

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

Simone Ferreira Teixeira Bastos

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS:  
POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA DA HEPATITE B UTILIZADA NO  
PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

Rio de Janeiro

2016

Simone Ferreira Teixeira Bastos

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ENSAIOS BIOLÓGICOS:  
POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA DA HEPATITE B UTILIZADA NO  
PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Kátia Christina Leandro

Colaboradores: Catia Ines Costa  
Jorge Trota Filho

Rio de Janeiro

2016

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

Bastos, Simone Ferreira Teixeira

Avaliação da incerteza de medição em ensaios biológicos: potência da vacina adsorvida da Hepatite B utilizada no programa nacional de imunizações / Simone Ferreira Teixeira Bastos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

74 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária). Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadora: Kátia Christina Leandro. Colaboradores: Catia Ines Costa; Jorge Trota Filho

1. Vacinas contra Hepatite B. 2. Potência de Vacina. 3. Programas de Imunização. 4. Vigilância Sanitária. 5. Controle de Qualidade. I. Título

Measurement uncertainty evaluation in bioassays: potency of hepatitis B vaccine adsorbed used in national immunizations program.

Simone Ferreira Teixeira Bastos

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM ENSAIOS  
BIOLÓGICOS: POTÊNCIA DA VACINA ADSORVIDA DA HEPATITE  
B UTILIZADA NO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado: 31/05/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Marcus Henrique Campino de La Cruz (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Sergio Pinheiro de Oliveira (Doutor)  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

---

Profa. Dra. Sônia Ribeiro Doria (FIOCRUZ)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Kátia Christina Leandro (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar ao longo da minha trajetória pessoal, profissional e acadêmica. Agradeço por tudo que recebi, pela vida e pelo amor, pelo que foi possível e pelo que não foi, pelo trabalho que pude realizar, pelas coisas que passaram pelas minhas mãos e o que com elas pude construir.

Aos meus pais Edegar e Rosa Maria pelo amor, dedicação, carinho e incentivo constante nos estudos.

A minha filha, Júlia, pelo amor, carinho, paciência e por me incentivar nos momentos de desânimo.

Ao meu marido Júlio Cesar pelo amor e compreensão nos diversos e longos períodos de ausência necessários para realização deste trabalho.

Ao meu irmão, Sergio, pelo apoio sempre demonstrado.

A minha orientadora Dra. Catia Ines Costa, pela amizade, por me passar sua experiência, acreditar nos meus projetos e me ensinar a ter esperança de que é possível fazer uma saúde pública de qualidade.

Ao meu orientador Dr. Jorge Trota Filho pela colaboração na execução deste projeto e pelos ensinamentos de não temer aos obstáculos.

A minha orientadora Dra. Kátia Christina Leandro pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Em especial a minha amiga Renata Carvalho, meus amigos do INCQS e da Fiocruz pelo companheirismo em todos os momentos, bons e difíceis, principalmente por tentarem resolver meus questionamentos indispensáveis ao entendimento e execução desse trabalho.

A todos os meus amigos pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Departamento de Imunologia (INCQS/ FIOCRUZ) pela realização dos ensaios.

A Coordenação de Pós-Graduação do INCQS, pela organização do curso de Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária.

“Não basta saber, é preciso aplicar. Não basta querer é preciso também agir.”

*Goethe*

## RESUMO

O mercado nacional e principalmente o mercado externo estão se tornando bastante exigentes quanto à qualidade dos produtos ofertados ao consumidor, o que gera novos desafios para que os laboratórios produzam resultados mais adequados à qualidade pretendida. O reconhecimento da competência técnica através da acreditação de laboratórios contribui para a melhoria contínua da qualidade dos serviços prestados à população. Entretanto, para que um laboratório seja acreditado, é necessária a inclusão do cálculo das incertezas de medição dos resultados de ensaios, de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Vários guias para avaliação de estimativas de incertezas encontram-se disponíveis na literatura. Entretanto esses guias restringem-se apenas a avaliações físico-químicas não abrangendo suficientemente avaliações em outras áreas como, por exemplo, potências de produtos biológicos, vacinas. Portanto, este estudo visa determinar e mensurar as fontes de incerteza da medição atribuídas aos resultados de potência das vacinas adsorvida da hepatite B, realizados no INCQS, pela metodologia padronizada universalmente, descrita no ISO GUM. A hepatite B é uma doença que causa depreciação e/ou falência do fígado, podendo provocar cirrose e câncer, sendo a vacinação uma importante ferramenta do Estado para o controle efetivo dessa doença. A vacina da hepatite B é ministrada em toda a rede de saúde, preferencialmente nas primeiras 24 horas após o nascimento para prevenir contaminação vertical. Pode ser ministrada em crianças e adultos e possui eficácia de 80% a 100% para indivíduos vacinados com as três doses. Nos resultados apresentados neste trabalho, a incerteza de medição foi de  $\pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ , o que representa  $\pm 1\%$  do valor estimado de potência da vacina ( $22 \mu\text{g/mL}$ ). As principais contribuições foram a repetibilidade das leituras e a temperatura de incubação do ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, *in vitro*. Incertezas devido às leituras de absorbância, kit de ELISA e curva de diluição também contribuíram para a incerteza final. Além das contribuições, foi estudado e determinado o impacto no resultado final de potência através de ensaios para construção de modelos matemáticos e derivadas parciais das funções. O presente estudo poderá servir como importante base e incentivo para futuras avaliações de incerteza de medição da potência de outras vacinas que fazem parte do Programa Nacional de Imunizações-PNI, de maneira a contribuir efetivamente para a melhoria da qualidade das avaliações dos mensurando.

Palavras-chaves: 1. Vigilância Sanitária. 2. Potência de Vacina. 3. Hepatite B.

## ABSTRACT

Laboratories are permanently challenged to improve their service quality due to the increasing demand of the national and, mainly, international market for the product quality that is offered to the consumers. Accreditation of laboratories and recognition of their technical competence assures a continuous improvement of quality of the services offered to the population. However, according to the Standard ABNT NBR ISO/IEC 17025 the uncertainty measurements standards play a key role on the accreditation process. Although there is several guidelines available for estimating uncertainty in literature, most are limited to physics and chemical evaluations, thus lacking information in other areas as biological products potency assays and vaccines, for example. Therefore, this present study aims to determine and evaluate the uncertainty measurements sources derived from Absorbed Hepatitis B vaccine potency assays, conducted at INCQS using ISO GUM global standard methodology. Because hepatitis B causes important liver failure, likely inducing cirrhosis and cancer, immunization is a very important Government tool for effective prevention and control of this disease. The hepatitis B vaccine is given at the public health care network preferentially within 24h of birth to prevent vertical contamination. It may be given in children and adults and has efficiency of 80% to 100% for individuals vaccinated with three doses. Results presented in this study show a measurement uncertainty of  $\pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ , which represents  $\pm 1\%$  of the estimated value of the vaccine potency ( $22 \mu\text{g/mL}$ ). The repeatability of the readings and the temperature incubation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were the main contributors. Uncertainties due to absorbance readings, ELISA kit and dilution curve also contributed to the final uncertainty value. In addition, assays for construction of mathematical models and function partial derivatives were also performed in order to study and determine the final impact on the vaccine potency. This present study may be used as an initial model and encourage future evaluations of measurement uncertainty of other vaccine potency assays of the National Immunization Program (PNI), effectively contributing for the improvement of the evaluation quality of the measures.

Keyword: 1. Health Surveillance. 2. Vaccine potency. 3. Hepatitis B.

## LISTA DE SIGLAS

Anti-HBS – anticorpo contra HBsAg

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BIPM – Birô Internacional de Pesos e Medidas

BSA – *Bovine serum albumin* - albumina sérica bovina

CDC – *Center for Disease Control*

CI – Recomendação 1 do CIPM

Ci – Coeficiente de Sensibilidade

CIPM – Comitê Internacional de Pesos e Medidas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade Ótica

DTP – Difteria, tétano e pertússis

EA – European Co-operation for Accreditation

EDQM – European Directorate for de Quality of Medicines & HealthCare

Elisa – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ensaio de imunoabsorção enzimática

ISO GUM – Guide of Uncertainty of Measurement – Guia de Incerteza de Medição

HBsAg – *Hepatitis B surface antigen* – antígeno de superfície do HBV

HBV - *Hepatitis B virus* – vírus da Hepatite B

IEC – International Electrotechnical Commission – Comissão de Eletrotécnica Internacional

IFCC – International Federation of clinical chemistry and laboratory medicine - Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial

INC-1 – Recomendação 1 do Grupo de Trabalho instituído pelo BIPM para expressão da incerteza experimental

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – International Organization for Standardization - Organização Internacional de Normalização

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry - União Internacional de Química Pura e Aplicada

IUPAP – International Union of Pure and Applied Physics - União Internacional de Física Pura e Aplicada

MS – Ministério da Saúde

MIDC – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

OIE – World Organisation for Animal Health – Organização Mundial para Saúde Animal

OIML – International Organization of Legal Metrology Organização Internacional de Metrologia Legal

OMS – World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato-salino

PNI – Programa Nacional de Imunizações

RBC – Rede Brasileira de Calibração

SBM – Sociedade Brasileira de Metrologia

TAG 4 – Technical Advisory Group on Metrology – Grupo Técnico Orientador em Metrologia da ISO

TMB – Tetrametilbenzidina- 3,3',5,5'

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

WG3 – Working Group 3 – Grupo de Trabalho 3 da OIML

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise de resultados de medição (pontos pretos) e suas incertezas (barras) em comparação com limites superior e inferior de especificação. Apenas o resultado (a) estaria aprovado, pois o resultado e sua incerteza estão completamente dentro dos L.E. ....	19
Figura 2: Distribuição Mundial HBsAg. Mapa mostrando a prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B no mundo. ....	30
Figura 3: Taxa de incidência de casos hepatite B (por 100.000 habitantes) segundo a região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2011 .....	30
Figura 4: Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche .....	34
Figura 5 – Gráfico relacionando $\ln$ da dose (x) e a resposta (y) no modelo de linhas paralelas .....	35
Figura 6 - Fontes de incerteza selecionadas para estudo .....	42
Figura 7 - Gráfico de Balanço das Incertezas .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução da incerteza de medição .....	21
Tabela 2 - Fórmula para ensaio de linhas paralelas com “d” doses de cada preparação .....	41
Tabela 3 - Fórmulas adicionais para construção da análise de variâncias.....	41
Tabela 4 - Fórmula para cálculo da soma dos quadrados e graus de liberdade.....	41
Tabela 5 – Fórmula para cálculo do erro residual .....	42
Tabela 6 - Condições de ensaio .....	43
Tabela 7 - Cálculo da Incerteza de Medição .....	72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Calendário básico de vacinação da criança .....	32
Quadro 2 - Diluições da vacina de referência interna (em triplicata):.....	39
Quadro 3 - Diluições da vacina em análise (em triplicata):.....	39
Quadro 4 - Valores de potências com 34°C .....	48
Quadro 5 - Valores de Potências com 37°C.....	49
Quadro 6 - Valores de potência com 40°C .....	49
Quadro 7 - Graus de Liberdade.....	57
Quadro 8 - Fontes de incerteza padronizadas .....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1	Considerações Gerais .....	16
1.2	A incerteza de medição .....	19
1.3	Erros Experimentais .....	22
1.3.1	Erros grosseiros .....	22
1.3.2	Erros sistemáticos.....	22
1.3.3	Erros aleatórios.....	23
1.3.4	Fontes de Incertezas .....	24
1.4	Guia para expressão da incerteza de medição - ISO GUM.....	25
1.4.1	Avaliação do tipo A:.....	26
1.4.2	Avaliação do tipo B:.....	26
1.4.3	Incerteza padrão combinada.....	26
1.4.4	Coeficiente de sensibilidade.....	27
1.4.5	Fator de abrangência .....	27
1.4.6	Incerteza Expandida .....	27
1.5	Controle da qualidade de vacinas .....	28
1.6	Hepatite B.....	29
1.6.1	Epidemiologia da hepatite B .....	29
1.6.2	Vacinação contra a hepatite B .....	31
1.6.3	Avaliação da potência para o componente da hepatite B .....	32
1.6.4	Método imunoenzimático do tipo ELISA .....	33
1.6.5	Análise estatística do resultado .....	34
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	Objetivo geral.....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Amostras de vacinas adsorvida de hepatite B .....	38
4.2	Avaliação da potência da vacina adsorvida de hepatite B pelo método <i>in vitro</i> .....	38
4.2.1	Instrumentos/Equipamentos utilizados no ensaio .....	38

4.2.2	Método <i>in vitro</i> – Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA – kit Murex (metodologia padrão do laboratório) .....	39
4.3	Seleção das fontes de incerteza do ensaio .....	42
4.3.1	Avaliação das influências das incertezas do tipo B: temperatura de incubação e concentração de diluente .....	43
4.3.2	Avaliação das influências das incertezas do tipo B: uso de kit comercial para o ELISA .....	43
4.3.3	Avaliação das influências das incertezas do tipo B: Diluição da vacina em análise e da referência, Curva de diluição e Leituras das absorbâncias .....	44
4.4	Determinação do modelo matemático do ensaio.....	44
4.5	Metodologias de cálculo da incerteza de medição baseada no ISO GUM.....	44
4.5.1	Incerteza tipo A .....	45
4.5.2	Incerteza tipo B .....	45
4.5.3	Incerteza Combinada.....	46
4.5.4	Valor do fator de abrangência (k).....	46
4.5.5	Incerteza expandida.....	47
4.6	Análise gráfica das contribuições (balanço das incertezas) .....	47
4.7	Metodologia padrão para cálculo da incerteza de medição do ensaio de potência da vacina da hepatite B .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1	Método <i>in vitro</i> – Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA – kit Murex (metodologia padrão do laboratório) .....	48
5.2	Método padrão modificado para avaliação das influências das incertezas do tipo B: temperatura de incubação (34 ° C, 37 ° C e 40° C) e concentrações de diluente (0,1%; 0,2% e 0,3%).....	48
5.3	Modelo Matemático .....	51
5.3.1	Amostra 4196/13 .....	51
5.4	Exemplo de Cálculo da Incerteza de Medição do ensaio de potência da vacina adsorvida da hepatite B - INCQS/FIOCRUZ.....	52
5.4.1	Incerteza do Tipo A.....	52
5.4.2	Incerteza do Tipo B .....	53
5.4.3	Incerteza-Padrão Combinada .....	55
5.4.4	Coefficientes de sensibilidade .....	55

5.4.5	Número efetivo de graus de liberdade.....	57
5.4.6	Fator de abrangência - k .....	57
5.4.7	Incerteza Expandida .....	58
5.5	Balanço de incertezas .....	58
5.6	Padronização do cálculo da incerteza de medição para o ensaio da vacina adsorvida de hepatite B. ....	59
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>634</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

O mercado nacional e, principalmente o mercado externo estão se tornando cada vez mais exigentes quanto à qualidade dos produtos ofertados ao consumidor. Considerando que a qualidade tem se tornado uma palavra chave nos dias atuais, novas tecnologias têm direcionado novos desafios para o aprimoramento dos laboratórios para que produzam resultados mais adequados com a qualidade pretendida. (INMETRO, 2010)

O reconhecimento da competência técnica através da acreditação de laboratórios contribui para a melhoria contínua da qualidade dos serviços prestados à população. Entretanto, para que um laboratório que opera atividades de ensaio ou calibração seja acreditado, é necessário que se cumpra todos os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, o que inclui o cálculo das incertezas de medição dos resultados de ensaios. Neste contexto, a acreditação exerce um papel fundamental na ampla aceitação dos resultados, tanto nacionalmente como internacionalmente, em relação aos países que fazem parte de acordos de reconhecimento mútuo com organismos equivalentes de outros países (ABNT, 2005).

