

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

Jorge Luiz dos Santos Possas

**APLICAÇÃO DO CONCEITO DO ERRO TOTAL, DOS PERFIS DE EXATIDÃO E
DOS ÍNDICES DE EXATIDÃO NA VALIDAÇÃO EM USO DE UM IMUNOENSAIO
PARA DETECÇÃO DE OVOALBUMINA EM VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

Rio de Janeiro

2014

Jorge Luiz dos Santos Possas

**APLICAÇÃO DO CONCEITO DO ERRO TOTAL, DOS PERFIS DE EXATIDÃO E
DOS ÍNDICES DE EXATIDÃO NA VALIDAÇÃO EM USO DE UM IMUNOENSAIO
PARA DETECÇÃO DE OVOALBUMINA EM VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

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

Orientadores: Dr. Antônio Eugênio C. Cardoso de Almeida
Dr. Wlamir Corrêa de Moura

Rio de Janeiro

2014

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

Possas, Jorge Luiz dos Santos

Aplicação do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na Validação em Uso de um Imunoensaio para detecção de ovoalbumina em vacina contra febre amarela/ Jorge Luiz dos Santos Possas, Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2014.

79p., il., tab.; graf.

Dissertação (Mestrado Profissional em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Dr. Antônio Eugênio C. Cardoso de Almeida e Wlamir Corrêa de Moura

1. Estudos de Validação. 2. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 3. Albumina. 4. Vacina contra Febre Amarela. I. Título

Application of the Concept of Total Error, of Accuracy Profiles, of Accuracy Index in the In Study Validation of a immunoassay for detection of ovalbumin in yellow fever vaccine.

Jorge Luiz dos Santos Possas

APLICAÇÃO DO CONCEITO DO ERRO TOTAL, DOS PERFIS DE EXATIDÃO E DOS ÍNDICES DE EXATIDÃO NA VALIDAÇÃO EM USO DE UM IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE OVOALBUMINA EM VACINAS CONTRA FEBRE AMARELA

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

Aprovado em ___ / ___ / ___

Dr. Humberto Pinheiro de Araújo
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a. Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a. Helena Keiko Toma
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Antônio Eugênio C. Cardoso de Almeida – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr. Wlamir Corrêa de Moura – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo;

À Direção do INCQS e à Chefia do Laboratório de Imunologia pela oportunidade e apoio para realizar este trabalho;

Ao Dr. Wlamir Corrêa de Moura pela orientação, pela força e amizade;

Ao Dr. Antônio Eugênio C. Cardoso de Almeida pela orientação;

Ao Dr. Humberto Pinheiro de Araújo pela revisão da monografia;

Ao Amigo Deivid dos Anjos pelo total apoio e fundamental colaboração;

Ao amigo Jarbas Emílio dos Santos pelo apoio;

Aos amigos do Laboratório de Vacinas Virais por todo apoio e carinho;

Aos amigos do Laboratório de Imuno-diagnóstico e Sangue, pela amizade e apoio;

Aos amigos do DI e do INCQS que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho;

À professora Maria da Conceição de Oliveira Viana (Ceça) da disciplina Metodologia de Pesquisa, pelo incentivo e apoio.

“Uma pintura é música que se pode ver
e música é uma pintura que se pode ouvir”
Miles Davis

Uma singela homenagem daquele
que canta sambas enredos para
as lavadoras de ELISA
trabalharem melhor!
Jorge Possas

RESUMO

A abordagem do conceito do Erro Total é ferramenta para efetuar validações que apresenta desempenho superior à abordagem clássica, que avalia os componentes de veracidade e precisão isoladamente, e é capaz de identificar deficiências na Exatidão de um modelo de cálculos de resultados de um imunoenensaio. O uso do conceito do Erro Total em validação de métodos analíticos é abordagem que incorpora a expressão da soma da veracidade e da precisão. Esse método utiliza ainda os Perfis de Exatidão baseados em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade e prevê o controle do risco de aceitar uma metodologia imprópria. Com a finalidade de avaliar o uso dessas ferramentas para: a) decidir qual o modelo de cálculo de curva de calibração de maior exatidão; b) documentar a validação de imunoenensaio, foram aplicados o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão no estudo de validação em uso de um ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para determinar o teor de ovoalbumina em vacinas, fortificando-se as vacinas com três concentrações de ovoalbumina em relação à concentração existente na vacina (5,0µg/0,5mL) na faixa 25 a 300%, testadas em relação à vacina pura. O Estudo de validação em uso demonstrou que, quando utilizado o método de cálculo de curva logística de 5 parâmetros, os resultados mostraram-se mais exatos em relação aos outros dois modelos testados. O ensaio apresenta exatidão, precisão, linearidade e veracidade em conformidade ao intervalo de concentrações estudado, e mostrou ser um ensaio confiável para avaliar o teor de ovalbumina.

Palavras-chave. vacina, validação, imunoenensaio, erro total, ELISA.

ABSTRACT

The Total Error approach is a validation tool that shows superior performance, when compared to the classical analysis, which assesses the trueness and precision components separately, and it is qualified to identify the deficiencies in the accuracy of an immunoassay. The use of the Total Error approach for validating of analytical methods incorporates the expression of the sum of trueness and precision. This analysis also uses the Accuracy Profiles based on tolerance intervals (or prediction intervals) to determine whether a calibration model will provide quality results and to predict the control of risk in accepting an inadequate methodology. In order to evaluate the use of the Total Error, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index approaches for validating immunoassays, these tools were used in the in use study of validation of an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for determining the ovalbumin contents in vaccines. It covered the range of 25-300% of a concentration existent on the vaccine (5.0 ug/mL) in relation to the pure vaccine. The in use study validation showed that, by using the five parameters logistic curve for calculating results, this assay demonstrates complying accuracy, precision, linearity and accuracy in the concentration range of 1.25-300 μ g/0,5mL; and it is a reliable methodology to assess the ovalbumin contents.

Keywords. vaccine, validation, immunoassay, total error, ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Vantagens da utilização do ELISA.....	18
Figura 2 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA direto.....	18
Figura 3 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA indireto.....	19
Figura 4 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA sanduíche.....	19
Figura 5 – Microplaca de titulação com 96 orifícios.....	21
Figura 6 – Esquema da realização do ELISA.....	22
Figura 7 – Representação esquemática de um perfil de exatidão.....	37

QUADROS

Quadro 1 – Esquema de diluições para obtenção das concentrações.....	40
Quadro 2 – Critérios de aceitação.....	47
Gráfico 1 Controle estatístico de processo dos valores de inclinação.....	49
Gráfico 2 Perfis de Exatidão obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina.....	53
Gráfico 3 - Curva de Calibração do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina Residual.....	57
Gráfico 4 - Perfil de Linearidade obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina com o modelo 5PL.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados brutos calculados para cada concentração.....	50
Tabela 2 Resultados calculados para cada concentração.....	51
Tabela 3 Resultados obtidos para construção dos Perfis de Exatidão.....	52
Tabela 4 Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão	54
Tabela 5 Resumo dos resultados da validação em uso do Ensaio de Determinação do Teor de Ovoalbumina.....	55
Tabela 6 Resultados para Veracidade obtidos.....	55
Tabela 7 Resultados para Precisão.....	56
Tabela 8 Resultados Para Limites de Tolerância.....	56
Tabela 9 Resultado das Curvas de Calibração dos cinco ensaios.....	57
Tabela 10 Média das absorbâncias obtidas pelas oito diluições.....	57
Tabela 11 Demonstração da resposta linear.....	58
Tabela 12 Intervalo de quantificação.....	60
Tabela 13 Resultados de Incertezas de Medição.....	60

SIGLAS E ABREVIATURAS

μ_T - Valor de referência

\bar{x}_i - Valor médio

S_I^2 - Variância intra ensaios

S_E^2 - Variância entre ensaios

S_T^2 - Variância Total

$\pm\lambda$ - Limites de aceitação

4PL - Curva logística de quatro parâmetros

5PL - Curva logística de cinco parâmetros

Ac - Anticorpo

Ag - Antígeno

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPFc - Boas Práticas de Fabricação correntes

cv% - Coeficiente de Variação percentual

EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare

EDTO - ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina

EIA - Enzyme Immunoassay

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

er% - Erro Relativo Percentual

FDA - Food and Drug Administration

ICH - International Conference on Harmonization

IGC - Índice global de conveniência

I_v - Índice de Veracidade

I_D - Índice de intervalo de doses

I_P - Índice de Precisão

I_E - Índice de Exatidão

ISO - International Organization for Standardization,

I_{tβ} - Intervalo de tolerância de expectativa-β

K - Fator de abrangência

LBA - Ligand Binding Assays

LIQ - Limite inferior de quantificação

LSQ - Limite superior de quantificação

N - Replicatas de determinações

P - Sessões de ensaios independentes

P/v - peso/volume

PBS - Phosphate Buffered Saline – Salina Tamponada com Fosfatos

R² - Coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado

RIA - Radioimunoensaio

SFSTP - Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SPF - Specific Pathogen Free - livre de micro-organismos patogênicos

USP - United States Pharmacopoeia

u_c - Incerteza Padrão Combinada

U - Incerteza Expandida

GI - graus de liberdade

OD - Densidade ótica

n - Número de concentrações

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Febre Amarela	14
1.2 A Vacina Contra Febre Amarela	15
1.3 Controle de Qualidade da vacina contra febre amarela	16
1.4 Ovoalbumina	16
1.5 O ELISA	17
1.5.1 Definição	17
1.5.2 Histórico	20
1.5.3 Princípios da Técnica	21
1.5.4 Curva de Calibração	23
1.6 Garantia da Qualidade	23
1.6.1 Validação de métodos analíticos	24
1.6.2 A variabilidade dos ensaios biológicos	25
1.6.3 Abordagem Clássica da ICH	26
1.6.4 Definições das principais características	27
1.6.4.1 <i>Linearidade x Curva de Calibração</i>	27
1.6.4.2 <i>Veracidade</i>	28
1.6.4.3 <i>Exatidão</i>	29
1.6.4.4 <i>Precisão</i>	31
1.6.4.5 <i>Intervalo de doses e Limites de Quantificação</i>	32
1.6.4.6 <i>O Conceito do Erro Total (Total Erro) e o Perfil de Exatidão</i>	33
1.6.4.7 <i>Perfis de Exatidão</i>	35
1.6.4.8 <i>Índices Globais de Conveniência</i>	36

1.6.4.9 Incerteza de Medição	37
1.7 Pré-estudo de validação	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Amostras analisadas	40
3.2 ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina (EDTO)	41
3.3 Seleção dos parâmetros de validação	41
3.4 Matriz de Ensaios	42
3.5 Estudo de validação em uso	43
3.5.1 Análise Estatística	43
3.5.2 Análise de variância	43
3.5.3 Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção	44
3.5.4 Veracidade	44
3.5.5 Precisão	44
3.5.6 Exatidão	44
3.5.7 Índices Globais de Conveniência	45
3.6 Critérios de aceitação	47
3.7 Cálculo da Incerteza de Medição	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Validação em uso do EDTO	49
4.2 Determinação do melhor modelo de ajuste de curva: 4PL, 5PL e PAR	49
4.2.1 Comparação dos modelos de ajuste utilizando os Perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão	51
4.2.2 Índices Globais de Conveniência	53

4.3 Reavaliação dos parâmetros de validação	54
4.3.1 Veracidade.....	56
4.3.2 Precisão	56
4.3.3 Exatidão (Erro Total)	56
4.3.4 Curva de Calibração	57
4.3.5 Linearidade.....	58
4.3.3 Intervalo de quantificação.....	59
4.3.7 Determinação da Incerteza de Medição	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1 – Reagentes e Soluções	72
ANEXO 2 – Artigo POSSAS et al. (2012)	76

INTRODUÇÃO

1.1 FEBRE AMARELA

Manuscrito maia, datado de 1648, descreve epidemia em Yucatan, com hematêmese (vômito negro), e sugere que os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus* – hospedeiros do *Flavivírus* causador da febre amarela – vieram da África para as Américas durante o transporte de escravos.

A febre amarela foi, durante quatrocentos anos, um desafio à Medicina, sendo ainda hoje uma importante causa de morbidade e de alta letalidade, em vastas zonas das regiões tropicais da África e da América do Sul. A partir do século XVII, essa doença dizimou milhares de vidas em extensas epidemias urbanas nesses dois continentes (BENCHIMOL, 2001).

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da febre amarela infecta e se replica em células dendríticas epidérmicas, fibroblastos e macrófagos nos linfonodos regionais. Produz uma pequena viremia e se espalha por todo o organismo atingindo o fígado, principal órgão-alvo da infecção além de baço, rins, medula óssea e músculo cardíaco esquelético. O espectro clínico da infecção por vírus da febre amarela varia de formas assintomáticas, formas leves ou moderadas com doença febril não específica e formas ictéricas graves, em aproximadamente 20% das infecções. O quadro típico ocorre, após a incubação de 3 a 6 dias, com início abrupto de febre, calafrio, cefaléia intensa, mialgia generalizada, anorexia, náuseas e hemorragia gengival. Este período dura cerca de três dias e é acompanhado de viremia. Pode seguir-se um período de remissão em que melhoram os sintomas (FIGUEIREDO, 2007).

Trata-se de uma zoonose encontrada nas regiões tropicais da África e América do Sul. Na África, onde tem maior disseminação, é endêmica em 34 países. Na América do Sul, nos últimos 20 anos, sua ocorrência tem sido registrada em 9 países: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Venezuela e Argentina.

A doença tem caráter sazonal, ocorrendo com maior frequência entre os meses de janeiro a abril, quando fatores ambientais propiciam o aumento da densidade vetorial. No Brasil, no período de 1990 a 2010 ocorreram 587 casos com 259 óbitos. O maior número de registros (n=104) foi em Minas Gerais seguido do Maranhão (n=90), Goiás (n=88), Pará (n=84), e Amazonas (n=43) (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

1.2 - A Vacina Contra Febre Amarela

Atualmente, a única vacina utilizada mundialmente contra a febre amarela é derivada da cepa 17D, originada da cepa Asibi, desenvolvida por Theiler e Smith (2002). A cepa viral foi obtida após 53 passagens em macacos, 18 em cultura de tecido de embrião de camundongo, 58 em cultura de embrião de galinha e outras 128 passagens adicionais em cultura de embrião de galinha desprovido de células medulares e cerebrais. Assim, considerando que as sucessivas passagens do vírus vacinal em culturas de células podem acarretar alterações biológicas importantes nas subcepas, comprometer a soroconversão e desencadear efeitos adversos graves, foi estabelecido o sistema de lotes sementes, a partir de 1945. Dessa forma, subcepas padronizadas passam a diminuir os riscos de mutações, e a partir dessas cepas são produzidas todas as vacinas, com características semelhantes quanto a soroconversão, imunidade, duração da proteção e segurança.

