **MED RIO Check-up**, [S. l.], p. 1-23, 2019.

VESPER, H. W.; THIENPONT, L. M. Traceability in laboratory medicine. **Clin. Chem.**, v. 55, n. 6, p. 1067-1075, 2009.

WARD, Greg et al. The investigation of interferences in immunoassay. **Clin Biochem**, [S. l.], v. 50, n. 18, p. 1306-1311, 1 jul. 2017.

WESTGARD. **Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC) table of Desirable Quality Specifications based on Biological Variation, 2004 Update**. [S. l.], 22 jul. 2021. Disponível em: [t www.westgard.com/guest26.htm](http://www.westgard.com/guest26.htm) (accessed 1 January 2013) and <http://www.dgrhoads.com/db2004/ae2004.php>. Acesso em: 22 jul. 2021.

WESTGARD, J. O.; EHRMEYER, S. S.; DARCY, T. P. **CLIA final rules for quality systems**. 5th ed. Wisconsin: Westgard QC, 2004. p.212.

WESTGARD, J. O.; KLEE, G. G. Quality Management. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD E. R.; BRUNS, D. E. (Ed.). **Tietz**: Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. USA: Elsevier Saunders, 2006. p. 485-529.

WU, S.; HAYDEN, J.. Upfront dilution of ferritin samples to reduce hook effect, improve turnaround time and reduce costs. **Biochem Med (Zagreb)**, [S. l.], v. 28, n. (1), p. 010903, fev. 2018.

ZSCHUNKE, A. **Reference materials in analytical chemistry**. A guide for Selection and use. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 1-22. 2000.