Ao tentar compreender o mundo que o rodeia, o homem teve que o medir. As distâncias eram medidas em termos de passos, pés, braços ou polegares. Para medir massas, ele comparava os pesos dos corpos. Conseqüentemente, houve uma grande diversidade de unidades de medida e suas denominações entre diferentes regiões, como também variações dos valores dessas unidades.

Como Ciência da Medições, a Metrologia engloba todos os aspectos teóricos e práticos de qualquer medição, em qualquer área e com qualquer incerteza de medição. (INMETRO, 2012a)

Com o desenvolvimento das sociedades, as técnicas e os padrões de medida passaram a ficar cada vez mais sofisticados. As medidas, antes feitas por comparação imediata do objeto a ser medido e um padrão, isto é, medidas diretas passaram a ser realizadas por processos indiretos e, em alguns casos, baseadas em teorias bastante complexas. (DIAS, 1998)

O Sistema Internacional de Unidades - SI é utilizado para a padronização das unidades de medida, sendo recente se comparado sob o ponto de vista da história das ciências. É um sistema primordial para manter justas as relações de comércio entre o homem e o mundo.

A primeira unidade de medida oficialmente nomeada foi o metro, em 17 de abril de 1795, pela Academia de Ciências da França. O modelo para a definição da unidade de massa foi através da confecção de um cilindro padrão para o peso do quilograma de água. Em 1876, foi inaugurado, em Paris, o Bureau Internacional de Pesos e Medidas-BIPM com a missão de aperfeiçoar os padrões internacionais do metro e do quilograma. O BIPM foi definido em caráter científico e permanente para representar os 21 países membros e guardar os padrões internacionais, devendo funcionar sob supervisão de um Comitê Internacional de Pesos e Medidas - CIPM, composto por 14 membros, um de cada país. (INMETRO, 2016)

No Brasil, o crescimento econômico, os avanços tecnológicos, o aperfeiçoamento na exatidão e, principalmente, o atendimento às exigências do consumidor, motivaram novas políticas de apoio ao setor produtivo. Diante da necessidade de aperfeiçoamento dessas demandas, o Ministério da Indústria e do Comércio-MIC, em 1973, instituiu o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, hoje chamado Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-Inmetro. Composto por vários laboratórios de metrologia, o Inmetro passou a ser a referência no país, sendo o responsável por manter e guardar os padrões nacionais, assim como pelos mecanismos destinados à melhoria da qualidade de produtos e serviços. Com isso, a pesquisa científica no campo metrológico passou a dispor de infraestrutura adequada, ao mesmo tempo em que novos desafios foram surgindo na área da qualidade, sendo fonte de ganhos de produtividade. A certificação tornou-se o passaporte de acesso aos mercados internacionais, e como não há qualidade sem norma técnica ou exatidão e precisão na medida, foi necessária a adaptação a este novo ambiente econômico e social, cada vez mais influenciado pelas práticas internacionais. (INMETRO, 2016)

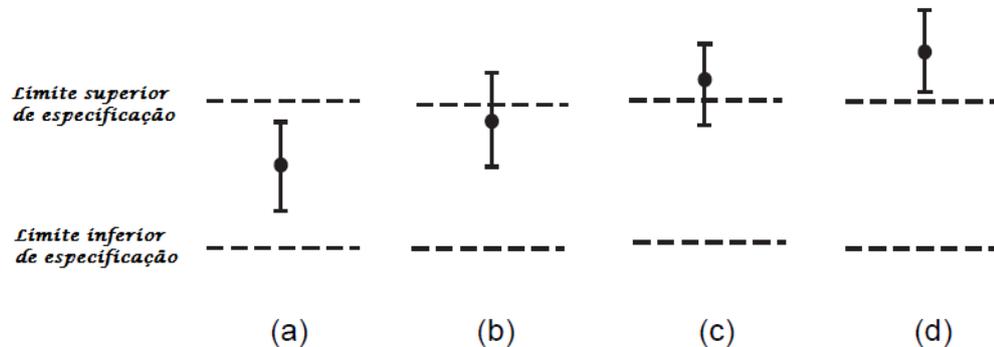
O Estado, através da regulamentação, desempenha papel fundamental na defesa dos interesses da sociedade, consolidando uma estrutura industrial cada vez mais efetiva, de modo a informar e proteger o consumidor, em particular quanto à saúde, segurança e meio ambiente; propiciar a concorrência justa; estimular a melhoria contínua da qualidade; facilitar o comércio internacional e fortalecer o mercado interno. (INMETRO, 2016)

Com a globalização, os países passaram a reconhecer a necessidade da criação de sistemas de normalização, regulamentação, metrologia e avaliação da conformidade. Quando se relata o resultado de medição de uma grandeza, é extremamente importante que seja dada alguma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem essa indicação, um resultado de medição é apenas uma estimativa do valor de uma grandeza específica (mensurando), e somente está completo quando acompanhado de uma incerteza de medição, a qual seria a declaração da

confiança do valor medido. É, portanto, necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza. A incerteza indica a qualidade de uma medida de uma forma quantitativa. Com o passar do tempo, a discussão sobre avaliação da incerteza de medição começou a ficar importante para as medições rotineiras e, com isso, as normas de sistemas de gestão passaram a apresentar indicativos sobre a importância do tratamento das incertezas de medição. (LIMA, 1999).

Muitas análises são feitas para assegurar que não são ultrapassados valores limites (tolerâncias dos processos). Sem informação acerca da incerteza da medição pode parecer fácil tomar decisões, mas tais decisões podem ser incorretas com consequências, por exemplo: quando se rejeita um produto em vez de aceitá-lo e vice-versa. Um produto, equipamento ou material é considerado conforme quando o valor encontrado da característica medida se encontrar dentro dos limites da especificação. Como se sabe que toda medida determinada possui uma incerteza de medição (conhecida ou não), pode-se entender o porquê surgem certas dúvidas quando se aprova ou se reprova itens que se encontram com valores próximos dos limites de conformidade. (ISO, 2013). Conforme demonstrado na figura 1, os pontos pretos representam os valores das medidas e as barras em torno do valor representa o intervalo da incerteza da respectiva medição. Na prática, há casos em que não se consegue aprovar ou reprovar valores próximos aos limites de especificação sem o conhecimento adequado da incerteza de medição, no entanto, costuma-se diminuir esses limites, o que gera uma maior segurança para aprovação de produtos. Porém, a diminuição desses limites pode causar prejuízos (se pensarmos no ponto de vista econômico), já que limites mais estreitos necessitam mais recursos para serem atendidos.

**Figura 1 - Análise de resultados de medição (pontos pretos) e suas incertezas (barras) em comparação com limites superior e inferior de especificação. Apenas o resultado (a) estaria aprovado, pois o resultado e sua incerteza estão completamente dentro dos L.E.**



Fonte: (ISO, 2013)

- Caso (a) – resultado e incerteza dentro dos limites – conformidade atendida
- Caso (d) – resultado e incerteza fora dos limites especificados – conformidade não atendida
- Casos (b) e (c) – nem completamente dentro, nem fora – não se pode ter certeza sobre a conformidade quando as incertezas de medição não são levadas em consideração.

Então, a melhor coisa a se fazer é determinar a incerteza da sua medição, pois dessa forma, os limites podem ser diminuídos de forma mais realista e sem o emprego de recursos desnecessários.

## 1.2 A incerteza de medição

A Incerteza de Medição, no vocabulário Internacional de Metrologia – VIM, é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando. (INMETRO, 2012a)

A determinação da incerteza é importante a partir do momento que se diz algo sobre o qual não se tem absoluto conhecimento. Enquanto, resultados obtidos a partir da matemática ou da física teórica não apresentam incertezas, por serem exatos. Esses resultados provêm de definições criadas pelo homem; porém quando se obtém resultados oriundos de uma medida, não se tem total controle e nem absoluta certeza sobre a natureza do mensurando. (LIMA, 1999)

A metodologia padronizada somente começou a ser difundida mundialmente, a partir de 1993. Esse tratamento estatístico chamado incerteza de medição possui uma origem

desconhecida. É provável que tenha começado no início do século XIX com Gauss, Laplace e Bessel, que trabalharam na redação e aperfeiçoamento do método a partir do qual tornou-se possível definir uma distribuição de erros em variáveis medidas. (LIMA, 1999)

A análise das distribuições dos erros foi tratada historicamente com o uso de distribuições de probabilidade, trabalhando com valor mais provável de uma grandeza. Essa metodologia foi convencionalmente chamada de “teoria de erros”. A teoria dos erros representa a incerteza como erro absoluto ou relativo, proveniente dos erros encontrados em um experimento. Esse tratamento de incertezas é mais difundido nos meios acadêmicos e é conhecida como “teoria ortodoxa de erros”. Em uma de suas variadas regras, a incerteza de um resultado deve ser separada em duas categorias: aleatória e sistemática. É baseada no fato em que as incertezas sistemáticas e aleatórias são mantidas separadas em todos os cálculos, não combinando-as entre si. (LIMA, 1999)

A “teoria aleatória” se dá justamente pela combinação dos erros sistemáticos e aleatórios, tratando todos como se fossem aleatórios. É baseada no fato de um resultado poder ser agrupado em duas categorias, chamada de incerteza tipo A e incerteza tipo B. Ambas caracterizadas por variâncias e aproximações destas, suas regras são preferidas pelos físicos pois geralmente os valores são mais coerentes para o limite de erro e normalmente menores, quando comparada com a “teoria ortodoxa de erros”. (LIMA, 1999)

Como não existia uma padronização do cálculo e as duas abordagens tinham seus adeptos, havia um desacordo entre pesquisadores e físicos experimentais em relação a melhor maneira de se calcular a incerteza, além de uma enorme divergência tanto na nomenclatura quanto nos conceitos básicos. Nesse cenário, o Comitê Internacional de Pesos e Medidas - CIPM, em 1977, solicitou ao Bureau Internacional de Pesos e Medidas - BIPM (Bureau International des Poids et Mesures), que estudasse o assunto e chegasse a uma recomendação que fosse um consenso mundial, pois estavam começando a surgir recomendações de diversas organizações e a falta de uniformidade entre elas era uma preocupação. Com isso, o BIPM enviou um questionário a 31 laboratórios de metrologia nacionais e também alguns especialistas e organizações internacionais aos quais, 21 retornaram com respostas que serviram como dados iniciais para a realização dos estudos do BIPM. (LIMA, 1999)

Na primeira reunião, realizada em 1980, com especialistas de 11 laboratórios nacionais de metrologia foi definido que todos os componentes de incerteza poderiam ser caracterizados através de variâncias, não sendo de natureza diferente, apenas se distinguindo uma das outras pelo seu método de avaliação. Concluiu-se, também que a incerteza poderia ser obtida aplicando-se o método para combinação de variâncias e com isso uma recomendação

denominada INC-1 foi publicada em 1980 e enviada ao CIPM, que endossou a recomendação e emitiu a recomendação CI-1981, difundida amplamente. Em 1985, o CIPM solicitou para que a International Organization for Standardization-ISO publicasse um documento baseado nos princípios da recomendação INC-1. O Grupo de Assessoria Técnica 4 da área de metrologia Technical Advisory Group-TAG, foi escolhido pela ISO para transformar a recomendação INC-1 de maneira que melhor atendesse as necessidades da indústria e do comércio. Esse grupo composto por especialistas do CIPM, da International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC, da International Union of Pure and Applied Physics-IUPAP e da International Federation of Clinical Chemistry-IFCC, instituiu um grupo de trabalho chamado WG3 que contou com especialistas do BIPM, do IEC, da ISO e da OIML. Em 1986, o CIPM reafirmou as declarações pela recomendação CI-1986, onde solicitou que o método fosse empregado para todas as comparações internacionais representadas pelo BIPM. Somente em 1993, o documento ISO/TAG 4/WG3 “Guide to the expression of uncertainty in measurement” foi publicado pela ISO em nome das sete organizações participantes e passou a ser chamado de “ISO GUM”, revisado e publicado em 1995, com versão brasileira publicada em 1997. Uma nova versão do GUM surgiu em 2008 para corrigir alguns problemas da versão 1995 que teve sua tradução oficial no Brasil em 2012 por um grupo formado no Inmetro (INMETRO, 2012b).

Na linha do tempo da evolução da expressão da incerteza de medição foram decorridos 16 anos desde a preocupação inicial até a publicação do documento oficial em 1993, aceito internacionalmente. Entretanto, oito anos foram esperados para a finalização do documento, tempo esse para que todos os organismos pudessem analisar e contribuir para sua elaboração. (Tabela 1), (LIMA, 1999).

**Tabela 1 – Evolução da incerteza de medição**

<b>Ano</b>	<b>Acontecimento</b>
<b>1977</b>	CIPM solicita ao BIPM estudar a padronização do cálculo de incerteza
<b>1980</b>	1ª reunião do BIPM com a recomendação INC-1 sobre as conclusões
<b>1981</b>	O CIPM endossa a recomendação do BIPM com o documento CI-1981
<b>1985</b>	BIPM solicita a ISO que faça um documento detalhado sobre incerteza
<b>1986</b>	O CIPM reafirma das declarações com o documento CI-1986
<b>1993</b>	A ISO publica o documento sobre incerteza ISO/TAG 4/WG2 (ISO GUM)
<b>1995</b>	A ISO corrige e reimprime o documento ISO/TAG4/WG3 (ISO GUM)
<b>1997</b>	Primeira versão Brasileira traduzida oficialmente do GUM
<b>2008</b>	Nova versão do ISO GUM com algumas correções da versão 1995
<b>2012</b>	Tradução oficial do ISO GUM pelo grupo de trabalho do Inmetro

Fonte: LIMA, 1999

### **1.3 Erros Experimentais**

A razão da regra básica de desconfiança de um resultado experimental diz que para adquirir confiabilidade, é necessário que a medida seja repetida várias vezes por diferentes métodos e técnicas, isso se deve à impossibilidade de se conhecer a priori os erros experimentais que estão associados a uma dada experiência. Para contornar esta situação, é comum sobrestimar um erro como garantia porque é menos provável que outros resultados posteriores venham contradizê-lo. No entanto, essa timidez indigna pode ser uma segurança ilusória, pois, ao exagerar a estimativa do erro, pode-se estar escondendo uma discrepância crucial a qual pode revelar novos fatos fundamentais que estariam perdidos para sempre.

Os erros experimentais podem ser classificados em três categorias: grosseiros, sistemáticos e aleatórios, sendo que as categorias de erros sistemáticos e aleatórios são as mais frequentes e requerem um estudo cuidadoso das condições experimentais, para que possam ser detectados (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

#### **1.3.1 Erros grosseiros**

Os grosseiros são decorrentes de falhas humanas como leitura errônea de um instrumento de medida, erro de cálculo ou a utilização inadequada de um instrumento ou de uma técnica de medida. Esses erros são normalmente óbvios e os resultados decorrentes destoam dos demais. Os erros grosseiros são também denominados de ilegítimos e podem ser eliminados refazendo-se as operações erradas de forma correta. (MENDES & ROSÁRIO, 2005)

#### **1.3.2 Erros sistemáticos**

Os erros sistemáticos são associados a um determinado instrumento ou técnica de medida empregada; a melhor forma de se verificar se um resultado experimental incorre em erro sistemático é procurar obter esse mesmo resultado utilizando outros equipamentos, técnicas e mesmo outros operadores. Como o próprio nome diz, são erros que aparecem sistematicamente e, conseqüentemente, não podem ser colocados em evidência pela simples repetição de uma medida.