Para a produção da vacina contra a febre amarela, são empregadas as subcepas 17D-204 e 17DD, derivadas da cepa 17D, distinguíveis por meio de anticorpos monoclonais e com sequências homólogas em 99,9%. A cepa 17D-204, a partir das passagens 233 e 239, é utilizada por produtores nos Estados Unidos (Sanofi Pasteur), França (Sanofi Pasteur), Reino Unido (Medical Evans), Colômbia (Instituto Nacional de Saúde/Bogotá) e Índia (Instituto Central de Pesquisas/Kisauli). A cepa 17DD é utilizada no Brasil (Biomanguinhos/FIOCRUZ) e em Senegal (Instituto Pasteur/Dakar), produzidas a partir da passagem 287, sendo Biomanguinhos/FIOCRUZ um dos laboratórios de maior produção mundial.

A vacina contra febre amarela é constituída de vírus “vivo” atenuado e apresentada sob a forma liofilizada. Após a reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea, podendo apresentar coloração opalescente amarelada devido à presença de indicador de pH (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.3 – Controle de Qualidade da vacina contra febre amarela

O Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.

O controle da qualidade das vacinas contra febre amarela utilizadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI), é exercido primariamente através de inspeções à realização de ensaios como meio inicial de detectar problemas, sendo apenas parte do sistema de Garantia da Qualidade. Este princípio tem como resultado o uso de preparações de referência, orientações sobre ensaios e critérios de liberação de produtos (METZ *et al.*, 2002).

A Farmacopeia Brasileira exige que imunobiológicos sejam avaliados por testes analíticos de segurança (esterilidade, toxicidade e pirogênio) e eficácia (identidade, estabilidade e potência). Além dessas avaliações, a vacina contra febre amarela é submetida ao teste do teor de ovoalbumina, sendo considerada satisfatória se o conteúdo residual da proteína for menor ou igual a 5 µg/dose (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.4 – Ovoalbumina

A ovoalbumina está presente na clara do ovo e corresponde a 54% da proteína da clara (LI-CHAN *et al.* 1995).

Várias proteínas da clara do ovo e seus peptídeos demonstraram atividade imunomoduladora. A ovoalbumina demonstrou induzir a liberação de fator de necrose tumoral (TNF) de modo dose-dependente *in vitro*, quando modificada com dicarbonil metoxiglixil (FAN *et al.*, 2003), e peptídeos imunogênicos de ovoalbumina têm sido usados para aumentar a resposta imunológica em imunoterapia do câncer (VIDOVIC *et al.* 2002, HE *et al.* 2003). Tezuka e Yoshikawa (1995) demonstraram que a atividade fagocitária de macrófagos foi aumentada pela adição de peptídeos de ovoalbumina, OA 77 84 e OA 126 134, derivados da digestão péptica e químio-trípica, respectivamente.

A ovoalbumina é um dos principais alérgenos da clara do ovo de galinha, e é frequentemente a causa de reações de hipersensibilidade a alimentos. Ela serve como um alérgeno modelo, adequado para estudar a relação entre estrutura e função, porque a sequência de aminoácidos e pós-modificações translacionais da proteína são conhecidas. As alergias ao ovo ocorrem em cerca de meio por cento (0,5%) da população e em cerca de cinco por cento (5%) das crianças com alergias. Uma vez que as vacinas contra a gripe e a febre amarela são ambas produzidas em ovos, proteínas do ovo, principalmente ovoalbumina, estão presentes no produto final. Quantidades pequenas de proteínas do ovo encontradas na vacina contra influenza (ou seja, cerca de 0,02 a 1,0 µg por dose) são suficientes para induzir reações graves de hipersensibilidade, mas raramente fatais em crianças com alergia ao ovo (ALPHA, 2012).

1.5 - O ELISA

1.5.1 Definição

ELISA (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e EIA (Ensaio Imunoenzimático) são métodos poderosos e úteis para estimar concentrações de analito na ordem de ng/mL a pg/mL em soluções, como soro, urina, esperma e sobrenadante de cultura de células (SAVIGE, 1998).

Embora existissem pequenas diferenças no desenho dos dois tipos de ensaios imunoenzimáticos (EIA e ELISA) por ocasião de suas publicações, doravante nos referiremos aos ensaios imunoenzimáticos utilizando a sigla ELISA, exceto ressalvas. A Figura 1 esquematiza as principais características dos ELISA's.

O princípio básico do ELISA é usar uma enzima para detectar a ligação de antígenos (Ag) a anticorpos (Ac). A enzima converte um substrato incolor (cromógeno) em um produto colorido, indicando a presença de ligações Ag-Ac. Um ELISA pode ser usado para detectar tanto a presença de Ag's ou Ac's em uma amostra, dependendo de como o teste é desenhado.

Existem três principais métodos que formam a base de todos os ELISA's.

- 1) Direto;
- 2) Indireto;
- 3) Sanduíche.

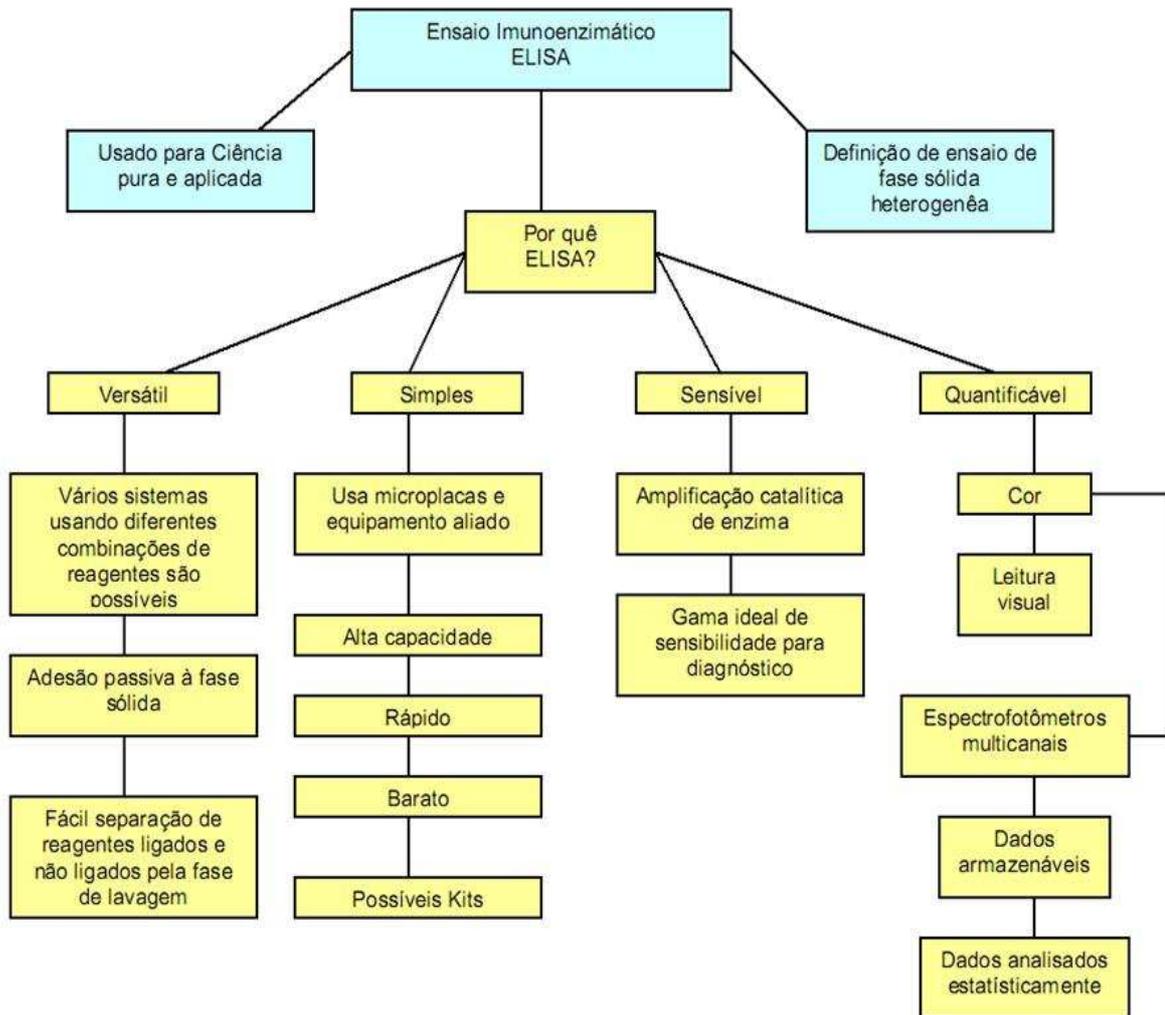


Figura 1 – Vantagens da utilização do ELISA
 Fonte: Adaptada de Crowther (1995).

O ELISA Direto (Figura 2) envolve a ligação do antígeno à fase sólida, seguida da utilização de um anticorpo marcado com enzima. Este tipo de ensaio em geral torna a medição de amostras brutas difícil, uma vez que as proteínas contaminantes competem por locais de ligação com o plástico.

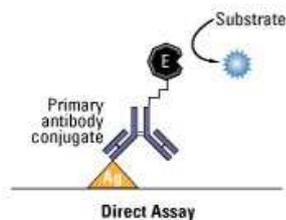


Figura 2 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA direto
 Fonte: <http://www.rajaha.com/elisa-test-what-principle-types/>

ELISAs indiretos (Figura 3) também envolvem a ligação do antígeno a uma fase sólida, mas, neste caso, o anticorpo primário não está marcado. Um anticorpo secundário conjugado com enzima, dirigido para o primeiro anticorpo, é então adicionado. Este formato é usado com mais frequência para a detecção de anticorpos específicos em soro.

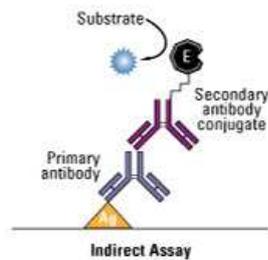


Figura 3 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA indireto
Fonte: <http://www.rajaha.com/elisa-test-what-principle-types/>

O terceiro tipo de ensaio é o ELISA sanduíche (Figura 4), que também às vezes é classificado como um tipo de ELISA indireto, difere daquele uma vez que, o antígeno fica entre dois anticorpos como em um sanduíche e não ligado à fase sólida. Em resumo, envolve a ligação de um anticorpo de captura a um suporte de fase sólida, as amostras contendo o antígeno conhecido ou desconhecido, são adicionadas em uma matriz ou tampão que vai minimizar a ligação à fase sólida. Um anticorpo marcado com enzima é então adicionado para detecção.

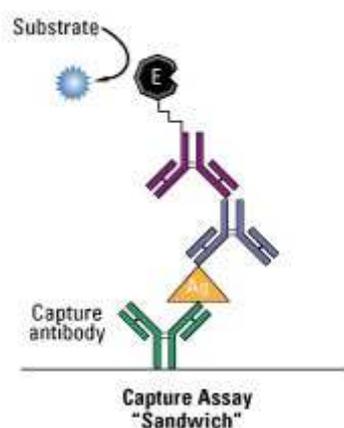


Figura 4 – Esquema dos elementos envolvidos em um ELISA sanduíche.
Fonte: <http://www.rajaha.com/elisa-test-what-principle-types/>

Todos os três sistemas podem ser usados em um ensaio chamado ELISA de competição ou ELISA de inibição que envolve a adição simultânea de anticorpos ou

proteínas “concorrentes”. A diminuição do sinal das amostras após a adição do segundo anticorpo ou proteína dá um resultado altamente específico (SAVIGE, 1998).

1.5.2 - Histórico

Ensaio que utilizam anticorpos ou outros reagentes que se liguem são conhecidos em inglês como “Ligand Binding Assays” (LBA) ou seja ensaios de ligação (FINDLAY e DILLARD, 2007).

Antes do desenvolvimento do teste ELISA, a única opção para a realização de um teste imunoenzimático era o radioimunoensaio (RIA), uma técnica que utiliza antígenos radioativos ou anticorpos marcados. No RIA, a radioatividade fornece o sinal, que indica se um antígeno específico ou anticorpo está presente na amostra. O RIA foi descrito pela primeira vez em um artigo publicado por Rosalyn Sussman Yalow e Berson Salomão, em 1960 (YALOW e BERSON, 1960).

Uma vez que a radioatividade representa uma ameaça potencial à saúde, buscou-se uma alternativa ao RIA, mais segura, de forma a substituir o sinal radioativo.

Os primeiros sistemas de EIA's e ELISA publicados diferiam no desenho dos ensaios, mas ambas técnicas eram baseadas no princípio de imunoensaio, utilizando enzimas ao invés de radioatividade como revelador do sinal. Dois grupos de pesquisa independentes e simultaneamente desenvolveram a ideia e executaram os experimentos necessários para demonstrar sua aplicabilidade.

A técnica de ELISA foi concebida e desenvolvida por Peter Perlmann e Eva Engvall na Universidade de Estocolmo, Suécia, e a técnica do EIA por Anton Schuurs, e Bauke van Weemen nos Laboratórios de Pesquisa da NV Organon em Oss, na Holanda (ENGVALL & PERLMAN, 1971; VAN WEEMEN & SCHUURS, 1971).

Quando enzimas, como a peroxidase, reagem com substratos apropriados, como o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolina-6-sulfônico) (ABTS) ou 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), ocorre uma mudança em sua cor, que é usada como um sinal. No entanto, o sinal deve estar associado à presença de anticorpos ou antígenos, por isso a enzima deve estar ligada a um anticorpo adequado. Este processo de vinculação foi desenvolvido independentemente por Avrameas e Pierce (LEQUIN, 2005). Uma vez que é possível remover qualquer anticorpo ou antígeno não ligado por lavagem, o anticorpo ou o antígeno deve ser fixado à superfície do recipiente, ou

seja, a fase sólida adsorvida tem que estar preparada. Uma técnica para fazê-lo foi publicada por Wide e Porath (1966).

Durante a década de 60 e início dos anos 70, muitos sistemas de teste RIA eram essencialmente métodos "caseiros" desenvolvidos por pesquisadores individuais, que não podiam manter o ritmo (principalmente financeiro) de fabricantes comerciais, que contavam com recursos e instalações, tais como a Boehringer-Mannheim (Alemanha), Abbott (Estados Unidos) e Organon Teknika (Holanda). A comercialização de kits de testes de ELISA estava começando. As técnicas de fase sólida (WIDE; PORATH, 1966; CATT; TREGGAR, 1967) foram usadas no desenvolvimento de microplacas de titulação com 96 poços (Figura 5), na qual um antígeno ou um anticorpo é covalentemente ligado a um suporte sólido. Os avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento de aparelhos automáticos de pipetagem, pipetas multicanais e os leitores de microtitulação em placas e lavadores automáticos, e, na década de 80, instrumentos de teste totalmente automatizados foram fabricados pela Boehringer-Mannheim, Abbott, dentre outros.