Alguns erros sistemáticos são tão comuns que é quase uma obrigação inspecionar todo experimento antes de se medir, para evitar que eles ocorram. Exemplos, como o não ajuste de zero de um instrumento e a medida da altura de um livro a ser realizada com o uso de uma régua; se essa régua estiver partida na marca de 1,0 cm e este lado da régua for justaposto à base do livro, o valor medido para a altura do livro será acrescido de 1,0 cm. Se esse instrumento for utilizado segundo a mesma técnica, na medida de outras alturas, todos os valores estarão sistematicamente acrescidos de um erro de 1,0 cm. Outro tipo muito comum de erro sistemático provém do desajuste do instrumento. Se um termômetro imerso em água pura, no ponto de ebulição, marcar 102 °C, ele está desajustado, e se for utilizado na medição de temperaturas, todos os valores medidos estarão sistematicamente errados.

O erro sistemático é uma derivação do valor medido e o valor de referência, que neste caso, pode ser um padrão. É por isso que na maioria das medições o primeiro passo é ter um material de referência (idealmente certificado), para que o resultado seja comparado. O valor da referência normalmente é determinado por uma técnica com maior exatidão do que a técnica que está sendo utilizada.

O erro sistemático é aquele que admite uma correção e o erro aleatório não pode ser corrigido, pois está relacionado a variabilidade da própria medição. O erro aleatório está relacionado diretamente com a incerteza, pois tem a ver com a dispersão dos resultados ao longo de um valor médio que pode ter sido corrigido ou não. (MENDES & ROSÁRIO, 2005)

### 1.3.3 Erros aleatórios

Os erros aleatórios são produzidos por variações imprevisíveis, na situação experimental. Os erros aleatórios podem ser de diferentes causas, diretamente pelo operador, que pode introduzir um erro na leitura de um instrumento ou na sua manipulação, ou por causas externas como vibrações mecânicas, oscilações na tensão da rede elétrica de alimentação ou devido à própria oscilação do parâmetro a ser medido. Ao contrário dos erros sistemáticos, os erros aleatórios não são reprodutíveis, e têm igual probabilidade de aumentar e reduzir o valor da medida. Observa-se que estes erros são distribuídos segundo uma lei empírica relativamente simples. Isso torna possível o uso de métodos estatísticos no tratamento desses erros. Exemplo comum de erro aleatório decorre do reflexo humano: ao se tentar medir um intervalo de tempo de um determinado fenômeno repetitivo, com um

cronômetro, esse erro é ora para mais ora para menos, caso a pessoa esteja sempre tentando ser a mais exata possível (MENDES & ROSÁRIO, 2005).

#### 1.3.4 Fontes de Incertezas

Em toda e qualquer medição existem fenômenos que afetam o valor do mensurando e as origens desses fenômenos são conhecidas como fontes de incerteza.

A ISO 14253-2, descreve fonte de incerteza como a característica que afeta o resultado de uma medição (ISO, 2011). Já, o documento EA-4/2 M:2013, descreve como os fenômenos que contribuem para a incerteza e, assim, para o fato do resultado de uma medição não ser caracterizada por um único valor, ou seja, contribuem para a variabilidade dos resultados que podem vir de diferentes possíveis fontes em uma medição, tais como:

- Definição incompleta do mensurando;
- Realização imperfeita da definição do mensurando (coeficiente de expansão térmica, condutividade, envelhecimento, pureza, tensão interna, etc.);
- Amostragem não representativa - a amostra medida pode não representar o mensurando definido;
- Efeitos inadequadamente conhecidos de condições ambientais ou imperfeitas medições (temperatura, vibração, umidade, contaminação, iluminação, pressão atmosférica, composição do ar, fluxo de ar, gravidade, transiente na rede elétrica, irradiação de calor, mensurando, escala, equilíbrio térmico, e outros);
- Tendências pessoais, tais como: formação, experiência, treinamento, habilidades físicas, discernimento, honestidade, dedicação, atenção, e outros;
- Resolução de instrumento finito;
- Valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência (estabilidade, qualidade, coeficiente de expansão térmica, e outros);
- Valores inexatos de constantes e outros parâmetros obtidos a partir de fontes externas e utilizados no arredondamento de resultados (erro no comprimento de onda, histerese, sistema de contato, imperfeições geométricas, rigidez, sistema de indicação (software), coeficiente de expansão térmica, paralaxe, data da última calibração, características da resposta, método de interpolação, digitação e outros);

- Aproximações e suposições incorporadas na medição (escolha e controle da referência, arredondamento, algoritmo, implementação e correção do algoritmo, número de algarismos significativos nos cálculos, interpolação/extrapolação, tratamento de erros acidentais, tipo de filtro, e outros);
- Método e procedimento (acondicionamento dos materiais, número de medições, números de pontos a medir, sequência de medições, duração das medições, escolha do princípio de medição, escolha dos equipamentos e operadores, medições por reversão, redundância múltipla e outros)
- Variações nas observações repetidas do mensurando sob aparentemente condições idênticas (aquecimento, interação dispositivo mensurando, abertura óptica e outros).

Algumas dessas fontes citadas acima podem contribuir para a última, ou seja, pode haver uma confusão achando-se que a fonte é igual quando na verdade seria diferente por não serem necessariamente independente, o que ocorre em casos mais complexos onde as interações entre as grandezas de entrada não podem ser realisticamente modeladas como sendo completamente estatisticamente independentes. A forma de quantificar a dependência estatística parcial é através da estatística linear parcial utilizando-se a correlação linear entre cada par de grandezas de entrada envolvidas. (EA, 2013), (INMETRO, 2012b)

Dessa forma, todo resultado de medição apresentado por um laboratório está sujeito a um grande número de influências que de maneira direta ou indireta irão atribuir valor ao resultado: ou na forma de erro sistemático ou na forma de incerteza.

O guia internacional para expressão da incerteza de medição, ISO GUM, considerado um divisor de águas no campo da metrologia, passou a nortear e difundir conceitos como rastreabilidade, intercomparação, incerteza expandida, graus de liberdade, probabilidade de abrangência, nível de confiança, dentre outros, em praticamente todas as áreas.

#### **1.4 Guia para expressão da incerteza de medição - ISO GUM**

O GUM tem sido adotado na maioria dos países; África do Sul, Alemanha, Brasil, Canadá, China, Estados Unidos, França, Inglaterra, Itália, Japão, Rússia e Cingapura, como documento nacional de referência, de forma minimizar eventuais dificuldades inerentes ao assunto. (INMETRO, 2012b), (INMETRO, 1999).

A metodologia do GUM adota uma abordagem de combinação de componentes de incerteza em duas categorias de acordo com seus valores numéricos estimados: avaliação de incerteza do tipo A e tipo B.

#### **1.4.1 Avaliação do tipo A:**

É o método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações. (INMETRO, 2012b)

#### **1.4.2 Avaliação do tipo B:**

É o método de avaliação da incerteza que não seja a análise estatística de uma série de observações. (INMETRO, 2012b)

O propósito de classificação da incerteza de Tipo A e Tipo B é de indicar as duas maneiras diferentes de avaliar as componentes da incerteza e serve apenas para discussão. A classificação não se propõe a indicar que haja qualquer diferença na natureza dos componentes resultando dos dois tipos de avaliação. Ambos os tipos de avaliação são baseados em distribuições de probabilidade e os componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variâncias ou desvios padrão.

#### **1.4.3 Incerteza padrão combinada**

Uma vez que as contribuições associadas com o processo de medição foram identificadas e quantificadas, é necessário combiná-las da mesma maneira a fim de prover um único valor de incerteza. Então, as incertezas padronizadas individualmente são combinadas para produzir um valor total de incerteza, denominada incerteza padrão combinada. Esta, por sua vez, representa um desvio-padrão estimado e caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurando. (INMETRO, 2012b)

#### 1.4.4 Coeficiente de sensibilidade

A lei da propagação das incertezas, como descrita no guia, é baseada numa aproximação de primeira ordem da série de Taylor, o que implica que as derivadas parciais devem ser avaliadas. Essas derivadas, denominadas coeficiente de sensibilidade, descrevem como a estimativa de saída varia com alterações nos valores das estimativas de entrada. Ao invés de serem calculados por uma função, os coeficientes de sensibilidade podem ser determinados experimentalmente medindo a variação na grandeza de saída causada por uma variação na grandeza de entrada, enquanto se mantêm constantes as outras grandezas. (INMETRO, 2012b)

#### 1.4.5 Fator de abrangência

Convém que a incerteza final a ser declarada forneça um intervalo a qual se espera abranger uma distribuição de valores. Para isso, associa-se um “k” (fator de abrangência).

O procedimento apropriado para calcular o fator de abrangência k, quando as condições do teorema do limite central são conhecidas, resume-se na utilização da fórmula de Welch-Satterthwaite para determinação dos graus de liberdade efetivos que, através da sua projeção numa tabela da distribuição t de Student, determina-se o fator de abrangência k (EA, 2013)

#### 1.4.6 Incerteza Expandida

A incerteza final a ser declarada é a incerteza expandida, que é a multiplicação de k pela incerteza-padrão combinada a fim de obter-se um nível de confiança em que encontram-se os valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. (INMETRO, 2012b)

O método ideal para avaliar e expressar a incerteza de medição de uma medição deve ser passível de ser aplicado a todas as espécies de medição e a todos os tipos de dados de entrada usados nas medições. Entretanto, a grandeza usada para expressar a incerteza deve ser internamente consistente, ou seja, diretamente derivável dos componentes que para ela contribuem e transferível, para que seja possível usá-la como um componente na avaliação de incerteza de outra medição. (INMETRO, 2012b)

O método proposto pelo ISO GUM é baseado na propagação da incerteza através do modelo matemático de medição. Entretanto, tal método apresenta algumas dificuldades: a

complexibilidade conceitual e a necessidade de construir um modelo matemático da medição. Além disso, o método de propagação da incerteza requer o atendimento de certas condições: a linearidade do modelo e a normalidade da distribuição da variável aleatória que representa os valores possíveis do mensurando. Com isso, sua aplicabilidade não é tão ampla como seria desejada. Este método pode não ser adequado a resultados em algumas situações, como por exemplo, em medições que correspondam a modelos não lineares ou apresentam grandezas de influência com predominância não-normal. (DONATELLI & KONRATH, 2005)

### **1.5 Controle da qualidade de vacinas**

A história contemporânea da política de imunizações no Brasil tem como referência o ano de 1973, com o término da campanha de erradicação da varíola, iniciada em 1962, e a criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI) que introduziu a aplicação dos conceitos de vigilância epidemiológica e estabeleceu mecanismos de avaliação do programa. Essas iniciativas permitiram perceber a construção de uma base técnica, política e institucional que consolidou-se como importante ferramenta do Estado no controle efetivo de algumas doenças através da imunização. (TEMPORÃO, 2003) (TEIXEIRA; ALMEIDA, 2003)

Atualmente, em termos conceituais, as vacinas são definidas como produtos farmacêuticos que contêm um ou mais agentes imunizantes em diversas formas biológicas. O produto final pode conter, além do agente imunizante, componentes originados dos substratos de produção, bem como conservantes, estabilizantes e antibióticos (OMS, 2000). Apesar dos processos de produção e purificação terem atingido nos últimos anos elevado grau de qualidade, ainda existe a possibilidade de surgirem efeitos indesejáveis, em virtude de serem constituídas por vários componentes biológicos e químicos (BRASIL, 1998), (OMS, 2000). Com isso, produtos biológicos, tais como produtos derivados ou produzidos a partir de organismos vivos podem variar suas características de um lote para outro. Conseqüentemente, um minucioso controle da qualidade na liberação de lotes é requerido para garantir que esses produtos sejam seguros e eficazes. (MELANDRI, 2010)

A expressão “Controle da qualidade” refere-se às ações relacionadas com a medição de alguns parâmetros relacionados à qualidade para avaliar se os requisitos estão a ser respeitados para a finalidade a que se destina. Esses controles da qualidade são realizados pelo laboratório produtor e pela agência regulatória do país de origem obedecendo critérios padronizados estabelecidos pelos compêndios oficiais.

Neste contexto, no Brasil, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, criado em 1981, é o único órgão responsável pelo controle da qualidade de imunobiológicos destinados para o uso no Programa Nacional de Imunizações – PNI. Dentre os imunobiológicos analisados no INCQS, foi selecionada a vacina adsorvida da hepatite B para a realização deste estudo.

## **1.6 Hepatite B**

A Hepatite B é uma doença causada pela infecção do vírus da hepatite B (HBV), um vírus de DNA. As partículas virais produzidas pelo HBV são encontradas no soro de indivíduos infectados.

A infecção pelo HBV afeta principalmente o fígado e o período de incubação da hepatite B é de 90 dias (variando de 60 a 150 dias). O índice de letalidade geral de hepatite B aguda é de aproximadamente 1%. A hepatite B aguda progride para infecção crônica por HBV em 30% a 90% das pessoas infectadas, como bebês ou crianças pequenas e em <5% das pessoas infectadas durante a adolescência ou na idade adulta. A infecção crônica pelo HBV pode resultar em doença crônica do fígado, incluindo cirrose e câncer de fígado (CDC, 2015a)

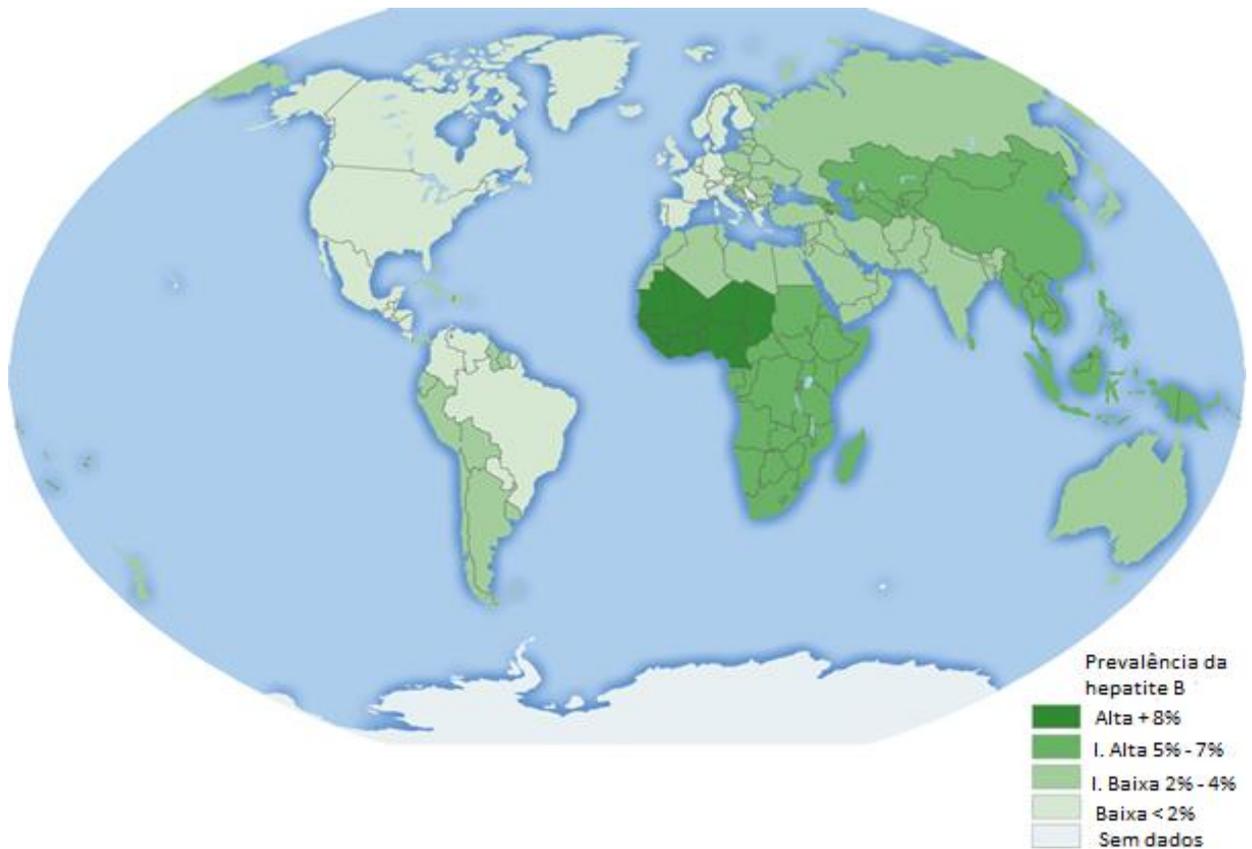
O HBV é altamente infeccioso e facilmente transmitido através da via sexual, transfusões de sangue, procedimentos médicos e odontológicos e hemodíalises sem as normas adequadas de biossegurança; transmissão vertical (mãe-filho), contatos íntimos domiciliares (compartilhamento de escova dental e lâminas de barbear), através de acidentes perfurocortantes, compartilhamento de seringas e de material para a realização de tatuagens e “piercings”. (BRASIL, 2016)

### **1.6.1 Epidemiologia da hepatite B**

A OMS calcula que mais de 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas e em risco de doença grave e morte, principalmente em decorrência da cirrose hepática e do carcinoma. Cerca de 780.000 pessoas morrem todos os anos devido às conseqüências agudas ou crônicas da hepatite B (OMS, 2015)

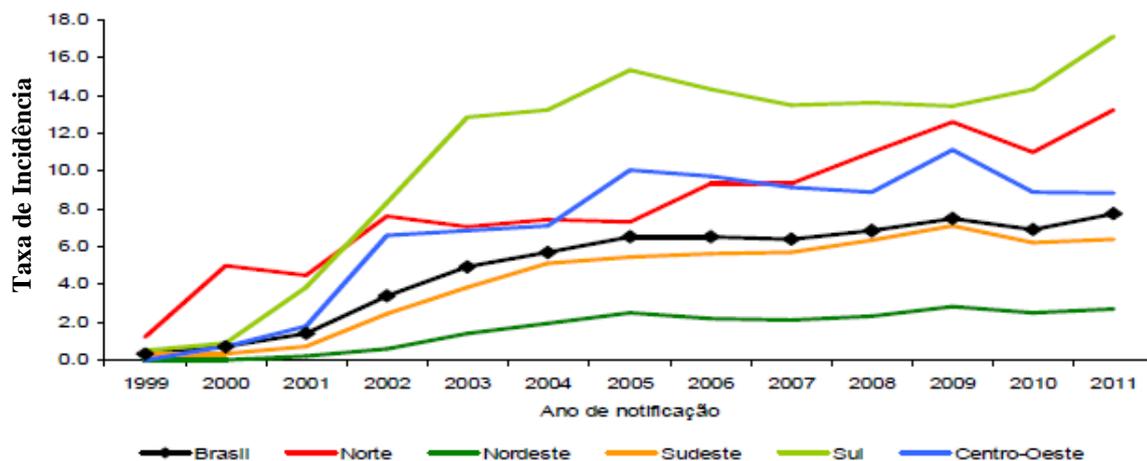
A infecção pelo HBV exhibe padrões de alta, média e baixa prevalência distribuída mundialmente e a taxa de incidência da doença no intervalo de 1999 a 2011 são mostrados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

**Figura 2:** Distribuição Mundial HBsAg. Mapa mostrando a prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B no mundo.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2015a

**Figura 3:** Taxa de incidência de casos hepatite B (por 100.000 habitantes) segundo a região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2011



Fonte: Brasil, 2016

### 1.6.2 Vacinação contra a hepatite B

Em 1981, foi licenciada a primeira vacina contra a hepatite B, que consistiu de HBsAg purificado a partir do plasma de indivíduos com infecção crônica por HBV. Em 1986, foi introduzida a vacina contra hepatite B utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante que substituiu a vacina derivada de plasma humano (OMS, 2016)

As vacinas contra a hepatite B estão indicadas de forma universal para todas as crianças, adolescentes e adultos pertencentes aos grupos de risco: politransfundidos, pacientes submetidos à diálise, profissionais da saúde, contactantes domiciliares com portador crônico, parceiro sexual de portador crônico, usuários de drogas injetáveis, pessoas de vida sexual ativa e imigrante de áreas endêmicas (CDC, 2015b)

As vacinas contra a hepatite B têm eficácia de 80% a 100% em prevenir a infecção naqueles indivíduos que recebem o esquema completo de vacinação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000) (CDC, 2015c) (WONG, NATH, & SNINSKY, 1985) Os títulos de anti-HBs considerados protetores são superiores a 10 mUI/mL (CDC, 2015c)

Atualmente, no calendário de vacinação do Ministério da Saúde Brasileiro, existem vacinas contra hepatite B monovalentes e combinadas com outros antígenos também chamadas de pentavalentes, como é mostrado no quadro 1. (BRASIL, 2014)

**Quadro 1:** Calendário básico de vacinação da criança

Grupo Alvo	Idade	Hepatite B	Penta/DTP
Crianças	Ao nascer	Dose ao nascer	
	2 meses		1ª dose
	3 meses		
	4 meses		2ª dose
	5 meses		
	6 meses		3ª dose
	9 meses		
	12 meses		
	15 meses		1º reforço (com DTP)
	4 anos		2º reforço (com DTP)
	9 anos		
Adolescente	10 a 19 anos	3 doses (a depender da situação vacinal)	
Adulto	20 a 59 anos	3 doses (a depender da situação vacinal)	
Idoso	60 anos ou mais	3 doses (a depender da situação vacinal)	
Gestante		3 doses (a depender da situação vacinal)	

Fonte: Portal da Saúde – Ministério da Saúde (BRASIL, 2014)

O calendário básico para crianças consiste em vacinar contra hepatite B monovalente (recombinante) os recém-nascidos, preferencialmente nas primeiras 12 horas. Com a vacina combinada na pentavalente são aplicadas mais 3 doses, com intervalo de 60 dias, a partir de 2 meses de idade. Os dois reforços necessários são realizados com a vacina DTP (difteria, tétano e pertussis) aos 15 meses e com 4 anos. Para adultos, a vacina é aplicada em 3 doses com intervalo de 1 mês entre as doses. (BRASIL, 2014)

### 1.6.3 Avaliação da potência para o componente da hepatite B

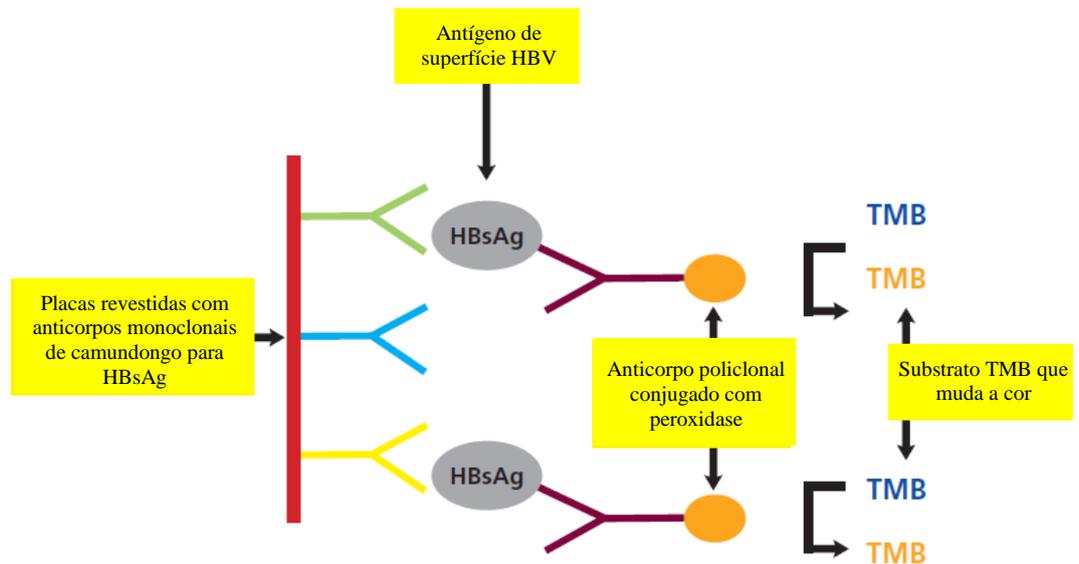
Conforme a norma os compêndios oficiais do país (exemplo: Farmacopeia Brasileira), o ensaio de potência da vacina contra hepatite B recombinante pode ser realizado por métodos validados, tais como imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – *ELISA*) ou

radio-imunoensaio (*radio-immunoassay* – *RIA*) usando anticorpos monoclonais específicos para os epítomos do HBsAg. Deve-se diluir adequadamente a vacina e usar em paralelo uma vacina de referência. O modelo de linhas paralelas pode ser usado para analisar os valores que devem ser transformados estatisticamente. O ensaio é considerado válido se não demonstrar desvio de linearidade e paralelismo. Kits comerciais para medição *in vitro* da potência do HBsAg podem ser utilizados. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2016); (FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2008)

#### 1.6.4 Método imunoenzimático do tipo ELISA

O método imunoenzimático do tipo ELISA é sensível e específico, desenhado para facilitar o estudo de um grande número de amostras simultaneamente. O princípio básico da reação de um ensaio ELISA está na propriedade das proteínas (os anticorpos ou antígenos) serem facilmente adsorvidos a superfícies sólidas como as plásticas ao qual são detectáveis através de reações enzimáticas. Assim sendo, a partir do momento que um anticorpo encontra-se aderido a uma placa de ELISA, podem-se buscar antígenos que se ligam a esse anticorpo. A separação entre os compostos que se ligaram e os que estão livres é feita por sucessivos processos de lavagens da placa. O resultado de um ensaio do tipo ELISA é uma reação cromogênica detectada pela adição de um segundo anticorpo específico (denominado conjugado) que detecta os antígenos. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima, a qual é ligada à peroxidase, o resultado pode ser avaliado pela simples observação ou por espectrofotômetros específicos, pois os orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração. (Figura 4). (TIJSSEN, et al.,1993; MARTINEZ et al.,1999).

**Figura 4:** Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche



Fonte: (DIASORIN, 2009)

### 1.6.5 Análise estatística do resultado

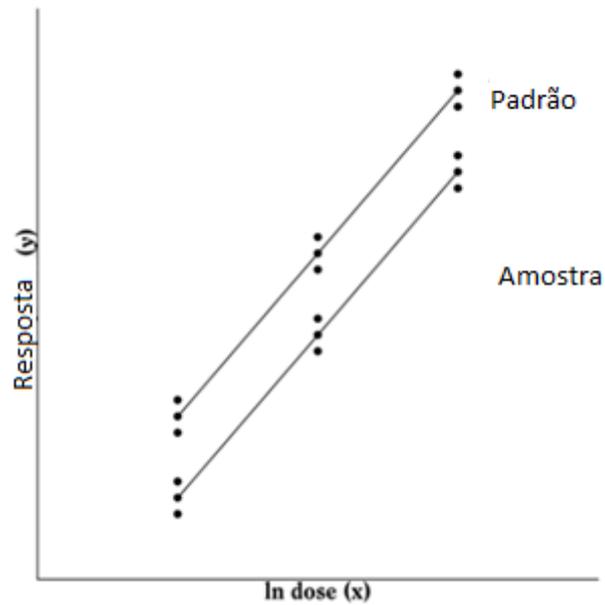
Os valores de absorbâncias lidas pelo espectrofotômetro deverão ser analisados estatisticamente de modo a estimar a potência da vacina.

O método de análise estatística das linhas paralelas é amplamente utilizado na área de ensaios biológicos. Este método consiste na avaliação da relação dose-resposta, onde a resposta  $y$  depende da dose  $x$  de acordo com a relação  $f(y) = c_i + b \cdot \log_e(x) + \varepsilon$ , onde  $f$  é um tipo de transformação,  $c_i$  é o intercepto da preparação  $I$ ,  $b$  é a inclinação comum e  $\varepsilon$  é um erro estatístico na sequência de uma distribuição normal com expectativa 0. Uma vez que a dose exata das amostras de ensaio não é conhecida, as interseções não são geralmente as mesmas para cada amostra. A distância horizontal entre as linhas paralelas obtidas é a correção que tem que ser aplicada à potência assumida para encontrar uma estimativa da potência verdadeira. (EDQM, 2008)

O modelo das linhas paralelas, conforme ilustrado na Figura 5, é calculado a partir de 2 linhas que relacionam o logaritmo neperiano da dose e a resposta tanto para o padrão quanto para a amostra. Os logaritmos das doses são representados no eixo horizontal. As respostas

estão indicadas no eixo vertical. A resposta individual de cada tratamento é indicada com pontos pretos.

Figura 5 – Gráfico relacionando  $\ln$  da dose ( $x$ ) e a resposta ( $y$ ) no modelo de linhas paralelas



Fonte: (Farmacopéia Européia, 2008)

Para expressar os resultados de avaliação biológica como estimativa da suposta potência para uma amostra, é considerada a expressão da potência verdadeira relativa da amostra em relação ao padrão. Tal estimativa da suposta potência deve ser acompanhada pelos limites de confiança inferior e superior, ou intervalo que abrange a verdadeira potência relativa da amostra. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

## 2 JUSTIFICATIVA

Como a tendência mundial é a aceitação de resultados entre os países, o cálculo das incertezas de medição é fundamental para a comparação de resultados e conseqüentemente o reconhecimento da competência técnica, através da acreditação de laboratórios.

Vários estudos para avaliação de estimativas de incertezas encontram-se disponíveis na literatura, entretanto esses estudos restringem-se apenas para avaliações físico-químicas, não abrangendo suficientemente avaliações em outras áreas, como por exemplo, potência de produtos biológicos (vacinas).

Quando se relata um resultado de um ensaio é importante dar alguma indicação quantitativa da qualidade do resultado de forma que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Os resultados encontrados nas avaliações de potência das vacinas contra hepatite B analisadas no INCQS são aprovados com base nos valores de referência fornecidos em especificações ou normas oficiais, que não levam em consideração a incerteza das medições. Portanto, o presente estudo propõe a aplicação da incerteza de medição nas análises de potência da vacina adsorvida da hepatite B para que as influências nos resultados sejam estabelecidas, de forma realista e futuramente possa ser incluída em normas oficiais, seguindo uma tendência internacional.