Figura 5 – Microplaca de titulação com 96 poços
Fonte: http://88proof.com/synthetic_biology/biog/archives/439

1.5.3 – Princípio da Técnica

O princípio da técnica é demonstrado esquematicamente na Figura 6. O teste baseia-se na interação antígeno-anticorpo. Normalmente é usada uma placa de superfície inerte com poços onde serão adsorvidos os antígenos ou anticorpos de interesse, juntamente com um tampão de carbonato (processo conhecido como sensibilização).

Depois é realizada uma lavagem (p. e., com PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline* – Salina Tamponada com Fosfatos). Posteriormente, é feito o bloqueio com

uma proteína (p. e., soro de cabra, leite desnatado, albumina sérica bovina - BSA) para que esta ocupe os espaços livres em cada poço da placa (sítios inespecíficos que podem gerar resultados falso-positivos ou negativos).

Durante a realização do ensaio, uma nova lavagem é feita. A superfície é então exposta à amostra (contendo antígenos ou anticorpos alvo) e a reação antígeno-anticorpo ocorrerá. A superfície é lavada novamente para retirar os anticorpos primários que não se ligaram a nenhuma proteína.

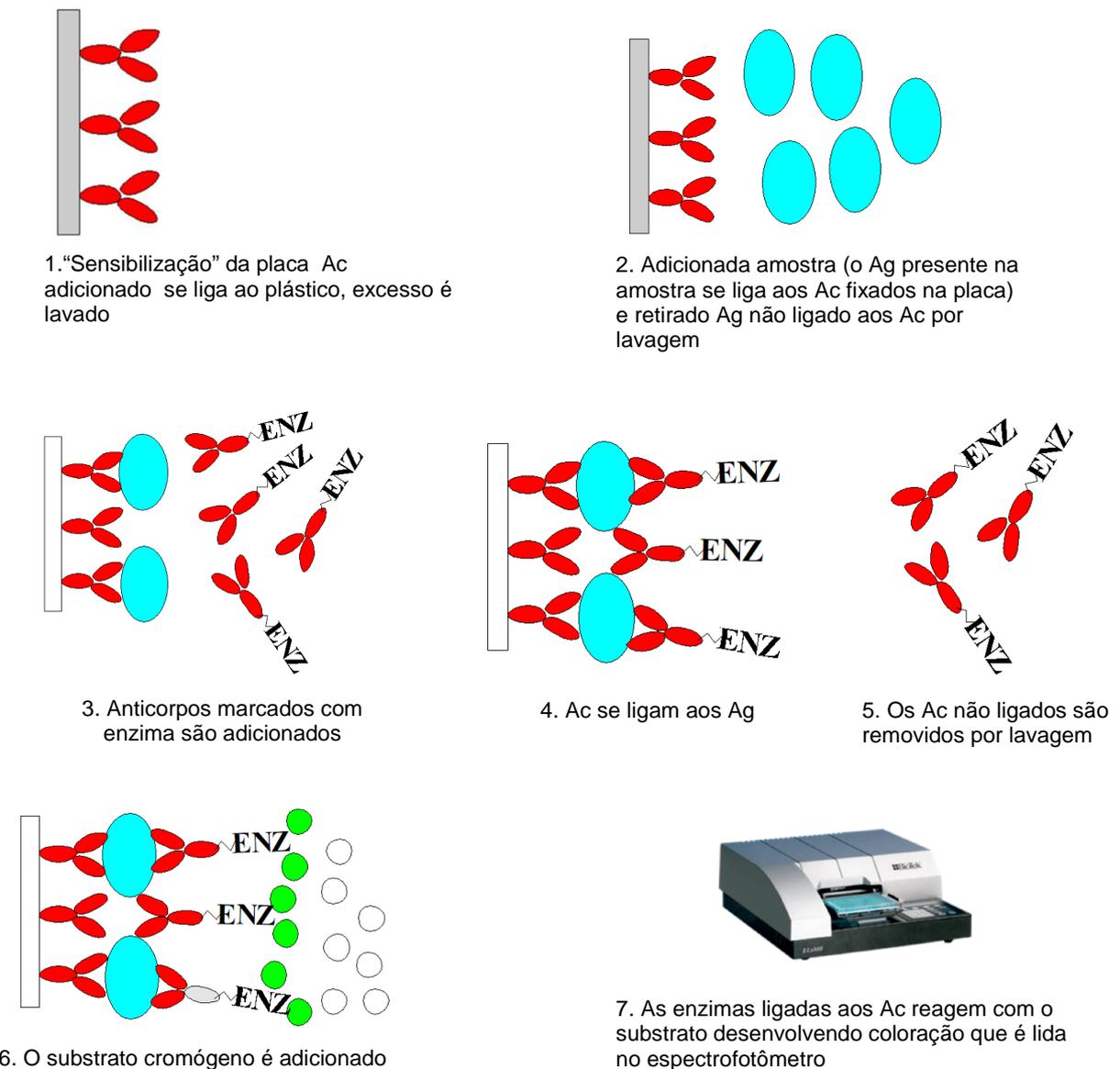


Figura 6 – Esquema da realização do ELISA
 Fonte: Adaptada de Crowther (1995).
 Ac – Anticorpo; Ag – Antígeno; ENZ – Enzima.

Em seguida, o produto é tratado com anticorpos secundários que se ligarão ao antígeno ou anticorpo primário e a superfície é lavada novamente para a retirada do

anticorpo secundário que não se ligou. Estes Ac's possuem uma enzima acoplada que irá produzir uma substância colorida em presença de um substrato. Medindo-se a intensidade da cor formada, após a interrupção da reação com ácido sulfúrico, pode-se quantificar e verificar a presença de alguma substância de interesse.

1.5.4 – Curva de Calibração

As curvas de calibração para ensaios de ligação de antígenos são geralmente caracterizadas por uma relação não linear entre a resposta média e a concentração de analito. Tipicamente, a resposta exibe uma relação sigmóide com a concentração. No presente trabalho, o modelo de curva logística de quatro parâmetros (4PL) é aceito como referência para a curva de calibração, melhorando a veracidade e a precisão sobre um máximo intervalo de calibração utilizável. A incorporação de ponderação no modelo requer esforço adicional mas geralmente resulta em uma curva de calibração de desempenho melhorado. Para curvas de calibração com assimetria, a introdução de um quinto parâmetro (5PL) pode melhorar a qualidade do ajustamento dos dados experimentais ao algoritmo (FINDLAY; DILLARD, 2007).

As propriedades destes algoritmos foram revistas por Rodbard e Frazier (1975), Haven *et al.* (1987) e Dudley *et al.* (1985). A base de todos estes modelos de redução de dados é uma equação que descreve a relação média de resposta-concentração, em conjunto com outra que descreve a relação entre a resposta média e a variância das medições replicadas (FINDLAY; DILLARD, 2007).

1.6 - Garantia da Qualidade

Um dos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação (BPF) correntes é que os fabricantes de produtos médicos, incluindo drogas e equipamentos, tenham um programa de garantia da qualidade. A garantia da qualidade é um sistema completo de abordagem para garantir a segurança e eficácia de produtos acabados. O controle da qualidade é normalmente considerado um item do sistema de garantia da qualidade. É o mais básico ou mais simples tipo de programa da qualidade (METZ *et al.*, 2002).

1.6.1 - Validação de métodos analíticos

Sistemas de garantia da qualidade como as BPF e a Norma ISO/IEC 17025 (BRASIL, 2005), adotada no INCQS, requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Embora métodos farmacopeicos não requeiram re-validação, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para garantir que os métodos são aplicáveis na sua utilização e pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado. Segundo a “*International Conference on Harmonization*” (ICH), é necessário demonstrar que o método é apropriado à finalidade de uso (ICH, 2005) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que a validação deve garantir, por meio de estudos, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). A norma ISO/IEC 17025 de 2005 descreve validação de métodos como a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

Validação é o processo pelo qual a confiabilidade, uma medida objetiva da reprodutibilidade intra e inter-laboratorial, e a sua relevância são avaliadas com o objetivo de dar suporte a um uso específico. Um método é considerado validado quando suas características de corrida, vantagens e limitações foram adequadamente determinadas para um propósito específico. Não há níveis de reprodutibilidade ótimos ou mínimos ou associados ao evento de interesse que devam ser alcançados para uma validação de sucesso. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependem das condições sob as quais o teste será usado e os propósitos para os quais seus resultados sejam aplicados (HUBERT *et al.*, 1999, HUBERT *et al.*, 2004).

O maior propósito da validação é validar os resultados que serão produzidos, não o próprio método (ROZET *et al.*, 2007a).

Durante um estudo de validação, medidas são obtidas em múltiplas sessões de ensaios independentes (p) com replicatas de determinações (n) em cada sessão. É assumido que os erros aleatórios para os p -ésimas sessões de ensaios e as n -ésimas replicatas apresentam distribuição normal e independente com média zero e variâncias s^2_I e s^2_E , respectivamente. Estas variâncias s^2_I e s^2_E , correspondem à variabilidade intra ensaios e entre ensaios do método, respectivamente. A variabilidade total do ensaio é dada por $s^2_T = s^2_I + s^2_E$. Isto normalmente é referido

como modelo de efeito aleatório de fator único. Usando a Análise de Variância/ANOVA (número constante de replicatas em todas as sessões), as variâncias intra e entre ensaios podem ser usadas para obter estimativa da variância intra-ensaios, da variância entre-ensaios e da variância total.

Na prática, o objetivo da validação é proporcionar ao laboratório assim como às autoridades, garantia de que cada resultado obtido na rotina estará suficientemente próximo ao valor “real” desconhecido da amostra (HUBERT *et al.*, 2004).

A conformidade de um dado método com os objetivos de uso é normalmente avaliada em duas fases. Primeiro uma fase de “pré-estudo” é conduzida para provar, com base em um desenho de experimento, que o método é capaz de apresentar resultados de qualidade. Então, no uso de rotina, o laboratório deve verificar se o método analítico de interesse se mantém válido ao longo do tempo e que cada corrida obtenha medidas confiáveis (BOULANGER *et al.*, 2007).

A validação não é um processo estático, mas dinâmico. Componentes específicos dos ensaios devem ser avaliados, subseqüentemente validados e continuamente monitorados. Logo, validação é um processo contínuo e deve ocorrer enquanto o ensaio estiver em uso, pois frequentemente componentes críticos (p.e., um lote de reagente) necessita ser trocado. Mudanças em componentes validados requerem uma validação parcial para demonstrar resultado comparáveis (DeSilva *et al.*, 2003).

A extensão do prazo de validade de reagentes críticos (exceto padrões de referência) pode ser justificada através do comportamento aceitável de amostras de controle da qualidade se elas forem frequentemente testadas nos ensaios e a extensão de um prazo de validade deve ser cuidadosamente documentada baseada nestes dados (DeSilva *et al.*, 2003).

1.6.2 - A variabilidade dos ensaios biológicos

Ensaio biológico (também chamados bioensaios) são métodos para estimar a potência de uma droga ou material através da utilização da reação causada pela sua aplicação em unidades experimentais vivas. São partes integrantes da avaliação da qualidade para produção e venda no mercado de vários produtos biológicos e alguns produtos não biológicos. Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados

em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas, ou complexos funcionais de receptores alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes químicos (USA, 2010).

1.6.3 - Abordagem Clássica da ICH

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da ICH (2005) que recomenda para ensaios de natureza quantitativa, que as características mais relevantes a serem avaliadas no estudo de validação são a linearidade, a exatidão e a precisão. Entretanto, na introdução deste guia parte II, é afirmado “devido à sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos em alguns casos podem ser abordados diferentemente deste documento”. Partindo desta premissa, uma comissão da “*Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*” (SFSTP, 2005) desenvolveu um guia prático específico para a validação de ensaios biológicos aplicando a abordagem clássica da ICH (2005). Segundo o ICH, estudos de validação de ensaios para detecção quantitativa de uma impureza, geralmente devem avaliar as seguintes características:

- Linearidade;
- Exatidão;
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade);
- Especificidade;
- Faixa;
- Limite de quantificação.

O objetivo de um bom método analítico é quantificar com certeza cada um dos valores desconhecidos em amostras analisadas. Ou seja, a diferença determinada entre os resultados obtidos e o valor “verdadeiro” deve ser suficientemente pequena. Dois componentes podem influenciar esta diferença: a exatidão (ou Tendência) do método e sua precisão. A Tendência demonstra quanto os resultados desviam “em média” ou sistematicamente de um valor verdadeiro e a precisão expressa como os resultados variam em torno do valor médio quando as medidas são repetidas. Um

“bom” método analítico deveria de uma forma ideal, dar resultados próximos de um valor verdadeiro da amostra, i.e. dentro de algum limite de aceitação. Esta “proximidade” está diretamente ligada ao tamanho da Tendência e da precisão do método (BOULANGER *et al.*, 2007).

Todos os analistas enfrentam as mesmas situações quando necessitam realizar validações de métodos analíticos que é o processo de provar que um método analítico é aceitável para a sua finalidade. Em geral os analistas consultam documentos de regulamentação ou de orientação, e, portanto, a validade dos métodos analíticos é dependente da orientação, terminologia e metodologia, proposta nesses documentos (ROZET *et al.*, 2007a).

Portanto, é de primordial importância ter definições claras dos diferentes critérios de validação. Também é necessário ter metodologias de acordo com estas definições e, conseqüentemente, a utilização de métodos estatísticos que são relevantes com essas definições, o objetivo da validação

Vários autores têm assinalado as inconsistências entre algumas definições dos critérios e os procedimentos experimentais propostos para sua avaliação em documentos recentes dedicados à validação de métodos analíticos na área farmacêutica, juntamente com os riscos e problemas ao tentar lidar com o contraditório, e às vezes cientificamente irrelevante, requisitos e definições (HARTMANN *et al.*; 1994; HARTMANN *et al.*, 1998; HUBERT *et al.*, 2003; HUBERT *et al.*, 2004;).

1.6.4 - Definições das principais características de validação

Com a finalidade de determinar as características de validação mais importantes a serem abordados em nosso trabalho, fizemos uma revisão das recomendações críticas publicadas destas definições e apontamos os pontos conflitantes e como aborda-los corretamente.

1.6.4.1 - Linearidade x Curva de Calibração

Linearidade de um procedimento é sua habilidade (em uma dada faixa de concentração) de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito na amostra. Em ensaios biológicos, geralmente não é possível

obter a potência diretamente de uma medida individual. Uma curva padrão é quase sempre usada, com incremento de doses e repetições, para obter um único resultado válido. Este resultado deve mostrar-se proporcional à concentração do analito na amostra (SFSTP, 2005).

A Curva de Calibração (função de resposta) de um procedimento analítico é a relação existente, dentro de uma faixa especificada, entre a resposta (sinal, e.g. área sob a curva, altura do pico, absorvância) e a concentração (quantidade) do analito na amostra. A curva de calibração deveria ser descrita preferencialmente por uma simples Curva de Calibração monotônica (i.e. estritamente crescente ou decrescente) que dá medidas confiáveis, i.e. resultados exatos. A função de resposta – ou curva padrão – é amplamente e frequentemente confundida com o critério de linearidade. O critério de linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada através da curva de calibração enquanto a Curva de Calibração refere-se à relação entre a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007a).

Este entendimento ficou claro desde 1995 e então, para evitar estas confusões, o guia de validação de métodos analíticos do FDA (2013) não contém mais o termo “linearidade”, mas apenas “calibração/curva padrão” sem restrições particulares exceto que “*o modelo mais simples que adequadamente descreve a relação concentração-resposta deverá ser usado*”.

1.6.4.2 - Veracidade

Veracidade é um conceito relacionado aos erros sistemáticos (HUBERT *et al.*, 2003; ISO 5725, 1994; ISO 3534-1, 2006). Na norma ISO 5725 (1994), parte 1 (Princípios gerais e definições) a definição de Veracidade (seção 3.7) é: “A proximidade de concordância entre o valor médio obtido de uma grande série de resultados de ensaios e um valor de referência aceito. A medida de Veracidade é normalmente expressa em termos de Tendência (do termo em inglês *bias*). Veracidade tem sido referida como “exatidão da média”. Este uso não é recomendado. Inclusive é expresso como a distância do valor médio de uma série de medidas (x_i) e um valor de referência μ_T . Este conceito é medido pela Tendência, pela Tendência Relativa ou pela recuperação:

$$\left(\frac{\bar{x}_i - \mu_T}{\mu_T}\right) \text{Tendência} = \bar{x}_i - \mu_T$$

$$\left(\frac{\bar{x}_i}{\mu_T}\right) \text{Tendência Relativa ou Erro Relativo (ER\%)} = 100 \times$$

$$\text{Recuperação (\%)} = 100 \times \quad = 100 - \text{Tendência Relativa (\%)}$$

Os documentos da ISO 5725-1 (1994) inequivocamente afirmam o que é Veracidade e como medi-la. A aplicação deste conceito aos experimentos de validação é feita medindo várias vezes padrões de referência independentes, para constar i padrões, para os quais um valor (μ_T) conhecido permite computar sua concentração predita ou quantidade: x_i . Além disto, é possível computar o valor médio destes valores preditos (\bar{x}_i) e conseqüentemente estimar a Tendência, a Tendência Relativa ou a Recuperação. Estes valores são bem estimados uma vez que são computados frequentemente durante a fase de validação de um método analítico.

Veracidade refere-se então a uma característica ou qualidade de um procedimento analítico e não a um resultado gerado por este procedimento (ROZET *et al.*, 2007a).

1.6.4.3 – Exatidão

Segundo a ISO 3534-2 (2006) exatidão é o grau de concordância entre resultados de um teste ou resultado de uma medição e o valor verdadeiro.

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, a “exatidão de medição” não é uma grandeza e não lhe é atribuído um valor numérico; Uma medição é dita mais exata quando é caracterizada por um erro de medição menor; A “exatidão de medição” é algumas vezes entendida como o grau de concordância entre valores medidos que são atribuídos ao mensurando. No entanto, o termo “exatidão de medição” não deve ser utilizado no lugar de veracidade de medição (BRASIL, 2012).

No entanto, o Erro Total de medição dos resultados obtidos a partir de um procedimento analítico está relacionado ao grau de concordância entre os valores encontrados, ou seja, os resultados, e o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito. O grau de concordância observado é baseado na soma dos erros sistemáticos e aleatórios, ou seja, o Erro Total associado

ao resultado. Consequentemente, o erro de medição é a expressão da soma de Veracidade (ou Tendência) e Precisão (ou desvio padrão), ou seja o Erro Total. Como mostrado abaixo, cada medição X tem três componentes: o μ_T verdadeiro valor da amostra, a Tendência do método (estimado pela média de vários resultados) e a precisão (estimada pelo desvio-padrão ou, na maioria dos casos, a precisão intermediária). Equivalentemente, a diferença entre uma observação X e o verdadeiro valor, é a soma dos erros sistemáticos e aleatórios, ou seja, o Erro Total ou o Erro de Medição (ROZET *et al.*, 2007a).

$$X = \mu_T + bias + precisão$$

$$\Leftrightarrow$$

$$X - \mu_T = bias + precisão$$

$$\Leftrightarrow$$

$$X - \mu_T = erro\ total$$

$$\Leftrightarrow$$

$$X - \mu_T = erro\ de\ medição$$

$$\Leftrightarrow$$

$$X - \mu_T = exatidão$$

Entretanto, quando se observa a seção correspondente à exatidão na parte 2 do documento ICH Q2R1 (assim como em BRASIL, 2003), os dados recomendados para exatidão são apresentados como: “exatidão deveria ser reportada como percentual de recuperação pelo ensaio de quantidades conhecidas adicionadas do analito na amostra ou como a diferença entre a média e o valor aceito como verdadeiro juntamente com os intervalos de confiança” Isto não se refere mais à Exatidão, mas em verdade à Veracidade como definida no documento da ISO 5725 porque ela é o valor médio de vários resultados – como oposto a um único resultado para a Exatidão – que é comparada ao valor verdadeiro, como afirmado anteriormente. Esta seção refere-se aos erros sistemáticos enquanto Exatidão como definido no ICH Q2R1 parte 1 e ISO 5725 parte 1 corresponde à avaliação do erro de medida.

No documento de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA), Exatidão é definida como “... a proximidade da média dos resultados de ensaios obtidos pelo método do valor verdadeiro (concentração) do analito. (...) O valor médio deveria estar

dentro de 15% do valor real exceto na concentração do Limite Inferior de Quantificação, onde ela não deveria desviar mais do que 20%. Os desvios da média a partir dos valores verdadeiros servem como medida de exatidão”. Como já mencionado previamente, esta definição corresponde à veracidade do método analítico. Para ensaios bioanalíticos, revisões extensas anteriores já avaliaram o problema da diferença da definição de Exatidão Relativa e Veracidade (HARTMANN *et al.*; 1994; HARTMANN *et al.*, 1998; HUBERT *et al.*, 2003; HUBERT *et al.*, 2004;).

Os documentos do FDA (USA, 2013) e do EMEA (2011) preveem a abordagem do Erro Total com especificações para este parâmetro para os diferentes tipos de ensaios bioanalíticos. No entanto, ambos documentos utilizam o termo Exatidão em lugar da Veracidade, expressando o Erro Total como a soma da Exatidão e da Precisão.

Para a maioria dos usos não importa se o desvio do valor verdadeiro é devido ao erro aleatório (falta de precisão) ou ao erro sistemático (falta de veracidade), enquanto a total quantidade de erro permanecer aceitável. Então, o conceito de Erro Analítico ou Exatidão como função do erro aleatório ou sistemático é essencial. Além disto, todo analista quer garantir que a quantidade total de erro do método não afete a interpretação do resultado do teste e comprometa a decisão subsequente. A decisão baseada na avaliação em separado do critério de veracidade e precisão não pode atingir isto. Apenas a avaliação da exatidão dos resultados que leva em conta o conceito do Erro Total, dá garantias tanto ao laboratório quanto aos órgãos reguladores da habilidade do método em atingir seu propósito (ROZET *et al.*, 2007b).

1.6.4.4 - Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre resultados independentes de testes/medições, obtidos sob condições especificadas (ISO, 2006). A precisão de um procedimento analítico, normalmente é expressa como a variância, desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medições/testes (ICH, 2005). Podem ser determinados três níveis para precisão:

- Repetibilidade ou precisão Intra-ensaios – Expressa a precisão sob as mesmas condições de operação em um curto período de tempo. Para ser avaliada, corridas do ensaio são feitas em condições de

repetibilidade, o que significa que “n” replicatas são testadas nas mesmas condições, na mesma amostra inicial, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento, em um curto período de tempo.

- Precisão Intermediária – Expressa variação dentro de um laboratório: entre dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes etc. (ICH, 2005). Para ser avaliada, “p” sessões de ensaios correspondem às condições para testar a precisão intermediária. Isto significa que os resultados de ensaio são obtidos usando uma amostra homogênea em diferentes dias e/ou por diferentes operadores e/ou com diferentes equipamentos no mesmo laboratório. O objetivo final do estudo é obter uma imagem do procedimento que represente o mais precisamente possível sua variabilidade sob circunstâncias normais de uso. Segundo Farmacopéia dos EUA (USA, 2010), uma análise composta da variância permite estimar os componentes variação intra-ensaios e entre-ensaios que podem ser usados para estimar a PI do bioensaio.
- Reprodutibilidade – Expressa a precisão entre diferentes laboratórios (estudos colaborativos normalmente aplicados à padronização de uma metodologia).

1.6.4.5 - Intervalo de doses e Limites de Quantificação

Para qualquer método, é necessário determinar o Intervalo de concentrações ou valores sobre os quais o método pode ser aplicado. O documento do ICH Q2R1 (2005), na parte 1, define Intervalo de um procedimento analítico como “o intervalo entre a maior e a menor concentração (quantidade) de analito na amostra (incluindo estas concentrações) para as quais tenha sido demonstrado que o procedimento analítico tem um nível de precisão, exatidão e linearidade apropriados”. O FDA (USA, 2013) define o Intervalo de quantificação como “o intervalo de concentrações, incluindo o LSQ (Limite Superior de Quantificação) e o LIQ (Limite Inferior de Quantificação), que pode ser quantificada com confiança, reprodutibilidade, exatidão e precisão através do uso da relação de resposta-concentração, onde o LIQ é o limite inferior de quantificação e o LSQ é o limite superior de quantificação.

ICH Q2R1 parte 2 (2005) recomenda os Intervalos mínimos a serem abordados para os diferentes tipos de estudo e de ensaios, sendo recomendado para a determinação de impurezas, que o intervalo cubra da concentração máxima especificada até 120% desta especificação.

Entretanto, o Intervalo de doses é a concentração ou intervalo de quantidades sobre o qual o erro total de medida – ou exatidão – é aceitável. É essencial demonstrar a exatidão dos resultados sobre o Intervalo inteiro. Conseqüentemente, a Exatidão, e, portanto, a Veracidade e a Precisão devem ser avaliadas experimentalmente e aceitáveis sobre todo o Intervalo alvo para a aplicação de um método analítico.

Mesmo sabendo que cada área de trabalho tem suas próprias características e problemas, os critérios principais a serem preenchidos são similares ou deveriam ser similares uma vez que a validação de métodos analíticos independe do setor industrial, matriz de amostras ou tecnologia analítica empregada. Uma terminologia harmonizada de validação deveria ser adotada para permitir discussões e comparações de problemas de validação entre cientistas de diferentes campos. Este consenso de terminologia não está ainda disponível, mesmo existindo tentativas (ROZET *et al.*, 2007b).

Entretanto, se é desejável haver uma harmonização entre os campos interessados em validação analítica, seria interessante notar que, mesmo no campo farmacêutico, os laboratórios não usam a mesma terminologia enquanto eles deveriam usar definições similares para descrever critérios de validação. A terminologia usada entre diferentes documentos oficiais como o Guia de validação do “Food and Drug Administration” (FDA) para métodos bioanalíticos (2013), ICHQ2R1 (2005) e ISO (1994, 2005) é diferente.

1.6.4.6 – O Conceito do Erro Total (Total Error) e o Perfil de Exatidão (*Acuracy Profile*)

Como descrito acima, dentre as características apresentadas no guia da ICH (2005), duas são mais importantes para ensaios quantitativos: exatidão e precisão. Porém, a interpretação do guia ICH não é clara, uma vez que esta abordagem confunde a avaliação do erro sistemático, representada pelo critério de Veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão (GIBELIN *et al.*,

2009). O guia ISO (ISO 5725, parte 1, 1994) provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da Veracidade e da Precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”, tem sido difundida pela comissão SFSTP, desde sua publicação inicial em 1997 (CHAPUZET *et al.*, 1997), que já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; HUBERT *et al.*, 2008).

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes tendência e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas esta abordagem é inconveniente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente (BOULANGER *et al.*, 2007).

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do FDA (USA, 2013) preconizam que pelo menos 67% (4 em 6 resultados) de amostras de controle da qualidade estejam dentro de 15% do seu valor nominal, 33% das amostras sob controle da qualidade (não todas as replicatas na mesma concentração) podem estar fora dos 15% de seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Esta regra ficou conhecida como a regra 4-6-15 (HOFFMAN & KRINGLE, 2007).

Ou seja, é adequado inferir que um método bioanalítico é apropriado a seu objetivo de uso se pelo menos 66,7% dos resultados observados (a longo prazo) estejam dentro de 15% do valor real. Isto é uma simplificação, uma vez que as propriedades de uma amostragem pequena (i.e. de seis amostras sob controle da qualidade) estão sujeitas à variação aleatória e podem ser diferentes das propriedades do método em longo prazo (HOFFMAN & KRINGLE 2007).

O uso de Intervalos de Confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura (HUBERT *et al.*, 2004; ROZET *et al.*, 2007a; HOFFMAN & KRINGLE, 2007; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; ROZET *et al.*, 2007b, ROZET *et al.*, 2007c; VISWANATHAN *et al.*, 2007). O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto aleatórios. O conceito do erro total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Além disto, é uma

medida compreensiva simples da performance do método, ao invés de uma avaliação da Tendência do método e da variabilidade individual.

Na maioria das vezes, um procedimento analítico visa quantificar sobre um intervalo de quantidades ou concentrações. Conseqüentemente, durante a fase de validação, as amostras são preparadas para cobrir de forma adequada esse intervalo, e um intervalo de tolerância de expectativa- β (IT β) é calculado em cada nível.

Entretanto, quando analisarmos amostras, apenas o Erro Total de sua medição pode ser levado em conta, nesta amostra. É impossível separar os Erros Sistemático e Aleatório. Uma vantagem desta abordagem é que reflete mais diretamente o comportamento de ensaios individuais e irá resultar em menor rejeição de corridas em estudo do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da Tendência e precisão observadas (ROZET *et al.*, 2007b).