Para isso, é necessário que exista um procedimento padrão que seja de pronta aplicação, fácil compreensão e que possa avaliar e expressar a incerteza de medição, caracterizando assim, a qualidade do resultado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar e mensurar as fontes de incerteza da medição atribuídas aos resultados de potência das vacinas adsorvida da hepatite B, realizado no INCQS.

##### Objetivos específicos

- Analisar metodologia do ensaio de potência da hepatite B para identificar as possíveis fontes de incerteza;
- Mensurar a dimensão de cada componente de incerteza identificado;
- Modelar matematicamente o ensaio de potência da vacina;
- Calcular a incerteza de medição para os ensaios de potência da vacina utilizando planilhas eletrônicas;
- Analisar os resultados obtidos para conhecer o nível de influência de cada fonte e a correlação entre elas;
- Selecionar as fontes de influência no resultado do ensaio;
- Padronizar o cálculo da incerteza de medição para o ensaio da vacina contra hepatite B.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de vacinas adsorvida de hepatite B

Amostras de lotes de vacinas adsorvidas de hepatite B, monovalentes, adquiridas pelo Ministério da Saúde e enviadas para o controle da qualidade, no INCQS.

As amostras selecionadas foram codificadas como amostras do produtor A. Um total de 2 amostras (4196/13 e 4461/14), armazenadas de 2 °C a 8 °C foram selecionadas para o estudo.

A amostra de vacina de referência utilizada foi a 4196/13, contendo 21µg/mL, eleita no laboratório para uso na rotina em janeiro de 2014.

### 4.2 Avaliação da potência da vacina adsorvida de hepatite B pelo método *in vitro*

Para a avaliação da potência das amostras foram realizados ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA. Para tanto, foi selecionado o kit comercial (Murex HBsAg versão 3 – laboratório DiaSorin para detecção do antígeno de superfície da hepatite B, HBsAg, através da metodologia *in vitro*.

#### 4.2.1 Instrumentos/Equipamentos utilizados no ensaio

- a) Balança Mettler Toledo modelo PG2002S com resolução 0,01g;
- b) Micropipeta Eppendorf de 10µL a 100µL;
- c) Micropipeta Eppendorf de 200µL a 1000µL;
- d) Micropipeta Brand de 500µL a 5000µL;
- e) Estufa Revco Habitat, modelo 3500, faixa de variação: 5° C acima da temperatura ambiente até 60°C;
- f) Termômetro digital, resolução 0,1° C, faixa de variação de -50 a 70° C, marca Incoterm;
- g) Lavador de placas, marca Biotek, modelo ELX50;
- h) Leitor de microplacas (96 poços), Biotek, modelo: ELX800, faixa de variação: 400 nm a 750 nm.

#### 4.2.2 Método *in vitro* – Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA – kit Murex (metodologia padrão do laboratório)

A metodologia padrão do ensaio *in vitro* do laboratório consiste no uso de amostras de vacina de hepatite B em análise e de referência, após o processo de dissociação do hidróxido de alumínio, usando o kit Murex, na temperatura de 37° C, e diluente na concentração de 0,2% de BSA/PBS.

Para tanto, foram adicionados 300 µL de solução de pré-tratamento (Diethanolamine, triton X e PBS), a 300µL da vacina para a retirada do hidróxido. Após, foi homogeneizado e incubado em temperatura ambiente, aproximadamente por trinta minutos; centrifugado aproximadamente por 1 minuto a 231 x g para precipitar o hidróxido de alumínio dissociado e os sobrenadantes retirados para a realização das diluições das vacinas.

Resumidamente a metodologia de ensaio consiste em adicionar 100µL do sobrenadante em 900 µL do diluente da amostra para obter uma solução de 1µg/mL, adicionar 20µL da solução de 1µg/ mL em 980 µL de diluente da amostra para obter uma solução de 20ng/mL e seguir os quadros 2 e 3 de diluições abaixo:

Quadro 2 - Diluições da vacina de referência interna (em triplicata):

Concentração da vacina (ng/mL)	Diluições	Volume em µL da solução de 20 ng/mL	Volume em µL do diluente a ser adicionado
0,25	1:80000 (1/80 x 1/1000)	12,5	987,5
0,5	1:40000 (1/40 x 1/1000)	25	975
1,0	1:20000 (1/20 x 1/1000)	50	950
1,5	1:13333 (1/13,3 x 1/1000)	75	925

Quadro 3 - Diluições da vacina em análise (em triplicata):

Concentração da vacina (ng/mL)	Diluições	Volume em µL da solução de 20 ng/mL	Volume em µL do diluente a ser adicionado
0,25	1:80000 (1/80 x 1/1000)	12,5	987,5
0,5	1:40000 (1/40 x 1/1000)	25	975
1,0	1:20000 (1/20 x 1/1000)	50	950
1,5	1:13333 (1/13,3 x 1/1000)	75	925

Após realização das diluições conforme os quadros 2 e 3, adicionar 100 µL do controle negativo nos poços A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e E<sub>1</sub>, da placa de 96 poços recoberta com anticorpos monoclonal conforme descrito na bula de procedimento do kit murex. Nos poços C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub>, 100 µL do controle positivo e em cada um dos poços seguintes 100 µL das amostras diluídas. Cobrir a placa e incubar por 60 minutos a 37° C. Ao término do período de incubação, adicionar 50 µL do conjugado (anticorpo de cabra para HBsAg marcado com peroxidase de rábano), em cada poço e agitar a placa por 10 segundos manualmente. Cobrir a placa e incubar por 30 minutos a 37° C. No final do período de incubação, lavar a placa 5 vezes com a solução de lavagem. Após completar a lavagem, inverter a placa para retirada de toda a solução de lavagem. Adicionar 100 µL de solução de substrato (tetrametilbenzidina 3,3',5,5' e peróxido de hidrogênio), em cada poço. Cobrir e incubar por 30 minutos a 37° C. Parar a reação com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M em cada um dos poços. Proceder à leitura das absorvâncias através da leitora de microplacas (Biotek, modelo ELX 800), utilizando-se o filtro de 450 nm. Avaliar os resultados de absorvâncias das diluições da vacina de referência interna e da vacina em análise (INCQS, 2015), através da aplicação da metodologia estatística de linhas paralelas, descrita nas equações (1), (2) e (3) da Farmacopeia Europeia, 8.7 (capítulo 5.3), para avaliação da potência relacionadas abaixo:

$$Potência = C M \quad (1)$$

Onde:

$$C = \frac{SS_{reg}}{SS_{reg} - s^2 t^2} \quad (2)$$

SS reg = soma dos quadrados da regressão linear

s = erro residual

t = fator de abrangência da distribuição normal com 95% de confiança

$$M = \frac{P_T - P_S}{db} \quad (3)$$

P<sub>T</sub> = Somatório total da preparação T (amostra)

P<sub>S</sub> = Somatório total da preparação S (referência)

b = é a inclinação comum entre as retas

d = número de diluições

$$b = \frac{H_L(L_S + L_T + \dots)}{Inh} \quad (4)$$

$H_L$  = Variação total dos tratamentos

$L_S$  = Contraste linear da referência S

$L_T$  = Contraste linear da amostra T

I é o  $L_n$  (logaritmo neperiano) da relação entre as doses adjacentes de cada preparação

n é o número de réplicas,

h é o número de preparações

Para o cálculo de M e C, as equações de regressão linear descritas abaixo, são necessárias:

Tabela 2 - Fórmula para ensaio de linhas paralelas com “d” doses de cada preparação

	<b>Padrão (s)</b>	<b>1º amostra teste</b>
<b>Média da dose resposta mais baixa</b>	$S_1$	$T_1$
<b>Média da resposta da 2ª dose</b>	$S_2$	$T_2$
...	...	...
<b>Média da dose resposta mais alta</b>	$S_d$	$T_d$
<b>Total da Preparação</b>	$P_s = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \dots + T_d$
<b>Contraste Linear</b>	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d - \frac{1}{2}(d+1)P_s$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \dots + dT_d - \frac{1}{2}(d+1)P_T$

Tabela 3 - Fórmulas adicionais para construção da análise de variâncias

<b><math>H_P = n/d</math></b>	<b><math>H_L = 12n / (d^3 - d)</math></b>	<b><math>K = n (P_s + P_T)^2 / hd</math></b>
-------------------------------	---	--

Tabela 4 - Fórmula para cálculo da soma dos quadrados e graus de liberdade

<b>Fonte de variação</b>	<b>Graus de Liberdade (f)</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>
<b>Preparações</b>	$h - 1$	$SS_{prep} = H_P(P_S^2 + P_T^2) - K$
<b>Regressão Linear</b>	1	$SS_{reg} = \frac{1}{h} H_L(L_S + L_T)^2$
<b>Não paralelismo</b>	$h - 1$	$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_T^2) - SS_{reg}$
<b>Não linearidade (*)</b>	$h(d - 2)$	$SS_{lin} = SS_{trat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
<b>Tratamentos</b>	$hd - 1$	$SS_{trat} = n(S_1^2 + \dots + S_d^2 + T_1^2 + \dots + T_d^2) - k$

(\*) Não calculado para ensaio de duas doses

Tabela 5 – Fórmula para cálculo do erro residual

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados
<b>Erro residual</b>	hd (n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{trat}$
<b>Total</b>	nhd - 1	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

Onde:

n é o número de réplicas,

h é o número de preparações

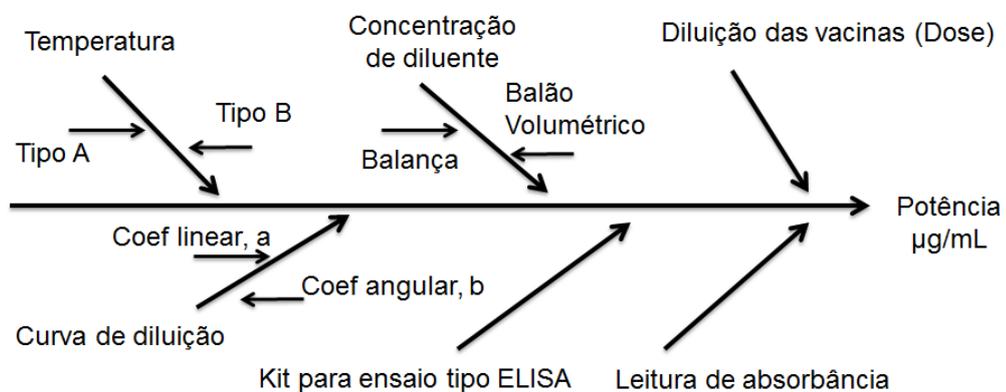
d é o número de dose

Baseado em estudos de variabilidade observados em estudos, pode-se esperar uma potência estimada com valores entre 80% e 140% da potência rotulada com 95% de confiança. (PHAMEUROPA, 1997) (OMS, 2010)

### 4.3 Seleção das fontes de incerteza do ensaio

Após estudo do ensaio e avaliação (experiência dos operadores) das possíveis interferências nos resultados, seguem as incertezas do tipo B selecionadas (figura 6):

Figura 6 - Fontes de incerteza selecionadas para estudo



Fonte: elaborado pelo autor

Para que cada contribuição possa fazer parte do cálculo da incerteza de medição é necessário conhecer o quanto cada fonte impacta no resultado da medição. Desse modo, um

planejamento de experimento foi elaborado para determinar quais ensaios precisariam ser realizados de forma que pudéssemos conhecer os impactos das grandezas de entrada no mensurando.

#### 4.3.1 Avaliação das influências das incertezas do tipo B: temperatura de incubação e concentração de diluente

Para avaliar o impacto da temperatura e do diluente da vacina no mensurando (potência) foram realizados 2 ensaios, com oito diferentes condições, para cada amostra selecionada, no total de dezessete ensaios, conforme a tabela 6.

**Tabela 6 - Condições de ensaio**

Condição	Concentração de Diluente (%BSA/PBS)	Temperatura da estufa (°C)
1	0,1	34
2	0,3	34
3	0,1	40
4	0,3	40
5	0,2	37
6	0,2	40
7	0,1	37
8	0,3	37
9	0,2	34

#### 4.3.2 Avaliação das influências das incertezas do tipo B: uso de kit comercial para o ELISA

A bula do kit selecionado para o estudo não contém informação sobre a incerteza. Dessa maneira, a incerteza do kit foi estimada com base no estudo apresentado no Guia de validação da World Organization for Animal Health–OIE, com algumas adaptações. Foram realizadas 10 medições do controle positivo e calculado o desvio-padrão. A incerteza é obtida pela divisão do desvio-padrão pelo número de medidas (OIE, 2014). Os controles positivo e negativo do

ensaio são reagentes que acompanham o kit comercial e são usados para validação interna do ensaio (DIASORIN, 2009).

#### 4.3.3 Avaliação das influências das incertezas do tipo B: Diluição da vacina em análise e da referência, Curva de diluição e Leituras das absorbâncias

Não foi necessário a realização de ensaio para essas fontes de incerteza do tipo B.

#### 4.4 Determinação do modelo matemático do ensaio

Para determinação do modelo matemático do ensaio foi utilizada a metodologia de planejamento de experimentos para obtenção de relação estatística com menor custo, ou seja, otimização do número de ensaios realizados, conforme mostrados na tabela 6.

A análise fatorial dos resultados foi usada para determinação dos coeficientes da equação, onde Y será a potência estimada da vacina, B0 é o intercepto da curva (valor da potência em condições normais de ensaio), B1 é o quanto o diluente interfere na potência final, B2 é quanto a temperatura influencia na potência final e B12 é quanto as duas variáveis juntas influenciam o valor final.

Formula:

(5)

#### 4.5 Metodologias de cálculo da incerteza de medição baseada no ISO GUM

A metodologia de cálculo usada segundo o ISO GUM resume-se na expressão geral da incerteza de medição, através da formula:

$$U = k \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (6)$$

Onde:

U = Incerteza de Medição Expandida

$k$  = Fator de Abrangência

$\frac{\partial y}{\partial x_i} = C_i$  = Derivada parcial da função  $y = f(x_1, x_2, \dots, x_i)$ , em relação à grandeza

de entrada  $x_i$ .

$U(x_i)$  = Incerteza-padrão da grandeza de entrada estimada  $x_i$ .

Para calcular a incerteza-padrão da grandeza de entrada estimada  $x_i$  foi necessário avaliarmos:

#### 4.5.1 Incerteza tipo A

Para obtermos a incerteza tipo A foi necessário a avaliação do desvio-padrão amostral (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (7)$$

onde:

$n$  – número de leituras.

$x_i$  – número da  $i$ ésima leitura (variante da equação)

$\bar{x}$  – média aritmética das leituras do mensurando

Com o valor do desvio-padrão, calculamos a incerteza do tipo A ( $u_A$ ).

$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

#### 4.5.2 Incerteza tipo B

As incertezas do tipo B avaliadas foram todas as mencionadas no item 4.2. Onde, para obtermos a incerteza padrão da grandeza de entrada estimada  $x_i$ , houve a necessidade de dividir a incerteza pelo divisor da distribuição a qual ela pertence. Onde, o divisor será o valor do fator de abrangência encontrado.