Inclusive, abordagens clássicas concluem sobre a validade de um método analítico pela comparação com um limite de aceitação fixo estabelecido “a priori”, por um lado o erro sistemático e por outro o erro aleatório (ROZET *et al.*, 2007b).

Outra vantagem é que, esta abordagem permite o controle do risco de aceitar-se um método impróprio enquanto provê garantias de que os resultados das medições que serão obtidos durante o uso futuro do método validado estarão incluídos dentro dos limites de aceitação fixados de acordo com os requerimentos. Este último ponto não é apenas essencial para o analista assim como suas conclusões e diagnóstico são feitos em relação aos resultados obtidos. Também é uma crescente exigência das autoridades regulatórias gerenciar o risco associado ao uso destes métodos na análise de rotina (USA, 2004; USA, 2006).

1.6.4.7 – Perfis de Exatidão

Uma significativa fonte da Tendência e imprecisão em métodos analíticos pode ser causada pela escolha de modelos estatísticos inadequados para a curva de calibração. Os critérios estatísticos como R^2 , falta de adequação a modelos ou quaisquer outros testes estatísticos para demonstrar qualidade de adequação a modelos são apenas informativos e meramente relevantes para os objetivos do ensaio. Para este objetivo, vários autores (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2003; HOFFMAN e KRINGLE, 2005) introduziram o uso do Perfil de Exatidão baseado em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de

calibração dará resultados de qualidade. Os modelos deverão ser retidos ou rejeitados baseado na exatidão de resultados calculados independentemente das propriedades estatísticas. Esta abordagem já foi usada por vários autores como Streef *et al.* (2005) para a validação de um ensaio de cromatografia líquida para determinação quantitativa de loperamida em plasma.

O Perfil de Exatidão é uma ferramenta para tomada de decisão para acessar a validade de um método analítico, i.e. sua habilidade para quantificar o mais exatamente quanto possível e é obtido simplesmente através da ligação dos limites inferiores e da ligação dos limites superiores. A inclusão do Perfil de medição de erro, dentro dos limites de aceitação $[-\lambda, \lambda]$ nos níveis-chave deve ser examinado antes de declarar que o procedimento é válido sobre um intervalo específico de valores. β geralmente será escolhido acima de 80% e, como demonstrado por Boulanger *et al.* (2007), escolhendo 80% para β durante o pré-estudo de validação garante que 90% das corridas serão aceitas mais tarde na rotina quando a regra 4-6-1 (por exemplo, 4-6-15) é utilizada na rotina (ROZET *et al.*; 2007b).

A estimação dos parâmetros de Veracidade e da Precisão, μ_T , variância intra-séries e variância inter-séries em cada nível de concentração, não é o objetivo final, mas uma etapa necessária para calcular a proporção esperada de resultados situados nos limites de aceitação (HUBERT *et al.*, 2007).

1.6.4.8 - Índices Globais de Conveniência

O Perfil de Exatidão pode ser usado como uma ferramenta de decisão visual para avaliar a validade de métodos analíticos. Entretanto, como para toda representação gráfica, esta interpretação visual contém um componente de subjetividade. No entanto, (DERRINGER & SUICH, 1980; DERRINGER, 1994) elaboraram o Índice Global de Conveniência (IGC) baseado nos critérios mais importantes de validação, que variam de 0 a 1 para aumentar a objetividade da tomada de decisão. O primeiro passo é atribuir um IGC aos seguintes critérios: Intervalo de Doses, Veracidade e Precisão (ROZET *et al.*; 2007b).

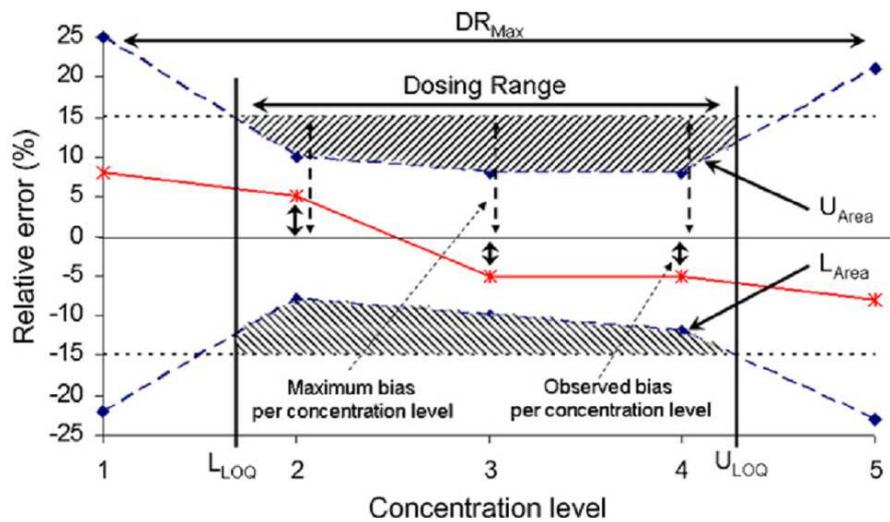


Figura 7 – Representação esquemática de um perfil de exatidão. Ilustração dos índices computados: Intervalo de doses, Veracidade e precisão. As linhas pontilhadas são os limites de aceitação superior e inferior, as linhas tracejadas são os limites de expectativa de tolerância- β e a linha contínua é a Tendência Relativa.
Fonte: Rozet *et al.*, 2007.

1.6.4.9 - Incerteza de Medição

A incerteza de Medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (grandeza submetida à medição), com base nas informações utilizadas (BRASIL, 2012) e segundo a EURACHEM (2000), é a indicação quantitativa da qualidade dos resultados de medição, sem a qual os mesmos não poderiam ser comparados entre si, com os valores de referência especificados ou com um padrão. Uma vez que o valor verdadeiro do resultado de uma medição é desconhecido qualquer resultado de uma medição será somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando em questão. Sendo assim, a representação completa de tal mensurando deverá incluir a dúvida deste resultado, a qual é traduzida pela sua incerteza de medição (EURACHEM, 2000).

1.7 - Pré-estudo de validação

No Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária (INCQS/FIOCRUZ) com a finalidade de avaliar o uso destas ferramentas para validação de imunoensaio, aplicamos o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão no pré-estudo

de validação do ELISA para determinação do teor de ovoalbumina em vacinas contra febre amarela, abrangendo o intervalo de concentrações de 33 a 167% da concentração alvo (5,0µg/mL) e um intervalo controle bem abaixo desta faixa (0,33 a 2,5%). O pré-estudo de validação deste ELISA demonstrou que o ensaio apresenta Exatidão, Repetibilidade, Precisão Intermediária, Linearidade e Veracidade no intervalo de concentrações de 1,25 a 10µg/mL e é um método confiável para avaliar o teor de ovoalbumina (POSSAS, 2012). Pudemos concluir com o referido trabalho que a abordagem do conceito do Erro Total é uma ferramenta para validações que apresenta desempenho superior em relação à abordagem clássica que avalia os componentes veracidade e precisão isoladamente, apresentando sensibilidade e capacidade de identificar a deficiência na Exatidão de um imunoenensaio e que os Índices de Exatidão proveem uma avaliação objetiva dos perfis de Exatidão. Tal trabalho rendeu um artigo científico que foi submetido à revista do Instituto Adolfo Lutz e publicado (POSSAS *et al.*, 2012), para maiores informações, vide anexo A.

A etapa posterior na validação de um método é a validação do método em uso, objeto do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar a validação em uso do ELISA para quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela utilizando o Conceito do Erro Total, os Perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão.

2.2 ESPECÍFICOS

- Confirmar o desempenho do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e do Índice de Exatidão na Validação em Uso do ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina;
- Determinar qual modelo rende resultados mais exatos usando os perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão pela comparação dos resultados obtidos no ELISA com os modelos de ajuste de curva logística de 4 parâmetros (4PL), curva logística de 5 parâmetros (5PL) e de Linhas Paralelas (PAR);
- Reavaliar os parâmetros de validação determinados na fase de pré-estudo de validação do método na validação em uso do método.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo consistiu de uma validação em uso do ensaio de determinação do teor de ovoalbumina residual para vacinas contra Febre Amarela, classificado como um ensaio de detecção quantitativa para uma impureza. O trabalho avaliou a Veracidade, a Exatidão e a Precisão (intra-ensaios, entre-ensaios e precisão intermediária) do ensaio utilizando o Conceito do Erro Total para construir Perfis de Exatidão dos resultados, obtidos pela curva 4PL, 5PL e método de Linhas Paralelas, que foram avaliados pelo Índice de Exatidão.

3.1 Amostras analisadas

Na fase de validação em uso, foi testado um único lote de vacina contra febre amarela. A cada ensaio foram testadas a amostra pura (com teor de ovoalbumina original 0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ determinado como a média de todos os resultados) paralelamente a mesma amostra deliberadamente contaminada (“spiked”) com três concentrações de ovoalbumina: Baixa (25%) = 1,26 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, Média (100%) = 5,05 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ e Alta (300%) = 14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$. Estes são os valores reais obtidos com as diluições para os valores introduzidos de 1,25; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente ao arredondarmos as diluições obtidas com as alíquotas usadas. O conjunto de amostras pura (doravante referida como 0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) e fortificadas é denominado Amostras de Validação.

Para contaminação das amostras, foi utilizado um lote de padrão de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512) preparado no próprio laboratório na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e diluído como descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Esquema de diluições para obtenção das concentrações para contaminação das amostras de validação utilizadas no estudo de validação em uso do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina residual a partir de uma solução de padrão a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

% de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Padrão Calibração	Partindo de Padrão a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
		25%	100%	300%
Concentração	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1,26 μg /0,5 ml	5,05 μg /0,5 ml	14,9 μg /0,5 ml
Pré-diluição em PBS	1/50	1/6,6	1/3,3	1/1,12
Diluição em amostra	-	1/6	1/3	1/3

3.2- ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina (EDTO)

O padrão de ovoalbumina de calibração e as amostras de validação foram submetidos ao método imunoenzimático (ELISA). A cada ensaio, o padrão de calibração e amostras de validação foram pré-diluídos em salina tamponada com fosfatos com tween 20 e leite em pó desnatado (PBS/T20 0,05%/NFDM) como descrito no quadro 1 e foram pré diluídos a 1/10 e aplicados nesta diluição nos primeiros poços sendo diluídos, com fator dois, a partir dos segundos poços da placa até completar um total de oito diluições para cada, desta forma o padrão de ovoalbumina originalmente contendo 2 µg/ml entrou na placa nas concentrações de 0,2 µg a 0,0016 µg/ml. Controles positivos e negativos (branco) foram incluídos em cada placa. A placa de 96 orifícios (MaxSorp™, Nunc, NY, USA) foi previamente sensibilizada com anticorpos de coelho anti-ovoalbumina (Biomanguinhos /FIOCRUZ) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 e bloqueada com albumina sérica bovina a 3% (p/v). A incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas com salina tamponada com tween 20 (PBS/T20 0,05%) e o anticorpo monoclonal de coelho anti-ovoalbumina (Biomanguinhos /FIOCRUZ) conjugado a peroxidase em PBS/T20 0,05%/NFDM foi adicionado. Foi feita nova incubação por 30 minutos a 37 °C e nova lavagem. A reação foi revelada com o substrato para a peroxidase em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e foi interrompida com ácido sulfúrico 2 M após 15 a 20 minutos. A leitura foi feita em leitor de microplacas a um comprimento de onda bicromático de 450/620 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando a curva logística de quatro parâmetros (4PL), a curva logística de cinco parâmetros (5PL) e o método de Linhas Paralelas (PAR) no programa estatístico CombiStats do EDQM (2013).

3.3 - Seleção dos parâmetros de validação

No Pré-estudo de validação (POSSAS, 2012) foram verificadas as normas RDC Anvisa (BRASIL, 2003); ICH Q5A (R1) (1999); ICH Q2 (R1) (2005); FDA (2013); USP (2010) e SFSTP (HUBERT *et al.*, 1999; HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; HUBERT *et al.*, 2008), visando definir os parâmetros a serem abordados e a metodologia para o cálculo destes parâmetros, partindo da premissa

que o ensaio de detecção de ovoalbumina é classificado como um ensaio para a detecção quantitativa de uma impureza.

Adotamos a mesma abordagem do Erro Total como descrita pela SFSTP (HUBERT *et al.* 1999; HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; HUBERT *et al.*, 2008), definida no pré-estudo de validação (POSSAS, 2012; POSSAS *et al.* 2012) para a construção do Perfil de Exatidão do Ensaio utilizando os resultados obtidos com três diferentes metodologias de cálculos: a) curva 4PL; b) Curva 5PL e c) Modelo de Linhas Paralelas. Os resultados foram então avaliados pela determinação dos Índices Globais de Conveniência visando obter o Índice de Exatidão (ROZET *et al.*, 2007b). Para tanto, os seguintes parâmetros foram determinados no estudo:

- Veracidade
- Precisão
- Exatidão
- Curva de Calibração
- Linearidade,
- Intervalo e Limites de Quantificação

3.4 - Matriz de Ensaio

Com a finalidade de avaliar os parâmetros definidos, uma matriz de ensaios foi desenhada visando obter o máximo de informações de cada corrida, sendo definido que seriam realizadas no mínimo quatro corridas válidas ($p=4$) com amostras de um mesmo lote de vacina contra febre amarela, fortificadas (“spiked”) com três concentrações de padrão de ovoalbumina ($m=3$) em duas placas replicatas ($n=2$). Visando incluir concentrações baixa, média e alta em relação à concentração alvo de $5,0 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, uma vez que o limite de aceitação do teor de ovoalbumina na vacina de febre amarela é de $5,0 \mu\text{g}/\text{dose}$, as concentrações escolhidas foram: baixa = 25% ($1,25 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$), Média = 100% ($5,0 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$), e Alta = 300% ($15 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$), na prática, devido às diluições realizadas, aplicamos uma correção a estas concentrações para efeito de cálculo, assumindo os valores $1,26$; $5,05$ e $14,9 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$. A cada ensaio foi também testada a mesma amostra de vacina pura visando determinar a diferença entre o teor original (determinado como $0,18 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) e o recuperado nas amostras fortificadas.

Desta forma, foram realizados seis ensaios independentes dos quais apenas cinco foram válidos e utilizados no estudo.

3.5 – Estudo de validação em uso

3.5.1 - *Análise Estatística*

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para cada replicata de placa, para cada concentração para cada um dos ensaios pelo método de 4PL, de 5PL e de PAR utilizando o programa de computador CombiStats® (EDQM, 2012).