### 4.5.3 Incerteza Combinada

As contribuições de incerteza foram combinadas na mesma unidade e com o mesmo nível de confiança de 95,45% e cada estimativa de incerteza de entrada padronizada foi multiplicada pelo seu coeficiente de sensibilidade, conforme equação:

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^N [c_i u(x_i)]^2} \equiv \sum_{i=1}^N u_i^2(y) \quad (9)$$

onde:

$$c_i = \frac{\partial f}{\partial x_i} \cdot u(x_i)$$

O coeficiente de sensibilidade descreve o quanto a estimativa de saída  $y$  é influenciada por variações da estimativa de entrada  $x_i$ . Ele foi calculado a partir da derivada da função modelo, (equação acima), e usando métodos numéricos, isto é, calculando a mudança na estimativa de saída  $y$  devido a uma mudança na estimativa de entrada  $x_i$ .

### 4.5.4 Valor do fator de abrangência (k)

Para se determinar o coeficiente de abrangência (k), calculamos o número efetivo de graus de liberdade ( $\eta_{\text{eff}}$ ), obtido através da fórmula de “Welch-Satterhwaite”, que aproxima, por combinação apropriada, os graus de liberdade das diferentes contribuições da incerteza-padrão combinada. Com ele determinamos o fator numérico utilizado como um multiplicador da incerteza-padrão combinada de modo a obter uma incerteza expandida (EA, 2013)

Após o cálculo do número efetivo de graus liberdade, encontramos o valor de k na tabela “t de Student”.

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(u(x_i) \cdot c_i)^4}{v_i}} \quad (10)$$

#### 4.5.5 Incerteza expandida

A incerteza expandida foi obtida através da fórmula:

$$U = k \cdot u_c(y) \quad (11)$$

#### 4.6 Análise gráfica das contribuições (balanço das incertezas)

Através dos gráficos é possível visualizar as contribuições mais relevantes e que mais impactam no resultado final. Portanto, foi utilizado o modelo de gráfico de pizza para demonstrar os efeitos de cada componente de incerteza.

#### 4.7 Metodologia padrão para cálculo da incerteza de medição do ensaio de potência da vacina da hepatite B

Para o desenvolvimento da metodologia padrão foi construída uma planilha de Excel para os cálculos da potência, seguindo as equações (1), (2) e (3), e da incerteza de medição.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Método *in vitro* – Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA – kit Murex (metodologia padrão do laboratório)

A potência da amostra 4461/14, foi avaliada em dois momentos; no primeiro momento, a análise foi feita com o uso da vacina de referência 4196/13, e o resultado obtido de foi de 22 µg/mL (Quadro 5).

No segundo momento, os valores de absorvâncias obtidos para cada amostra (4461/14 e 4196/13), no primeiro momento, foram usados como valores de referência para a avaliação das potências das amostras usando os diferentes parâmetros (concentração do diluente PBS/BSA e temperatura) conforme resultados apresentados nos Quadros 4, 5 e 6.

O valor de potência rotulado indica 20 µg/mL de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Por se tratar de produto biológico, os resultados de potência encontrados para as amostras 4196/13 e 4461/14 estão de acordo com a variabilidade esperada. Essa observação está compatível com os dados encontrados na literatura pertinente, onde cada lote do mesmo produto pode ter diferentes potências (PHARMEUROPA, 1997).

### 5.2 Método padrão modificado para avaliação das influências das incertezas do tipo B: temperatura de incubação (34 ° C, 37 ° C e 40° C) e concentrações de diluente (0,1%; 0,2% e 0,3%)

No quadro 4 estão apresentados os resultados de potência da média de seis ensaios realizados à temperatura incubação de 34° C e concentrações variadas de diluente PBS/BSA (0,1; 0,2 e 0,3 %). Os resultados encontrados para as amostras analisadas (4196/13 e 4461/14), simultaneamente foram mais baixos para as concentrações 0,1% e 0,3% de BSA.

**Quadro 4 - Valores de potências com 34°C**

Temperatura de incubação (°C)	Concentração de Diluente (%)	Amostra 4196 Pot (µg/mL)	Amostra 4461 Pot (µg/mL)
34	0,1	15	15
34	0,2	19	19
34	0,3	16	16

Fonte: elaborado pelo autor

No quadro 5 estão apresentados os resultados de potência da média de seis ensaios realizados à temperatura incubação de 37° C e concentrações variadas de diluente PBS/BSA (0,1; 0,2 e 0,3 %). Os resultados encontrados para as amostras analisadas (4196/13 e 4461/14), simultaneamente não apresentaram alterações consideráveis para a amostra 4461/14, entretanto, para a amostras 4196/13 , apresentou queda nos valores de potência nas concentrações 0,1% e 0,3% de BSA.

**Quadro 5 - Valores de Potências com 37°C**

Temperatura de incubação (°C)	Concentração de Diluente (%)	Amostra 4196 Pot (µg/mL)	Amostra 4461 Pot (µg/mL)
<b>37</b>	0,1	19	22
<b>37</b>	0,2	21	22
<b>37</b>	0,3	19	23

Fonte: elaborado pelo autor

No quadro 6 estão apresentados a média de cinco resultados de potência dos ensaios realizados à temperatura incubação de 40° C e concentrações variadas de diluente PBS/BSA (0,1; 0,2 e 0,3%). Os resultados encontrados para as amostras analisadas (4196/13 e 4461/14), simultaneamente apresentou queda de resultado de potência para a amostra 4196/13 na concentração de 0,1% de BSA e para a amostra 4461/14, a queda no resultado de potência foi para a concentrações de 0,3%. Valores de potência mais elevados foram encontrados para a concentração de 0,1% e 0,2% de BSA.

Apesar dos resultados encontrados para a amostra 4196/13 a temperatura a 40°C estarem próximos aos resultados obtidos com a mesma amostra quando usamos com a temperatura de 37°C, não foi considerado válido devido ao fato de que a temperatura de uso recomendado na bula do kit é 37°C.

**Quadro 6 - Valores de potência com 40°C**

Temperatura de incubação (°C)	Concentração de Diluente (%)	Amostra 4196 Pot (µg/mL)	Amostra 4461 Pot (µg/mL)
<b>40</b>	0,1	20	24
<b>40</b>	0,2	21	24
<b>40</b>	0,3	22	20

Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados encontrados para as diferentes temperaturas selecionadas para o estudo (quadros, 4, 5 e 6), mostraram oscilações nos resultados de potência nas amostras analisadas. É conhecido que muitos fatores podem influenciar as interações entre antígeno e anticorpo porque as ligações químicas são baseadas em forças eletrostáticas. Essas interações podem ser consideradas ligações forte ou fracas dependendo do modelo das moléculas envolvidas na busca pelo melhor equilíbrio entre as forças. (NICÉSIO, 2013) Dentre os tipos de interações podemos citar as de Van der Waals, hidrogênio e hidrofóbica. Essas forças possuem importância primária nas interações do determinante antigênico (epítopo), e a região do anticorpo que se liga ao antígeno (paratopo). Os anticorpos são divididos em dois tipos conhecidos por “quentes” e frios” em relação a questão térmica da reação antígeno-anticorpo. Entretanto, a probabilidade térmica depende da natureza química de ambos epítopo e paratopo ou melhor, os tipos de ligações envolvidas. As ligações de hidrogênio são exotérmicas e são mais estáveis em baixas temperaturas. Por outro lado, a força da ligação hidrofóbica aumenta com a temperatura. Portanto, incubação estacionária, por basear-se na difusão de moléculas, é dependente da temperatura. (REVEBERI, REVEBERI, 2007)

Estudos demonstram que a vacina contra a hepatite B (HB) é estável durante até quatro anos a temperaturas de 2°C a 8°C, durante meses a 20°C a 25°C, durante semanas a 37°C e durante dias a 45°C. Tal como acontece com outras vacinas adsorvidas em sais de alumínio, o congelamento da vacina HB pode causar uma redução significativa da potência. O ponto de congelamento da vacina HB é de cerca de -0,5°C (OMS, 1998) (CARVALHO, 2014). Baseado nessa informação, o fato de a potência aumentar ou diminuir não se deve ao produto, já que o mesmo fica submetido no máximo 1 hora a uma temperatura de 40°C, o que não seria suficiente para alterar sua potência. No entanto, o kit comercial foi desenvolvido para ser incubado a uma temperatura de 37°C. (DIASORIN, 2009) Dessa forma, quando a temperatura de incubação passa para 34°C ou 40°C, as reações bioquímicas provavelmente sofrem alterações ocasionando interferências no complexo de ligação antígeno-anticorpo. (CROWTHER, 1995)

O revestimento da superfície interna da placa de ELISA com o antígeno, pelo menos no plano teórico, não é absoluto e, portanto, algumas regiões permanecem livres de ligação. Estes espaços devem ser ocupados com qualquer molécula alheia ao sistema reacional, no sentido de reduzir ou mesmo evitar a ligação inespecífica, não imune, de componentes da amostra, geradores de reações indesejáveis que possibilitam falsas interpretações. A cobertura destes espaços vazios é chamado de bloqueio. Entre as proteínas mais empregadas nesta etapa destacam-se a soro albumina bovina (BSA). Pode-se definir as albuminas como sendo

membros de uma mesma classe de proteínas, responsáveis pelo transporte das mais variadas moléculas no organismo, sejam elas de caráter hidrofóbico (ácidos graxos, bilirrubina, hormônios e drogas) ou hidrofílico (a própria água,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ). (VAN OSS, 1995)

O tampão fosfato-salino (PBS), acrescido de albumina sérica bovina (BSA) usado como diluente para as diluições das vacinas, foi avaliado em diferentes concentrações (0,1%, 0,2% e 0,3%). Os resultados obtidos nos quadros 4, 5 e 6, para essas diferentes concentrações de BSA apresentaram quedas para ambas concentrações 0,1% e 0,3%. A inclusão do BSA na solução é uma estratégia comum para eliminação de alguns tipos de interferência analítica, com isso, quando usado em concentrações diferentes do seu ponto ótimo, falsos resultados podem ter ocorridos. (COSTA, 2011), (KRICKA, 1999)

Os parâmetros usados como variação de temperaturas de 34°C e 40°C e o uso das diferentes concentrações de BSA, nos ensaios de avaliação de potências foram realizadas para conhecer os possíveis impactos da temperatura de incubação e concentração do diluente no mensurando.

### 5.3 Modelo Matemático

O Modelo matemático utilizado se baseia no planejamento fatorial completo de duas variáveis em dois níveis, onde foram variados a temperatura e concentração de diluente conforme os resultados apresentados nos quadros 4, 5 e 6 (amostra 4196/13). Com isso, foi gerada uma superfície de resposta baseada no seguinte modelo:

#### 5.3.1 Amostra 4196/13

$$y (4196) = 18,25 + 0,5x_1 + 2,75x_2 + 0,5x_1x_2 \quad (12)$$

Y - trata de potência obtida, em  $\mu\text{g/mL}$ ;

C - Concentração de diluente que variou em relação aos valores de 0,1 % g/mL (ponto de mínimo), 0,2 % g/mL (ponto médio ou usual representado devidamente no modelo) e 0,3 % g/mL (ponto de máximo);

T - temperatura de incubação da vacina (temperatura indicada pelo termômetro da estufa). Neste caso, foram estudadas três temperaturas 34 °C (ponto de mínimo), 37 °C (ponto médio ou usual representado devidamente no modelo) e 40 °C (ponto de máximo).

O valor médio de todas as potências avaliados durante os dezessete ensaios da amostra 4461 foi de 18,25;

A contribuição relacionada ao efeito relacionado à concentração de diluente foi de 0,5;

A contribuição relacionada ao efeito relacionado à temperatura de incubação foi de 2,75;

A contribuição relacionada ao efeito combinado da temperatura e concentração de diluente foi de 0,5.

A influência dos valores de temperatura é mais significativa para esse ensaio do que a variação na concentração de diluente. Entretanto, um baixo fator de correlação entre as grandezas de influência demonstra pouca influência de uma grandeza sob a outra.

No modelo matemático obtido, as principais informações são os efeitos que cada grandeza de entrada provoca na grandeza de saída.

Para a faixa de condições operacionais avaliadas neste estudo, não há uma correlação pronunciada entre a variável temperatura e a variável concentração de diluente. Esse fator de 0,5 mostra que a combinação dos efeitos da variação da temperatura e da concentração de diluente interfere de forma bem irrisória sobre a potência da vacina.

#### **5.4 Exemplo de Cálculo da Incerteza de Medição do ensaio de potência da vacina adsorvida da hepatite B - INCQS/FIOCRUZ.**

O modelo de cálculo usado (ISO GUM) foi avaliado com os resultados obtidos no ensaio da amostra da vacina 4461/14, utilizando a amostra 4196/13, como vacina de referência.

##### **5.4.1 Incerteza do Tipo A**

Para a obtenção dos valores de incerteza do tipo A foi calculado o desvio padrão em cada diluição da curva (item 4.1.3.1 – Quadros 2 e 3), tanto para amostra quanto para o padrão. O desvio padrão é combinado para ser dividido pelo número de graus de liberdade, nesse caso o número de medições (24) menos 1 unidade (Anexo, 1 – Cálculo da potência estimada), o desvio foi de 0,50 abs.

Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para ambas, amostra e referência, os valores de  $p$  valor foram maiores que o nível de significância (0,05),

confirmando que não há dados estatísticos que venham a comprovar a não normalidade dos dados.

O resultado mostrado do coeficiente de sensibilidade foi de  $0,74 \mu\text{g/mL/abs}$  obtido a partir da fórmula da derivada parcial da absorbância em relação a potência, detalhado no item 5.4.4 - coeficientes de sensibilidade.

O valor da incerteza tipo A conforme demonstrado na tabela 7 (Anexo 2 – Cálculo da incerteza de medição), foi de  $0,08 \mu\text{g/mL}$ .

#### 5.4.2 Incerteza do Tipo B

##### a) Incertezas devido a temperatura de incubação medida pelo termômetro

Para a incerteza total da temperatura, duas fontes foram consideradas usando os dados da amostra referência 4196/13: a incerteza devido à variabilidade das leituras (tipo A) e a incerteza do termômetro utilizado para realização das leituras, obtidas através do certificado de calibração do instrumento (tipo B). Foram consideradas leituras iniciais (momento inicial do procedimento de incubação da placa de ensaio) e finais (ao término da última incubação), sendo 5 no ponto  $34^{\circ}\text{C}$ , 6 leituras para o ponto  $37^{\circ}\text{C}$  e 5 no ponto  $40^{\circ}\text{C}$ .

A incerteza obtida pelo desvio padrão das leituras, dividido pelo número de medições foi de  $0,09^{\circ}\text{C}$ , ao qual foi somado quadraticamente com o valor da incerteza do certificado que é  $0,1^{\circ}\text{C}$  dividido pelo  $k=2$  para obter um valor de incerteza final de  $0,1^{\circ}\text{C}$ , que pode ser visualizado no Anexo 2 - Tabela 7.

Neste experimento o coeficiente de sensibilidade- $C_i$  foi de  $0,6 \mu\text{g/mL}/^{\circ}\text{C}$ , obtido pelo coeficiente linear da temperatura x potência.

A distribuição considerada é a normal por essa contribuição representar valores combinados de dados normais e dados oriundos do certificado de calibração, onde uma distribuição t de Student foi atribuída.

##### b) Incerteza devido a concentração do diluente

Incerteza obtida pela dúvida na diluição do diluente da vacina.