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b HUBERT *et al.*, 2008) e o perfil de Exatidão dos resultados obtidos na curva de 4PL nas diferentes concentrações estudadas foi construído como descrito por Rozet *et al.* (2007). Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foram empregados os Índices de Conveniência Globais - Índice de Exatidão que utiliza o Índice de Intervalo, o Índice de Veracidade e o Índice de Precisão para o seu cálculo, como descrito em Rozet *et al.* (2007), para tanto, uma planilha do Microsoft Excel® foi elaborada e validada frente aos dados do referido artigo. Os gráficos apresentados e análises complementares como teste de desvio de linearidade, coeficientes de regressão e de inclinação das curvas padrão, foram feitos utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism®.

3.5.2 – Análise de variância

A homogeneidade dos resultados de ensaios obtidos em cada concentração foi avaliada pela análise de variância de delineamento inteiramente casualizado (“one-way” ANOVA) para identificação de valores aberrantes (outliers). Os valores aberrantes devem ser excluídos caso ocorram.

Os quadrados médios intra (MSI) e entre ensaios (MSE) calculados na ANOVA foram usados para obter estimativas das variâncias intra-ensaios, entre-ensaios e total em planilha do Microsoft Excel® elaborada e validada como descrito por Rozet *et al.* (2007).

3.5.3 – Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

O intervalo de um imunoenensaio é definido como as concentrações ou potências para as quais tenha sido demonstrado que o método analítico tenha níveis satisfatórios de Veracidade e Precisão Intermediária e o Limite Inferior de Quantificação será a menor concentração ou potência em que estas condições forem atendidas.

O limite inferior de detecção é considerado como sendo 3 desvios padrões acima da média do branco (controle de background), usando esta fórmula a chance de classificação errada é de 7%.

3.5.4 - Veracidade

A Veracidade do método, expressa pelo Erro Relativo % (ER%), foi determinada obtendo-se a diferença percentual entre a média ponderada das concentrações e o valor nominal de referência (μ_T).

3.5.5 - Precisão

A precisão do método foi estimada pela determinação da Precisão intra e entre ensaios que foram combinadas para determinação da Precisão Intermediária (PI), expressa como Coeficiente de Variação percentual (CV%), obtido através da divisão do desvio padrão calculado pela concentração nominal (μ_T) nos oito níveis de concentrações. As variâncias Intra e entre Ensaios e da Precisão Intermediária assim como os Coeficientes de Variação % (CV%) foram calculados a partir das concentrações estimadas (ISO, 1994; FDA, 2013; HUBERT *et al.*, 2004; ROZET *et al.*, 2007b).

3.5.6 - Exatidão

A Exatidão é a combinação do Erro sistemático e do Erro Aleatório, i.e. o Erro Total e foi demonstrada pelo Perfis de Exatidão construídos e avaliados pelos Índices de Exatidão (Item 3.5.7).

3.5.7 - Índices Globais de Conveniência

Derringer & Suich (1980) e Derringer (1994) elaboraram o índice global de conveniência (IGC) baseado nos critérios mais importantes de validação, que variam de 0 a 1, para aumentar a objetividade da tomada de decisão permitindo demonstrar a qualidade geral do método sendo validado sob o Intervalo estudado. Para tanto foi necessário atribuir um IGC aos seguintes critérios: Intervalo de doses, veracidade e precisão (ROZET *et al.*; 2007b).

a) Índice do Intervalo de doses (I_{ID}) (Tabela 4):

$$I_{ID} = \frac{LSQ - LIQ}{DR_{MAX}} \in [0; 1]$$

- LSQ – Limite Superior de Quantificação;
- LIQ – Limite Inferior de Quantificação;
- DR_{MAX} – Diferença entre a maior e a menor concentração investigadas durante a validação.

Quando este índice é igual a um significa que o método é válido em todo o Intervalo estudado. Quando inferior a um, o método só é válido em uma parte menor do Intervalo estudado.

b) Índice de Veracidade I_V (Tab. 4). Este índice ilustra a veracidade do método, e é computado como segue:

$$I_V = \frac{SSB_{Max} - SSB_{Obs}}{SSB_{MAX}} \in [0; 1]$$

Onde:

$\sum_{j=1}^m \lambda = m\lambda^2 SSB_{Max}$ é a soma do quadrado da Tendência máxima em cada nível de concentração investigado pelos padrões de validação incluídos no Intervalo de doses, i.e., com λ sendo o limite em % e m o número de níveis de concentrações incluídos no Intervalo de doses.

SSB_{Obs} é a soma do quadrado da Tendência observada em cada nível de concentração também incluído no Intervalo de doses.

Um Índice de Veracidade próximo a um implica que o método é quase sem Tendência.

c) Índice de Precisão I_P (Tab. 4)

$$I_P = \frac{S_{Area} + I_{Area}}{AREA_{MAX}} \in [0; 1]$$

Onde:

- S_{Area} é a área definida pelo $LT\beta$ superior e o limite de aceitação superior $+\lambda$ e incluído entre o S_{LDQ} e o I_{LDQ} .
- I_{Area} é a área definida pelo $LT\beta$ inferior e o limite de aceitação inferior $-\lambda$ e incluído entre o LSQ e o LIQ .
- $AREA_{Max}$ é a área definida pelos limites de aceitação superior e inferior $\pm\lambda$ e os LSQ e LIQ , i.e. $2\lambda (LSQ - LIQ)$.

Quanto mais próximo a um este índice, mais preciso é o método sendo validado.

d) Finalmente para estimar a qualidade geral do método, um Índice de Conveniência (DERRINGER & SUICH, 1980; DERRINGER, 1994), denominado Índice de Exatidão (I_E), que é definido como a combinação dos critérios individuais de conveniência como a média geométrica dos três Índices:

$$I_E = \sqrt[3]{I_V I_{ID} I_P} \in [0; 1]$$

Inclusive, o interesse do Perfil de Exatidão é estimar o Erro Total esperado no Intervalo de doses estudado, portanto o Índice de Exatidão é um resumo dos três primeiros índices, demonstrando a qualidade geral do método sendo validado sob o Intervalo estudado (ROZET *et al.*, 2007).

3.6 - Critérios de aceitação

Para que um método de imunoensaio seja aceito, é recomendado que a Precisão e a Veracidade sejam ambas $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ) e adicionalmente é recomendado que o Erro Total do método (soma da precisão e da veracidade) seja $\leq 30\%$ ($\leq 40\%$ no LIQ) (EMEA, 2011). Foram computados para cada concentração estudada os intervalos de tolerância de expectativa β (IT- β) ajustados para 95%, que foram comparados aos limites de aceitação $\pm 30\%$ (λ). Os resultados obtidos na curva 4PL, 5PL e PAR foram plotados em gráficos para construir os Perfis de Exatidão. Assim, o IT- β é o intervalo onde é esperado que uma proporção de 95% dos futuros resultados esteja dentro. Portanto, os IT- β que estiverem dentro os limites de aceitação, apresentam as condições para um método ser considerado válido (ROZET *et al.*, 2007). O Quadro 2 apresenta os critérios de aceitação adotados na Validação em Uso do EDTO.

Quadro 2. Critérios de aceitação adotados na Validação do EDTO.

Parâmetro	Critério de Aceitação	Fonte
Veracidade	ER%* $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ no LIQ e LSQ)	EMEA (2011)
Precisão Intra ensaios	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)	EMEA (2011)
Precisão Entre ensaios	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)	EMEA (2011)
Precisão Intermediária	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)	EMEA (2011)
Erro Total**	$\leq 30\%$ ($\leq 40\%$ no LIQ e LSQ)	EMEA (2011)
Curva de Calibração	Equação mais simples que descreve a função concentração – resposta.	FDA (USA, 2013)
Linearidade	As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas $\pm 20\%$.	EMEA (2011)
Limite Inferior de Quantificação	Menor concentração no Intervalo que apresentou resultados com Exatidão satisfatória	FDA (USA, 2013)
Limite Inferior de Detecção	Média do Branco +3DP***	WHO (1997)

3.7 - Cálculo da Incerteza de Medição

Foi realizada uma avaliação do Tipo A, utilizando o CV% intra-ensaios, como descrito em Wales (2005). Foram calculadas a Incerteza Padrão Combinada (u_c) e a Incerteza Expandida (U) para o ensaio. A Incerteza Expandida provê um intervalo que, acredita-se, deve incluir o valor do mensurando com um alto nível de confiança sendo obtida através da multiplicação da u_c pelo fator de abrangência (k). Foi utilizado $k = 2$, provendo aproximadamente 95% de nível de confiança para uma distribuição normal.

4 RESULTADOS

4.1 - Validação em uso do EDTO

Foi realizada a Validação em uso do EDTO utilizando o Conceito do Erro Total, os Perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão visando confirmar o desempenho do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e do Índice de Exatidão na Validação em Uso do ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina descrito por Possas *et al.* (2013).

4.2 – Determinação do melhor modelo de ajuste de curva: 4PL, 5PL e PAR.

Os resultados obtidos no estudo utilizando os métodos 4PL, 5PL e PAR por replicata, por dia e por concentração, podem ser observados na Tabela 1 com os valores brutos recuperados nas amostras de validação fortificadas e na Tabela 2 são apresentados os resultados com a subtração da média de resultados obtidos pela amostra pura. Os resultados de cada grupo foram submetidos a uma análise de variância para verificar sua homogeneidade. Não houve valores aberrantes em nenhum dos grupos. Estes resultados foram utilizados no estudo de validação em uso do ensaio para os cálculos dos parâmetros estudados.

O Gráfico 1 apresenta o controle estatístico de processo das inclinações (b) obtidas na curva padrão de ovoalbumina por cada replicata nos seis ensaios realizados (apenas cinco foram válidos).

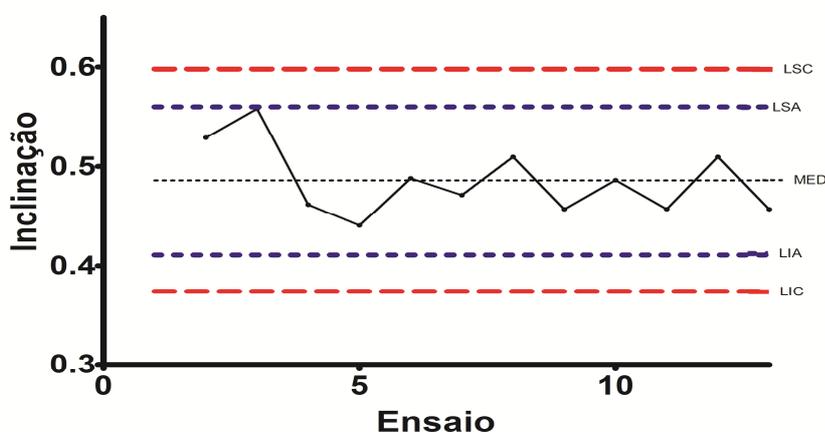


Gráfico 1. Controle estatístico de processo dos valores de inclinação (b) obtidos para cada replicata dos ensaios realizados, apresentando resultado do teste de Kolmogorov Smirnov = 0,98, confirmando a distribuição normal dos dados. Onde: LSC e LIC – Limites Superior e inferior de Controle

(média $\pm 3x$ Desvio Padrão = 99%); LSA e LIA – Limites Superior e Inferior de Alerta (média $\pm 2x$ Desvio Padrão = 97,5%); Med = Média.

Tabela 1 – Resultados brutos calculados para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,18 a 14,9 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$. Utilizando: A – curva Logística de 4 parâmetros. B - curva Logística de 5 parâmetros; C – Modelo de Linhas Paralelas.

A - 4PL

CI $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Puro (0,18)		1,26		5,05		14,9	
Replicatas	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,186	0,180	1,501	1,525	5,868	5,524	15,150	14,381
	0,201	0,188	1,483	1,277	5,844	5,210	15,590	14,157
	0,196	0,170	1,612	1,570	6,238	5,967	16,545	15,270
	0,171	0,148	1,541	1,480	5,824	5,725	15,414	15,295
	0,191	0,201	1,488	1,550	5,763	6,479	15,007	18,020

B 5PL

CI $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Puro (0,18)		1,26		5,05		14,9	
Replicatas	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,186	0,179	1,504	1,529	5,865	5,512	15,132	14,260
	0,201	0,187	1,488	1,280	5,853	5,214	15,510	14,119
	0,194	0,169	1,620	1,572	6,233	5,962	16,469	15,221
	0,171	0,149	1,545	1,492	5,832	5,755	15,376	15,286
	0,191	0,201	1,490	1,551	5,763	6,477	14,976	17,999

C – PAR

CI $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Puro (0,18)		1,26		5,05		14,9	
Replicatas	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,226	0,203	1,495	1,554	6,292	5,825	16,584	14,287
	0,237	0,221	1,486	1,286	6,224	5,528	16,371	14,143
	0,256	0,192	1,693	1,598	7,025	6,369	18,169	15,418
	0,210	0,185	1,568	1,430	6,259	6,157	15,782	16,343
	0,206	0,213	1,527	1,619	5,930	6,987	13,460	17,027

CI – concentração Introduzida; n - replicata.

Tabela 2 – Resultados calculados para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,18 a 14,9 µg/0,5 ml subtraídas as médias dos resultados obtidos com a amostra pura (0,18). Utilizando: A – Curva Logística de 4 parâmetros. B - curva Logística de 5 parâmetros; C – Modelo de Linhas Paralelas.

A - 4PL

CI µg/0,5 mL	Pura						
	(0,18)	1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,183	1,317	1,342	5,685	5,341	14,966	14,198
2		1,300	1,094	5,661	5,027	15,406	13,973
3		1,429	1,387	6,055	5,784	16,362	15,087
4		1,358	1,297	5,641	5,541	15,231	15,112
5		1,305	1,367	5,580	6,296	14,823	17,836

B - 5PL

CI µg/0,5 mL	Pura (0,18)						
		1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,183	1,321	1,346	5,682	5,329	14,949	14,077
2		1,305	1,097	5,670	5,031	15,327	13,936
3		1,437	1,389	6,050	5,779	16,286	15,038
4		1,362	1,309	5,649	5,572	15,193	15,103
5		1,307	1,368	5,580	6,294	14,793	17,816

C PAR

CI µg/0,5 mL	Pura (0,18)						
		1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,215	1,280	1,339	6,077	5,610	16,370	14,072
2		1,271	1,072	6,009	5,313	16,156	13,929
3		1,478	1,383	6,810	6,154	17,955	15,203
4		1,353	1,215	6,045	5,942	15,567	16,128
5		1,312	1,404	5,715	6,772	13,245	16,812

CI – concentração Introduzida;

4.2.1 Comparação dos modelos de ajuste utilizando os Perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão

A tabela 3 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção dos Perfis de Exatidão do ELISA para Detecção de Teor de Ovoalbumina (EDTO) quando os resultados foram calculados com a curva de ajuste de 4PL, 5PL e PAR. Os limites de Tolerância de Expectativa β foram calculados para 95% de conteúdo e os limites de aceitação $\pm \lambda$ foram definidos como $\pm 30\%$ como preconizado por DeSilva *et al.* (2003) para ensaios de ligação.