Os certificados dos materiais utilizados para preparo da diluição que foram um balão volumétrico de  $200\text{mL}$ , calibrado pela RBC, com incerteza de  $0,4\text{mL}$ , foi utilizado para medir

o volume do PBS. A balança utilizada para pesar o BSA, também calibrada pela RBC, com incerteza de 0,02g. Para o preparo de uma concentração de 0,2% de PBS/BSA, foi diluído aproximadamente 0,04g de BSA em aproximadamente 200mL de PBS. Essas contribuições de incertezas vindas dos certificados de calibração dos instrumentos de medição utilizados foram combinadas quadraticamente e multiplicada pelo  $C_i$ , onde foi obtido o valor de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , o qual pode ser observado no (Anexo 2 - Tabela 7).

O coeficiente de sensibilidade dessa grandeza foi obtido pela derivada parcial do diluente em relação à potência obtida através da equação do modelo matemático determinado experimentalmente (item 5.2 – modelo matemático).

No item 5.4.4 (coeficiente de sensibilidade) é demonstrado a derivada da equação. A distribuição utilizada é a normal, pois os dados são retirados de certificados de calibração.

#### **c) Incerteza devido a leitura das absorvâncias dos ensaios**

A incerteza da leitura de absorvâncias foi calculada a partir do certificado de calibração do leitor de ELISA (espectrofotômetro) onde a contribuição é de 0,012 abs, com  $k=2$ . Este valor foi colocado diretamente na planilha de incertezas (Anexo 2 - Tabela 7). A distribuição utilizada é a normal por ser um valor derivado de um certificado onde uma distribuição t de student foi atribuída ao valor.

#### **d) Incerteza devido a concentrações das vacinas em análise e da referência**

Para diluição das vacinas foram utilizadas 2 micropipetas cujas incertezas são 3 $\mu\text{L}$  e 0,2 $\mu\text{L}$ , essas contribuições combinadas quadraticamente produziram um valor de 3,007 $\mu\text{L}$  ao qual foi diretamente inserido na planilha de incertezas (Anexo 2 - tabela 7). A distribuição foi a distribuição normal por serem valores obtidos por certificado de calibração da RBC. Essa contribuição seria para sabermos a dúvida que uma alteração na dose causaria na potência. Por isso o coeficiente de sensibilidade utilizado foi obtido da derivada parcial da diluição (dose) em relação a potência. A equação está descrita no item 5.4.4 (coeficiente de sensibilidade).

Não foi possível estabelecer uma relação direta de quanto as incertezas das micropipetas influenciariam na dose, porém, essa contribuição não foi investigada, já que a contribuição final seria zerada pela multiplicação do valor das incertezas das micropipetas combinadas pelo  $C_i$  da dose em relação à potência que foi aproximadamente 0 (zero), o que nos remete ao fato de que variações na dose não interfere na incerteza final do ensaio.

#### e) Incerteza devido à diluição da curva

Incerteza obtida pela aplicação do ajuste da reta pelo método dos mínimos quadrados através do somatório do quadrado dos resíduos. Foi considerado que a curva é homocedástica, ou seja, seus desvios padrão são considerados constantes e a variável de resposta  $y$  possui erros aleatoriamente distribuídos. (OLIVEIRA, AGUIAR, 2009). O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado demonstrando uma correlação negativa. A incerteza obtida foi de 0,17 abs, que foi diretamente inserida na planilha de incertezas (Anexo 2 - Tabela 7).

A distribuição é a normal, pois, os dados seguem uma distribuição gaussiana. O coeficiente de sensibilidade utilizado foi o mesmo obtido na derivada parcial da função de absorvância pela potência.

#### f) Incerteza devido ao kit de ELISA utilizado

A incerteza foi obtida pelo desvio-padrão de 10 (dez) leituras do controle positivo do kit dividido pela quantidade de absorvâncias lidas. Isso gerou uma incerteza de 0,09 abs (Anexo 2 – Tabela 7), ao qual foi atribuída uma distribuição normal por basear-se em uma série de dados distribuídos normalmente. O  $C_i$  utilizado foi o obtido na derivada parcial da absorvância pela potência.

### 5.4.3 Incerteza-Padrão Combinada

Incerteza obtida pela raiz da soma quadrática de todas as contribuições de incerteza descritas nos itens 5.3.1 e 5.3.2 (incerteza do tipo A e incertezas do tipo B) foi de  $U_c = 0,12 \mu\text{g/mL}$

### 5.4.4 Coeficientes de sensibilidade

Os coeficientes de sensibilidade foram calculados a partir de derivadas da fórmula  $f(y) = c_i + b \cdot \log_e(x) + \varepsilon$ , onde  $f$  é um tipo de transformação,  $c_i$  é o intercepto da preparação I,  $b$  é a inclinação comum e  $\varepsilon$  é um erro estatístico na sequência de uma distribuição normal com expectativa 0.

## a) Absorbância / Potência

A Derivada parcial da potência em relação à absorbância foi obtida da fórmula da potência estimada pelo método das linhas paralelas (item 4.1.3.1 – fórmula da potência), apresentando resultado 0,72 abs/ $\mu$ g/mL.

- Derivada parcial (fórmula):

$$\frac{dPot}{dy} = y \cdot \left( \frac{P_T - P_S}{d} \right) \cdot C \cdot \log_e(dose) \quad (13)$$

## b) Dose / Potência

A Derivada parcial da potência em relação a dose foi obtida da fórmula da potência estimada pelo método das linhas paralelas (item 4.1.3.1 – formula da potência), apresentando resultado aproximadamente zero.

- Derivada parcial (fórmula):

$$\frac{dPot}{d(dose)} = \frac{(P_T - P_S) \cdot C}{dose \cdot d \cdot (\ln y - c_i - \varepsilon)} \quad (14)$$

## c) Temperatura / Potência

O Coeficiente de sensibilidade foi obtido através do coeficiente angular da relação entre as temperaturas medidas nos ensaios e os resultados das potências (Anexo 3), o coeficiente de sensibilidade apresentou resultado de 0,58  $^{\circ}$ C/ $\mu$ g/mL.

## d) Diluente/ potência

O Coeficiente de sensibilidade foi obtido através da derivada parcial do diluente em relação à potência obtido pelo modelo matemático experimental (item 5.2) apresentando resultado 500 µg/mL/g/mL.

$$\frac{dy}{dc} = 5 + 5 \cdot \left(\frac{T-37}{3}\right) \quad (15)$$

#### 5.4.5 Número efetivo de graus de liberdade

Os números efetivos de graus de liberdade foi calculado através dos valores da incerteza combinada e as incertezas do Tipo A e Tipo B pelos seus respectivos graus de liberdade, conforme quadro 7. O resultado obtido foi de 64.

**Quadro 7 - Graus de Liberdade**

Fonte	Grau de Liberdade
<b>Repetibilidade</b>	23
<b>Temperatura</b>	25
<b>Incerteza da curva</b>	11
<b>Kit de Elisa</b>	9

Fonte: elaborado pelo autor

$$v_{eff} = \frac{(0,12)^4}{\left(\frac{0,08^4}{23}\right) + \left(\frac{0,06^4}{25}\right) + \left(\frac{0,06^4}{11}\right) + \left(\frac{0,05^4}{9}\right)} = 64 \quad (16)$$

#### 5.4.6 Fator de abrangência - k

Para os 64 graus de liberdade efetivos o k obtido na tabela de t de *Student* é igual a 2,04, com probabilidade de 95,45% de confiança.

#### 5.4.7 Incerteza Expandida

Os valores que compõem todas as incertezas estimadas estão descritos no Anexo 2 Tabela 7.

A incerteza expandida de medição relatada foi de  $\pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ , declarada como a incerteza-padrão da medição multiplicada pelo fator abrangência  $k= 2,04$ , que, para uma distribuição normal, corresponde a uma probabilidade de abrangência de 95,45%.

Não foi possível fazer uma discussão comparativa do resultados encontrados nas diversas etapas de desenvolvimento dos cálculos, porque não se encontrou à disposição na literatura pesquisada outros trabalhos relacionados à incerteza de medição da potência da vacina adsorvida da hepatite B. Um estudo feito por PALMEGIANE, A. L. em 2005, avaliou a incerteza da medição da determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B – Hib e mostrou ter uma incerteza de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , para potência do produto analisado. Esses resultados não puderam servir de comparativo porque as entradas das fontes pesquisadas, embora sendo potência de vacina, a metodologia de análise adotada é diferente da metodologia usada neste estudo.

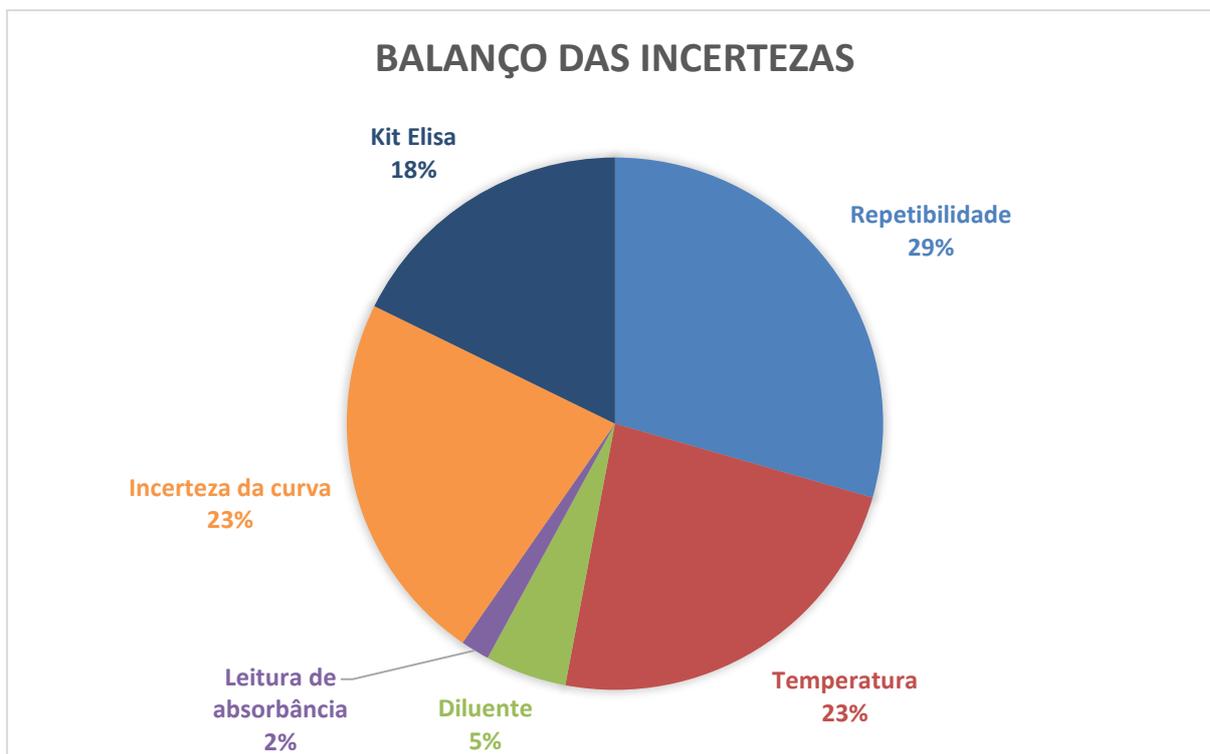
#### 5.5 Balanço de incertezas

O Balanço de incertezas é a forma mais objetiva de avaliar o impacto da incerteza de cada fonte de entrada na incerteza combinada do mensurando.

O modo de avaliação gráfica dos dados é importante porque se os limites de tolerância do processo necessitarem de uma otimização da classe de exatidão de qualquer fonte, o gráfico indicará rapidamente e de forma orientada quais são as fontes prioritárias para a melhoria de sua exatidão de forma a atender aos limites otimizados. (INMETRO, 2008)

O balanço das incertezas, conforme a figura 6, fornece uma estimativa da incerteza demonstrando uma predominância da incerteza relativa à repetibilidade dos valores, ou seja, a incerteza do tipo A.

Figura 7 - Gráfico de Balanço das Incertezas



Fonte: elaborado pelo autor

A leitura de absorbância proporcionou uma incerteza baixa comparativamente, devido ao desempenho do leitor de absorbâncias utilizado no laboratório. A concentração de diluyente e a dose não influenciara significativamente o resultado final. A incerteza baixa da concentração do diluyente se deveu a instrumentação adequada e por serem calibrados por laboratórios da RBC, que em conjunto com os equipamentos traduzira uma incerteza baixa. A baixa incerteza da dose se deve ao fato de seu coeficiente de sensibilidade ser próximo de zero, ou seja, não influencia no resultado da medição. A dose, representada no eixo das abscissas da curva dose-absorbância (Figura 6 - O modelo linhas paralelas), não deve variar para que esse método de regressão linear, baseado nos métodos dos mínimos quadrados ordinários, seja utilizado corretamente (OLIVEIRA, AGUIAR, 2009).

### 5.6 Padronização do cálculo da incerteza de medição para o ensaio da vacina adsorvida de hepatite B.

A metodologia padronizada para o ensaio de potência da hepatite B, foi através das fontes estudadas descritas (Quadro 8):

Quadro 8 - Fontes de incerteza padronizadas

Símb	Fonte da Incerteza	Valor	Distribuição	Divisor	$C_i$	$U_i$	$v_i$ ou $v_{eff}$	
$U_A$	Repetibilidade	*	Normal	$\sqrt{n}$	0,74	*	*	
$U_{B1}$	Temperatura	*	Normal	1	1,00	*	*	
$U_{B2}$	Leitura de absorbância	*	Normal	k	0,74	*	*	
$U_{B3}$	Curva de diluição	*	Normal	k	0,74	*	*	
$U_{B4}$	Kit Elisa	*	Normal	k	0,74	*	*	
$u_C$	Incerteza padrão combinada						*	*
$U$	Incerteza Expandida	$K=$				*	*	

\* Valores obtidos no ensaio

Fonte: elaborador pelo autor

As contribuições vindas das concentrações do diluente e a da diluição das vacinas foram retiradas do cálculo, pois não interferiram no valor final da incerteza. A incerteza referente às leituras obtidas pelo leitor de ELISA, também foi avaliada como uma contribuição insignificante, não havendo sua retirada, pois, esse valor de incerteza oriundo do certificado de calibração pode ser aumentado com o tempo, já que instrumentos de medição “com princípio de eletricidade” podem sofrer “deriva” em seus valores ao longo do tempo; além disso, podem ser calibrados por laboratórios que forneçam uma incerteza maior do que a demonstrada neste exemplo. Fato esse que não ocorrerá com a incerteza da diluição, pois, sua contribuição foi nula (zero) quando multiplicada pelo  $C_i$ , ou seja, qualquer que seja sua incerteza, a mesma será sempre zerada pelo  $C_i$ . A concentração do diluente também não interfere significativamente na potência, portanto, foi retirada.

Diante do conhecimento das informações descritas acima, as incertezas selecionadas, abaixo serão utilizadas no cálculo da incerteza de medição do ensaio de potência da vacina adsorvida da hepatite B, no INCQS. O valor de cada fonte será conforme descrito abaixo:

- Repetibilidade, depende do desvio-padrão das leituras efetuadas em triplicata.
- Temperatura, é o valor máximo de variação que possivelmente ocorrerá durante o ensaio. Dessa forma, já está contemplada a incerteza da leitura e do certificado de calibração. Essa fonte apenas será alterada quando alterar a incerteza do termômetro utilizado para as leituras de temperatura do ensaio.

- Leitura de absorvâncias, é o valor referente à incerteza do leitor de absorvâncias; esta contribuição deverá ser alterada quando a incerteza do leitor for modificada devido à sua calibração.
- Curva de diluição, contribuição relacionada ao uso de uma curva de valores para determinar a potência estimada. Essa contribuição é calculada pelos valores de absorvâncias lidos durante o ensaio.
- Incerteza do kit: essa contribuição não será alterada até que o fabricante determine o valor.

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível aplicar a metodologia padrão e universalmente aceita, descrita no ISO GUM, para avaliação da incerteza de medição no ensaio de potência da vacina adsorvida da hepatite B.

A metodologia do GUM, com toda sua complexibilidade e derivadas parciais, pode ser implementada desde que sejam conhecidas as particularidades biológicas do ensaio.

O modelo matemático determinado descreve estatisticamente o comportamento do ensaio e a metodologia de avaliação da incerteza de medição através da simulação de Monte Carlo pode ser aplicada.

A incerteza de medição foi de  $\pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ , o que representa  $\pm 1\%$  do valor estimado de potência da vacina ( $22 \mu\text{g/mL}$ ). As principais contribuições foram a repetibilidade das leituras e a temperatura de incubação do ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, *in vitro*.

Os resultados encontrados corroboram para a melhoria contínua do sistema da qualidade do laboratório.

A padronização do cálculo da incerteza de medição poderá servir como importante base e incentivo para futuras avaliações de incerteza de medição da potência de outras vacinas, que fazem parte do Programa Nacional de Imunizações-PNI.

## 7 PERSPECTIVAS

- Aplicar a metodologia padronizada desenvolvida no estudo para os ensaios de outras vacinas analisadas no INCQS.
- Buscar menor valor de incerteza de medição como melhoria contínua de processo.
- Disponibilizar, através de publicação, a metodologia de planejamento de experimento para estimativa de um modelo matemático que contempla a avaliação das influências das grandezas de entrada sobre a grandeza de saída.
- Avaliar incerteza através da simulação de Monte Carlo como método alternativo de avaliação a título de validação dos resultados.

## REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025:2005 - **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2. ed. Rio de Janeiro, 2005.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of the Committee on Infectious Diseases. **Red Book**, 25ed., 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Hepatite B**. 2016. Disponível em <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>. Acesso em: 12 maio 2016

\_\_\_\_\_. Portal da Saúde. **Calendário Nacional de Vacinação**. 27 de junho de 2014 . Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>. Acesso em: 12 maio 2016.

\_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Vigilância epidemiológica dos eventos adversos pós-vacinação**. Brasília.1998

CARVALHO, R. F. **Avaliação da Potência do componente da hepatite B nas vacinas combinadas pentavalente (DTP/HB/Hib) de diferentes produtores**. 2014 Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2014

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Travelers' Health Chapter 3 Infectious Diseases Related To Travel. **Hepatitis B**. 2015a. Disponível em <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b>. Acesso em: 12 maio 2016.

\_\_\_\_\_. Vaccines and Immunizations. Vaccines & Preventable Diseases. **Hepatitis B In-Short**. 2015b. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/hepb/in-short-adult.htm#who>. Acesso em: 12 maio 2016

\_\_\_\_\_. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. **13th Edition Chapter 10: Hepatitis B**. 2015c. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html>. Acesso em: 12 maio 2016

COSTA, C. I., *et al.* Establishment and validation of an ELISA for the quantitation of HBsAg in recombinant hepatitis B vaccines. **Journal of Virological Methods**, v. 172, p. 32-37, 2011.

CROWTHER J. R. **ELISA Theory and Practice**. v. 42, p, Totowa, NJ, 1995

DIAS, J. D. Medida, normalização e qualidade; **Aspectos da história da metrologia no Brasil**. Rio de Janeiro: Inmetro,1998.

DIASORIN. The Diagnostic Specialist. **Murex HBsAg Version 3**. Primeira Edição. 2009

DONATELLI, G. D. & KONRATH, A. C. Simulação de Monte Carlo na Avaliação de Incertezas de Medição. **Revista de Ciência & Tecnologia**. v.13,p. 5-15, 2005.

EA - EUROPEAN ACREDITADION ASSOCIATION. EA-4/02 - **Evaluation of the Uncertainty of Measurement in Calibration**. 2013. Disponível em: <http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-02-m-rev01-september-2013>. Acesso: 16 maio 2016

EDQM - EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE - Council of Europe. **The CombiStats User Manual**, v.5.0, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 1 v., 5ª edição, Primeiro Suplemento, Brasília: Fiocruz. 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 1 v., 5ª edição, Brasília: Fiocruz. 2010.

FARMACOPEIA EUROPÉIA 8.0 capítulo 5.3, 2008

INCQS. POP 65.3430.033 - **Avaliação da potência da vacina adsorvida hepatite B (recombinante)**. Revisão 06, 03 de junho de 2015.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Tecnologia e Qualidade. Conheça o Inmetro. **Histórico do Inmetro**. 19 de fevereiro de 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inmetro/historico.asp>. Acesso em: 04 abr. 2016

\_\_\_\_\_. **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados**. Duque de Caxias, RJ: INMETRO. 2012a

\_\_\_\_\_. Avaliação de dados de medição: **Guia para a expressão de incerteza de medição** - GUM 2008. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN. 2012b. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/gum\\_final.pdf](http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/gum_final.pdf). Acesso em: 04 abr. 2016

\_\_\_\_\_. **Avaliação da Conformidade**. 6ª Edição. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/acpq.pdf>. Acesso em: 04 abril 2016

\_\_\_\_\_. Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. **DOQ-CGCRE-08**. rev.03 fev. 2010. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf). Acesso em: 06 abr. 2016

\_\_\_\_\_. **A estimativa da incerteza de medição pelos métodos do ISO GUM 95 e de simulação de monte carlo** – Nota Técnica. Duque de Caxias: INMETRO, 2008

\_\_\_\_\_. **Expressão da Incerteza de Medição na Calibração** - Primeira edição brasileira em língua portuguesa do EA-4/02. Rio de Janeiro: INMETRO, ABNT, SBM, 1999

ISO. Geometrical product specifications (GPS) — Inspection by measurement of workpieces and measuring equipment — Part 2: **Guidance for the estimation of uncertainty in GPS measurement, in calibration of measuring equipment and in product verification**. Geneva, 2011.

ISO 14253-1: 2013 - Especificações geométricas produtos (GPS) - Inspeção por medição de peças e equipamentos de medição - Parte 1: **As regras de decisão para provar a conformidade ou não conformidade com as especificações**. Genebra, 2013.

KRICKA, L. J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. **Clinical Chemistry**, v, 45, p.942, 1999.

LIMA, L. G. **As incertezas das medições: pontos críticos e simplificações para metrologia dimensional na indústria**. Santa Barbara D'Oeste: Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Engenharia Mecânica e de Produção, 1999.

MARTÍNEZ, J.C. et al. Validation de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de Salmonella typhi. **Vaccine Monitor**, Havana, v.8 n.8, p. 7-10, 1999.

MELANDRI, V. **Padronização e validação do método de inibição de ligação da toxina (ToBI) para determinação da potência de vacinas e soros antidifitéricos e antitetânicos**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). (I. N. Saúde, Ed.). Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 2010

MENDES A., ROSÁRIO, P. Metrologia & Incerteza de Medição. EPSE São Paulo, 2005

NICÉSIO, R. G. **Biomedicina Brasil**. 18 de novembro de 2013. Disponível em: <http://www.biomedicinabrasil.com/2013/11/interacoes-antigeno-anticorpo.html>. Acesso em: 12 maio 2016

OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH .Validation Guideline 3.6.4 - **Measurement uncertainty**. 2014 disponível em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/GUIDELINE\\_3.6.4\\_MEASUREMENT\\_UNCERT.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.4_MEASUREMENT_UNCERT.pdf). Acesso em: 09 maio 2016.

OLIVEIRA, E. C., AGUIAR, P. F. Validação da metodologia da avaliação de incertezas por polinômios de segundo grau. **Revista Quim. NOva**. v.32, N°6, p. 1571-1575, 2009.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Diseases Hepatitis B. **Surveillance and Control**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/index4.html#incidence>. Acesso em 12 de maio de 2016.

\_\_\_\_\_. Hepatitis B. **Fact Sheets 204**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Acesso em: 12 maio 2016

\_\_\_\_\_. **Recommandations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines**. Proposed replacement of: TRS, Annex 2 and TRS 889, Annex 4. 2010.

\_\_\_\_\_. Supplementary information on vaccine safety: Part 2: **Background rates of adverse events following immunization**. Geneva. 2000

\_\_\_\_\_. Global Programme for Vaccines and Immunization. **Thermostability of vaccines**. Geneva, 1998.

PALMIGIANI, A. L. **Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de um Modelo de Controle**. 2005 Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005

PHARMEUROPA. **Colaborae Study for the Establishment of Biological Reference Preparations for DNA Hepatitis B Vaccine**. Special Issue, Bio 97-2, 1997

REVERBERI, R. & REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfusion**, v.5(4), p. 227–240, 2007.

TEIXEIRA, L. A. & ALMEIDA, M. Os primórdios da vacina antivaríólica em São Paulo: uma história pouco conhecida . **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, vol. 10 (supl. 2), p. 475-498, 2003.

TEMPORÃO, J. G. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História, Ciências e Saúde**, v.10, 2003.

TIJSSEN, P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. In: BURDON, R.H., 1993.

VAN OSS C. J. Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope – paratope binding – **Molecular Immunology**, vol. 32, nº 3, pp 199-211, 1995

WONG, D. T., NATH, N. & SNINSKY, J. J. Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by the entire pre-S open reading frame. **Journal of Virology**, v. 55, p. 223-231, 1985.

**ANEXOS**

## Anexo 1 – Cálculo da Potência Estimada

Diluição		Diluição	Padrão			Amostra			Desvio Padrão	
1	80000	0,0000125	0,854	0,806	0,835	0,843	0,837	0,702	0,0565877	
1	40000	0,0000250	1,305	1,372	1,429	1,43	1,21	1,662	0,1525014	
1	20000	0,0000500	2,384	3,525	2,563	2,597	2,678	2,869	0,4025075	
1	13333	0,0000750	3,272	3,347	3,379	3,748	3,768	3,8	0,2436922	
Média 1,833345834									Desvio Padrão Total	0,4978524

Ln

Diluição	Padrão			Amostra			Média	
1:80 000	-0,16	-0,22	-0,18	-0,17	-0,18	-0,35	-0,21	
1:40 000	0,27	0,32	0,36	0,36	0,19	0,51	0,33	
1:20 000	0,87	1,26	0,94	0,95	0,99	1,05	1,01	
1:13 333	1,19	1,21	1,22	1,32	1,33	1,34	1,27	
							<b>Média das Médias</b>	<b>0,60</b>

## Anexo 1 – Cálculo da Potência Estimada (continuação)

Diluição	Pradrão S			Preparação T		
	1: 80 000	0,57	0,67	0,61	0,59	0,60
1: 40 000	0,11	0,08	0,06	0,06	0,17	0,01
1: 20 000	0,07	0,44	0,12	0,13	0,15	0,21
1: 13 333	0,34	0,37	0,38	0,52	0,53	0,54
SS total	8,23					

## Média das absorbâncias transformadas - ln

S <sub>1</sub>	-0,185			T <sub>1</sub>	-0,234				
S <sub>2</sub>	0,313			T <sub>2</sub>	0,352				
S <sub>3</sub>	1,023			T <sub>3</sub>	0,998				
S <sub>4</sub>	1,204			T <sub>4</sub>	1,328				
P <sub>s</sub>	2,356			P <sub>T</sub>	2,443				
L <sub>S</sub>	2,437497606			L <sub>T</sub>	2,665500299				
H <sub>P</sub>	0,750		n=	3	réplicas	h=	2	K	8,6357359
H <sub>L</sub>	0,600		d=	4	diluições				

## Anexo 1 – Cálculo da Potência Estimada (continuação)

Tabela 3.2.3 -III

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados			Média dos quadrados		
Preparações	1	SS prep	0,002891277	M prep	0,0028913		
Regressão Linear	1	SS reg	7,812176286	M reg	7,8121763		
Não-Paralelismo	1	SS par	0,0156	M par	0,0155956		
Não-Linearidade	4	SS lin	0,2286	M lin	0,057153		
Tratamento	7	SS treat	8,059275178				
Erro residual	16	SS res	0,17019	s	0,0106367		
Total	23	SS total	8,22946				

b	0,84188		Limite inferior	Média	Limite superior
<b>MT</b>	<b>0,0261</b>		ln	0,026076355	0,037013212
t	2,11991		Exponencial	1,026419318	1,037706731
C	1,000065089		Potência	20	22
V	0,918522195				
$\sqrt{(C-1)(CM_T'^2 + 2V)}$	0,010936856				
CM <sub>T</sub> '	0,026076355				

nexo 2 – Tabela de incertezas

Símb	Fonte da Incerteza	Valor	Unidade	Distribuição	Divisor	C <sub>i</sub>	Unidade	U <sub>i</sub>	Unidade	v <sub>i</sub> ou v <sub>eff</sub>
U <sub>A1</sub>	Repetibilidade	0,50	abs	normal	4,90	0,74	µg/mL/abs	0,08	µg/mL	23
U <sub>B1</sub>	Temperatura	0,10	°C	normal	1,00	0,58	µg/mL/°C	0,06	µg/mL	25
U <sub>B2</sub>	Diluyente	0,00	g/mL	normal	2,00	500	µg/mL/g/mL	0,00	µg/mL	∞
U <sub>B3</sub>	Leitura de absorvância	0,01	abs	normal	2,00	0,74	µg/mL/abs	0,00	µg/mL	∞
U <sub>B4</sub>	Dose	0,0030	mL	normal	2,00	0,00	µg/mL	0,00	µg	∞
U <sub>B5</sub>	Incerteza da curva	0,17	abs	normal	2,20	0,74	µg/mL/abs	0,06	µg/mL	11
U <sub>B6</sub>	Kit Elisa	0,14	abs	normal	2,26	0,74	µg/mL/abs	0,05	µg/mL	9
u <sub>C</sub>	Incerteza padrão combinada							0,12	µg/mL	64
<b>U</b>	<b>Incerteza Expandida</b>	<b>k</b>	<b>2,04</b>					<b>0,25</b>	<b>µg/mL</b>	

Tabela 7 - Cálculo da Incerteza de Medição

## Anexo 3 – Medições de temperatura

Amostra 4196				
Condições de Ensaio	Temperatura inicial	Temperatura final	Média	Potência
	°C	°C	°C	µg/mL
0	36,8	36,7	36,75	20
1.1	33,3	33,4	33,35	18
1.2	34,1	34,1	34,1	13
2.1	39,7	39,7	39,7	18
2.2	39,9	39,8	39,85	22
3.1	33,3	33,3	33,3	17
4.1	39,9	39,8	39,85	22
5.1	39,9	39,8	39,85	21
5.2	39,4	39,7	39,55	21
6.1	33,3	33,4	33,35	18
6.2	33,3	33,3	33,3	19
7.1	36,8	36,7	36,75	21
7.2	36,8	36,7	36,75	17
8.1	36,8	36,7	36,75	17
8.2	36,8	36,7	36,75	21
		desvpad	2,66	
		incerteza (°C)	0,69	
		coeficiente angular	0,58	
		Coeficiente linear	-2,08	

## Desvios Padrão

34°C 0,33

37°C 0,05

40°C 0,15

Desvio Total 0,37

incerteza (°C)	0,09	tipo A
certificado (°C)	0,05	tipo B
incerteza combinada	0,10	