Tabela 3 – Resultados obtidos para construção dos Perfis de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina por ensaio, em amostras de vacina contra a febre amarela.

A	4PL			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9
Média	0,18	1,32	5,66	15,54
ER%	1,83	4,72	12,10	4,32
CV% _{PI}	9,46	7,30	6,96	9,75
LST%	24,13	22,06	28,68	27,45
LIT%	-20,47	-12,62	-4,48	-18,81
LST*	0,22	1,54	6,50	18,99
LIT*	0,14	1,10	4,82	12,10
Erro Total	11,29	12,02	19,06	14,07

B	5PL			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9
Média	0,18	1,32	5,66	15,25
ER%	1,61	5,08	12,15	2,36
CV% PI	9,31	7,31	6,91	7,46
LST%	23,59	22,45	28,62	20,07
LIT%	-20,36	-12,28	-4,31	-15,35
LST*	0,22	1,54	6,50	17,89
LIT*	0,14	1,11	4,83	12,61
Erro Total	10,93	12,39	19,07	9,83

C	PAR			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9
Média	0,22	1,31	6,04	15,54
ER%	19,31	4,03	19,70	4,32
CV% PI	11,78	9,11	9,27	9,75
LST%	47,26	25,69	41,69	27,45
LIT%	-8,63	-17,63	-2,29	-18,81
LST*	0,27	1,58	7,16	18,99
LIT*	0,16	1,04	4,93	12,10
Erro Total	31,09	13,14	28,97	14,07

ER – Erro Relativo; CV – Coeficiente de Variação; PI – Precisão Intermediária; LST e LIT Limites Superior e Inferior de Tolerância de expectativa β ; * - Valores em $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$; r - Limite de repetibilidade.

Os gráficos 2 A, B e C apresentam os Perfis de Exatidão construídos com esses dados. Em A, foram inseridos os resultados obtidos com a 4PL, em B, foram inseridos resultados obtidos pela 5PL e em C utilizando PAR.

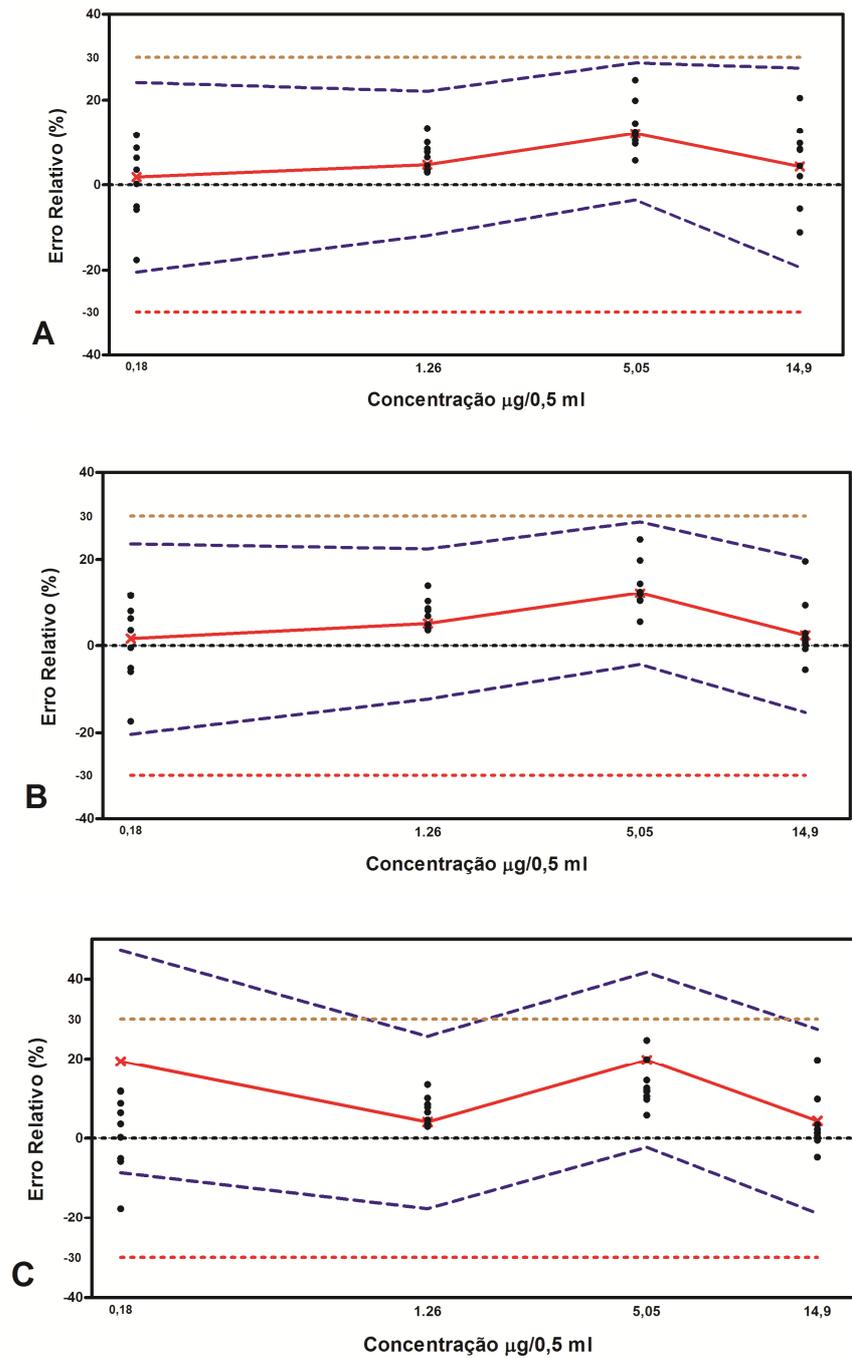


Gráfico 2. Perfis de Exatidão obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL (A), 5PL (B) e PAR (C) no intervalo de doses de 0,18 a 14,9 µg/0,5 mL. A linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação $\pm 30\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95% de expectativa de tolerância β . Os pontos são os erros relativos % por replicatas das amostras de validação. O ensaio é capaz de quantificar com Exatidão apenas quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$),

4.2.2 Índices Globais de Conveniência

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os Índices Globais de Conveniência.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os Índices de Exatidão para cada modelo de cálculos utilizado.

Tabela 4 - Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão: O Índice de Exatidão é um resumo dos três primeiros índices, demonstrando a qualidade geral do método sendo validado sobre o Intervalo estudado.

Índices Globais de Conveniência	Método de Cálculo		
	4PL	5PL	PAR
Índice de Precisão	0,26	0,43	0,07
Índice de Intervalo	1,00	1,00	0,14
Índice de Veracidade	1,00	0,89	0,59
Índice de Exatidão	0,635	0,723	0,179

Os parâmetros Veracidade (ER%) e Precisão Intermediária (CV%) foram combinados na avaliação para determinar qual o melhor modelo de ajuste para cálculo dos resultados (4PL, 5PL e PAR) pela construção dos Perfis de Exatidão, demonstrando que o modelo de ajuste de 5PL foi o que melhor descreveu a relação concentração-resposta, o que foi confirmado pela utilização do Índice de Exatidão o que demonstra a sensibilidade do Conceito do Erro Total a mudanças nas características sendo validadas. O melhor ajuste descrito pelo modelo 5PL foi confirmado pelo Índice de Exatidão (0,723) mais elevado que os obtidos pelos outros dois modelos.

4.3 - Reavaliação dos parâmetros de validação

Foram reavaliados a Veracidade, Precisão, Exatidão, Curva de Calibração, Linearidade, Intervalo, Limites inferior e superior de quantificação e limite de detecção determinados determinados na fase de pré-estudo de validação do método na validação em uso do método utilizando o modelo que apresentou resultados mais exatos – 5PL.

A tabela 5 resume os resultados obtidos para os parâmetros de validação no estudo de validação em uso do EDTO utilizando o modelo 5PL. São apresentados o Intervalo, a Curva de Calibração, a Veracidade, a Precisão, a Exatidão, a Linearidade, os Limites Inferiores de Quantificação e de Detecção.

Tabela 5 - Resumo dos resultados da validação em uso do Ensaio de Determinação do Teor de Ovoalbumina, sendo apresentadas a Veracidade, as Precisões (Repetibilidade, Entre-Ensaio e Precisão Intermediária), a Exatidão (Erro Total), a Linearidade e o Limite Inferior de Quantificação obtidos com o modelo 5PL.

Parâmetro	Resultados/conclusão	Critério de Aceitação
Veracidade	Amplitude do ER% = 1,61 a 12,15% Conclusão = Conforme	ER%* $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ no LIQ e LSQ)
Precisão Intra ensaios	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)
Precisão Entre ensaios	Amplitude CV% = 0,00 a 6,49 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)
Precisão Intermediária	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ)
Exatidão (Erro Total)	0,18 = [-20,47; 24,13] 1,26 = [-12,62; 22,06] 5,0 = [-04,48; 28,68] 14,9 = [-18,81; 27,45] Erro Total máximo = 19,07. Conclusão = Conforme em todo intervalo estudado	$\leq 30\%$ ($\leq 40\%$ no LIQ e LSQ)
Curva de Calibração	R > 0,98 nas 10 curvas de calibração realizadas. Conclusão = Conforme	Equação mais simples que descreve a função
Linearidade	As médias das concentrações calculadas foram iguais às concentrações introduzidas $\pm 20\%$. Os intervalos de tolerância β estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$), em todo o intervalo de quantificação. Conclusão: O Método apresenta resultados com relação linear com a concentração introduzida.	As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas $\pm 20\%$.
Limite Inferior de Quantificação	0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	Menor concentração no Intervalo que apresentou resultados com Exatidão satisfatória

4.3.1 – Veracidade

A tabela 6 apresenta os resultados da Veracidade obtidos com o modelo de 5PL para o EDTO.

Tabela 6 - Resultados para veracidade obtidos, para resultados calculados pelo modelo 5PL.

Veracidade ($p=5$; $n=2$)	Erro Relativo %
CI	5PL
0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$	1,61
1,26 $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$	5,08
5,05 $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$	12,15
14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$	2,36

p = número de ensaios; m = número de concentrações; n = número de replicatas por ensaio e por nível de concentração.

Quando o modelo de 5PL foi utilizado, todas as concentrações apresentaram ER% dentre $\pm 20\%$ demonstrando a Veracidade satisfatória do método.

4.3.2 – Precisão

A tabela 7 apresenta os resultados da Precisão obtidos com o modelo de 5PL.

Tabela 7 - Resultados para precisão obtidos, para resultados calculados pelo modelo 5PL.

Precisão (p=5; n=2)	Repetibilidade (CV%)	Entre-ensaios (CV%)	Precisão Intermediária (CV%)
CI	5PL	5PL	5PL
0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	6,68	6,49	9,31
1,26 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	5,76	4,50	7,31
5,05 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	6,63	1,96	6,91
14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	7,46	0,00	7,46

p = número de ensaios; m = número de concentrações; n = número de replicatas por ensaio e por nível de concentração, CV = Coeficiente de Variação.

4.3.3 - Exatidão (Erro Total)

Na abordagem do Conceito do Erro Total, recomendado pela ISO 5725-1 (1994) e como descrito por ROZET et al. (2007), foi construído um Intervalo com Limites de Tolerância de Expectativa- β (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) de 95%, com nível de confiança γ de 95%. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o ER% e a precisão intermediária e demonstra a exatidão do método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de $\pm 30\%$ (A, B), quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como exato; quando não, o método não foi aceito. A Exatidão foi então demonstrada pelos Perfis de Exatidão construídos que foram avaliados pelo Índice de Exatidão.

Tabela 8 - Resultados para Limites de Tolerância de Expectativa- β obtidos, para resultados calculados pelo modelo 5PL.

Exatidão (p=5; n=2)	LTE- β	Erro Total
0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	[-20,47; 24,13]	10,93
1,26 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	[-12,62; 22,06]	12,39
5,05 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	[-04,48; 28,68]	19,07
14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	[-18,81; 27,45]	9,83

LTE - Limites de Tolerância de Expectativa; p = número de ensaios; m = número de concentrações; n = número de replicatas por ensaio e por nível de concentração.

4.3.4 - Curva de Calibração

A tabela 9 analisa as Curvas de Calibração do ensaio apresentando os resultados dos Coeficientes de Correlação (R) obtidos por replicata para a curva de calibração. A tabela 10 apresenta os dados utilizados para elaborar o Gráfico 3, onde $x = \log$ aritmo de [concentração + 1] versus $y = \log$ aritmo de [1 + média da absorbância] por concentração.

Tabela 9 – Resultados das curvas de calibração dos cinco ensaios obtidas como o Coeficiente de Correlação de Pearson do logaritmo das absorbâncias (Y) em função do logaritmo da concentração (diluições) do padrão de calibração (X). Intervalo (m=4) 0,18 a 14,9 µg/0,5 mL

Ensaio	1		2		3		4		5	
Replicatas	n1	n2								
R	0,993	0,984	0,990	0,989	0,989	0,990	0,991	0,990	0,989	0,990
b	0,462	0,441	0,488	0,471	0,510	0,457	0,486	0,457	0,510	0,457

R = Coeficiente de correlação de Pearson; b = descreve a inclinação da curva.

Tabela 10 – Média das absorbâncias obtidas pelas oito diluições em Densidades Óticas para cada concentração introduzida nos cinco ensaios.

CI µg/0,5 mL	log (CI +1)	Média DO (p=8)	log (Média DO+1)
0,18	0,07	0,256 (CV%=6,6)	0,10
1,26	0,35	0,599 (CV%=5,5)	0,20
5,05	0,78	0,845 (CV%=4,8)	0,27
14,9	1,20	1,008 (CV%=4,4)	0,30

CI – concentração Introduzida; DO – densidade ótica; log – logaritmo; CV – Coeficiente de Variação; p – número de diluições feitas no ensaio;

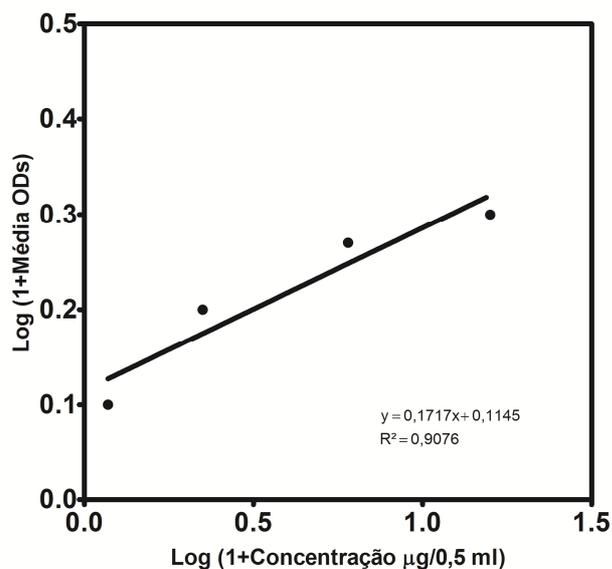


Gráfico 3 - Curva de Calibração do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina Residual quando o logaritmo de (1 + média das Absorbâncias) foi plotado contra o Logaritmo de (1 + concentração em µg/0,5 mL intriduzida). Foram obtidos $R^2 = 0,9076$, a inclinação foi 0,1717 e a intercepção = 0,1145.

4.3.5 - Linearidade

A Linearidade de um método analítico é sua capacidade dentro de um intervalo definido de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra. As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas $\pm 20\%$ (EMEA, 2011). A tabela 11 apresenta os resultados médios obtidos e os limites absolutos inferiores e superiores de $\pm 20\%$.

Tabela 11 – Demonstração da resposta linear do ensaio como recomendado por EMEA (2011) onde a média dos valores calculados por concentrações do Intervalo de Quantificação devem ser iguais às concentrações introduzidas $\pm 20\%$. O coeficiente de correlação foi 0,999 ($p = 0,0006$), equação: $Y = 1,022 \cdot X + 0,1431$. Teste de desvio de Linearidade ($p = 1,0$)

μT	0,18	1,26	5,05	14,90
-20%	0,144	1,008	4,040	11,920
μ	0,183	1,324	5,664	15,252
+20%	0,216	1,512	6,060	17,880

μT – Concentração introduzida; μ - Média da concentração calculada.

Também visando demonstrar a Linearidade, o intervalo de tolerância de Expectativa- β absoluto foi aplicado para construir o Gráfico 4 que demonstra os perfis de linearidade obtidos no estudo pelo modelo de ajuste 5PL que compreende as concentrações de 0,18 a 14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$.

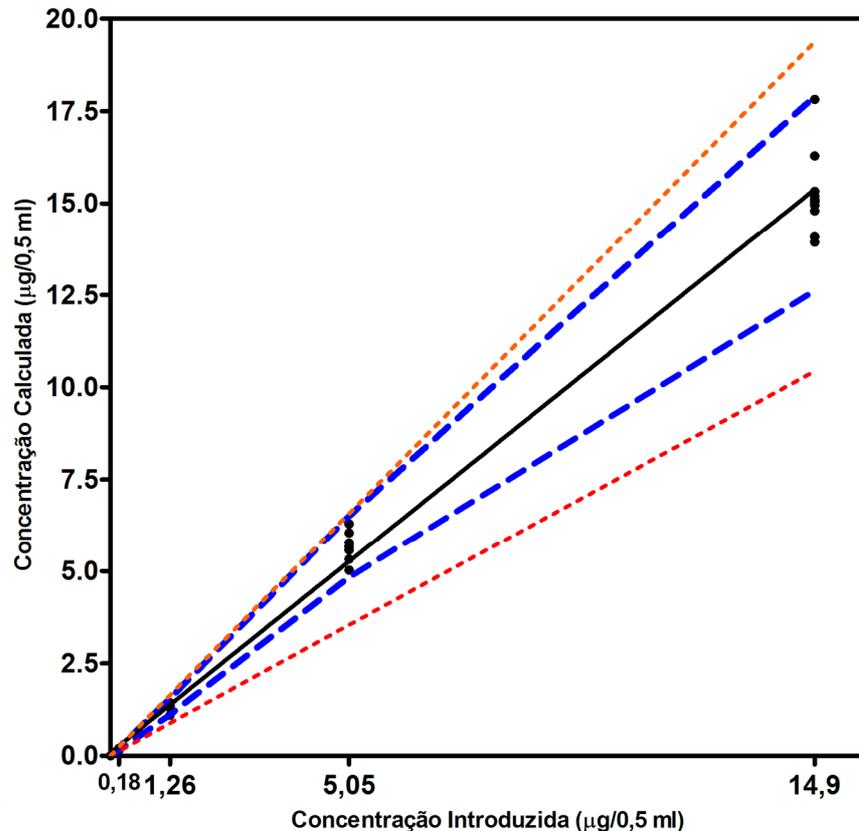


Gráfico 4 - Perfil de Linearidade obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva; 5PL como modelo de cálculos no intervalo de doses de 0,18 a 14,9 µg/0,5 mL. A linha contínua representa a linha de identidade ($x=y$), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos adotados $\pm 30\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância β em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais obtidos para as replicatas das amostras de validação. Os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$), em todo o intervalo de doses, portanto o ensaio é capaz de quantificar com Linearidade satisfatória neste intervalo.

4.3.6 - Intervalo de Quantificação, Limite Inferior de Quantificação e Limite inferior de Detecção;

O Intervalo de Quantificação foi determinado como sendo [0,18 a 14,9 µg/0,5 mL], o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) foi a concentração 0,18 µg/0,5 mL, menor concentração avaliada no estudo e o Limite inferior de Detecção (LID), determinado como a média dos valores de DOs obtidas para o branco em todos os ensaios (0,06) mais três vezes seu desvio padrão (0,004), indicou a concentração aproximada de 0,002 µg/0,5 mL como LID. A tabela 12 apresenta os resultados.

Tabela 12 – Intervalo de Quantificação e Limites de Detecção e Quantificação

Parâmetro	Resultado
Intervalo	0,18 a 14,9 µg/0,5 mL
Limite Inferior de Quantificação	0,18 µg/0,5 mL
Limite Superior de Quantificação	14,9 µg/0,5 mL
Limite Inferior de Detecção	~0,002 µg/0,5 mL (média do Branco +3DP)

O ensaio foi capaz de quantificar com Veracidade e Precisão conformes no Intervalo de concentrações de 0,18 a 14,9 9 µg/0,5 mL.

4.3.7 – Determinação da Incerteza de Medição

Foram calculadas as Incertezas Padrões Combinadas (u_c) e as Incertezas Expandidas (U) e Expandida% para cada diferente nível de concentração. Os resultados podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13 – Resultados das Incertezas de Medição relativas à Determinação do Teor de Ovalbumina Residual para cada nível de concentração investigado na validação em uso.

5PL			
CI	U_c	U	U%
0,18	0,069	±0,137	13,7%
1,26	0,059	±0,119	11,9%
5,05	0,059	±0,118	11,8%
14,9	0,073	±0,146	14,6%

CI – Concentração Introduzida; U_c – Incerteza Padrão Combinada;
U – Incerteza Expandida; U% Incerteza Expandida Percentual

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo confirmar a eficiência do uso do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na validação de um imunoenensaio, o ELISA para Detecção do Teor de Ovoalbumina (EDTO) residual em vacinas contra febre amarela.

O ensaio é classificado como ensaio do tipo II, ou seja, um teste quantitativo para determinação de impurezas (BRASIL, 2003; ICH, 2005) sendo preconizado para validação deste tipo de ensaios a determinação da Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Limites Inferior de Quantificação, Exatidão e Robustez (apenas para ensaios em desenvolvimento).

No entanto, alguns destes parâmetros geram dúvidas em sua interpretação, devido à forma como são descritos nas publicações oficiais e guias dos principais organismos internacionais (ICH, ISO, FDA, EURACHEM, VIM etc). Desta forma buscamos revisões apresentadas em artigos que analisam criticamente as definições e fazem sugestões de como abordá-los corretamente em estudos de validações.

Assim, adotamos a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir os perfis de Exatidão do EDTO, como sugerido pela comissão da SFSTP (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b HUBERT *et al.*, 2008). Para esta finalidade foram determinados o Intervalo de concentrações, Limite Inferior de Detecção, a Veracidade, a Curva de Calibração, a Exatidão e a Linearidade do método.

Foram realizadas seis corridas de ensaio, das quais cinco foram válidas com duas placas replicatas em cada. A cada corrida foram testados o padrão de calibração para elaboração da curva padrão na concentração de 2 µg/mL (pré diluído a 1/10 entrando na placa nas concentrações de 0,2 a 0,00156 µg/mL) e quatro amostras de validação, a amostra pura (cujo teor residual de ovoalbumina foi determinado como 0,18 µg/0,5 mL (no modelo 5PL que apresentou melhor Exatidão) e fortificada com três diferentes concentrações de ovoalbumina visando as concentrações aproximadas de 25% (1,25 µg/0,5 mL); 100% (5 µg/0,5 mL) e 300% (15 µg/0,5 mL) de 5 µg/0,5 mL, teor máximo de ovoalbumina aceito para vacinas contra febre amarela (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). De acordo com as alíquotas utilizadas na fortificação das amostras, as concentrações nominais para efeito de cálculo foram

corrigidas para 1,26; 5,05 e 14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$. Para realização dos ensaios, as amostras eram também pré diluídas a 1/10, entrando nas placas nas diluições 1/10 a 1/1280.

O teor de ovalbumina de cada replicata, para cada concentração introduzida, do Intervalo de concentrações incluído no estudo (0,18 a 14,9 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) foi calculado utilizando o programa de computador CombiStats (EDQM, 2013) pelos métodos de ajuste de curva logística de quatro parâmetros (4PL), curva logística de cinco parâmetros (5PL) e modelo de linhas paralelas (PAR), visando determinar qual o melhor método de cálculo. Os resultados foram considerados homogêneos quando testados pela ANOVA, não ocorrendo valores aberrantes (que teriam sido removidos do estudo caso acontecessem). O controle estatístico de processo realizado com as inclinações demonstrou que todas as curvas padrões de cada replicata foram válidas e estavam sob controle. Os resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

Os resultados obtidos para Veracidade, determinada pela Tendência (ER% amplitude 1,61% 5PL a 19,31% PAR) e Precisão Intermediária (%CV amplitude 7,31% 5PL a 11,38% PAR) foram todos inferiores a $\pm 20\%$, critério de aceitação recomendado para estes parâmetros avaliados individualmente (EMEA, 2010). No modelo de 5PL na determinação da Veracidade o ER% variou de 1,61% a 12,15% e o %CV para avaliação da Precisão Intermediária variou de 6,91% a 9,31%. No pré-estudo de validação do EDTO, obtivemos um valor máximo de Tendência (ER%) = -4,91% (amplitude -0,45 a -4,91%) e a Precisão Intermediária apresentou um %CV máximo de 6,65% (amplitude de 5,25 a 6,65%) (POSSAS *et al.*, 2013). Os resultados obtidos no presente estudo para Veracidade e Precisão Intermediária, embora satisfatórios em relação aos critérios de aceitação, apresentaram variabilidade superior aos obtidos na fase de pré-estudo, provavelmente devido a uma interferência da matriz de componentes biológicos do produto, uma vez que na fase de pré-estudo foram rotineiramente testados apenas padrões de validação diluídos em PBS e não amostras fortificadas.

Os parâmetros Veracidade (ER%) e Precisão Intermediária (%CV) foram combinados na avaliação para determinar qual o melhor modelo de ajuste para cálculo dos resultados (4PL, 5PL e PAR) através da construção dos Perfis de Exatidão, demonstrando que o modelo de ajuste de 5PL foi o que melhor descreveu a relação concentração-resposta, o que foi confirmado pela utilização dos Índices de Exatidão

o que demonstra a sensibilidade do Conceito do Erro Total a mudanças nas características sendo validadas.

A Curva de Calibração foi avaliada nas 10 diferentes curvas de calibração obtidas por cada replicata nos cinco ensaios realizados quando foi ajustada a regressão linear do logaritmo das concentrações (diluições) em função do logaritmo das respostas obtidas (absorbâncias), tendo todas as curvas sido satisfatórias, o que pode ser avaliado pelo valor de R maior que 0,98 nas 10 curvas. As 10 curvas foram capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta, como recomendado em FDA (2013). Com a mesma finalidade foi elaborado um gráfico onde o logaritmo da média das Absorbâncias + 1 (Y) foi plotada em função do logaritmo da concentração + 1 (X) em cada grupo de concentração do Intervalo estudado e foi obtido um $R^2 = 0,9076$, que também descreve satisfatoriamente a relação concentração-resposta. Rozet *et al.*, (2007) na avaliação da Função de Reposta de ensaios imunoenzimáticos, consideraram satisfatórios resultados de $R^2 = 0,9896$ e $0,925$. Na fase de pré-estudo de validação do EDTO, obtivemos valores de $R^2 = 0,9892$ (POSSAS *et al.* 2013).

Diferenciar claramente a Curva de Calibração (Função de Reposta) de Linearidade permite aplicar o conceito de Linearidade não apenas aos valores relativos, mas também aos valores absolutos do método como para titulações onde os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração. Tentativas de prover uma Resposta de Função são, entretanto sem uso e impraticáveis se não houver um sinal ou resposta, no entanto a linearidade dos resultados poderá ser avaliada (ROZET *ET AL.*, 2007a).

O perfil de Linearidade elaborado utilizando o conceito do Erro Total utilizou os valores absolutos obtidos nos ensaios, inseridos em gráfico com os limites de aceitação absolutos para o Erro Total de $\pm 30\%$ calculados para cada concentração e os $IT\beta$ absolutos foram conectados, de modo semelhante ao empregado na avaliação da Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada satisfatória no modelo 5PL.

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes Veracidade e Precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas esta abordagem é pouco eficiente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente (BOULANGER *et al.*, 2007).

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura (HUBERT *et al.*, 2004; ROZET *et al.*, 2007a; HOFFMAN & KRINGLE, 2007; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; ROZET *et al.*, 2007b, ROZET *et al.*, 2007c; VISWANATHAN *et al.*, 2007). O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos (veracidade) quanto aleatórios (precisão). O conceito do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Além disto, é uma medida de fácil compreensão sobre o desempenho do método, ao invés de uma avaliação da Tendência do método e da Variabilidade individual. Na maioria das vezes, um procedimento analítico visa quantificar sobre um intervalo de quantidades ou concentrações. Conseqüentemente, durante a fase de validação, as amostras são preparadas para cobrir de forma adequada esse intervalo, e um intervalo de tolerância de expectativa- β (IT β) é calculado em cada nível. Entretanto, quando analisarmos amostras, apenas o Erro Total de sua medição pode ser levado em conta, nesta amostra. É impossível separar os Erros Sistemático e Aleatório. Uma vantagem desta abordagem é que reflete mais diretamente o comportamento de ensaios individuais e resultará em menor rejeição de corridas em uso do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da Tendência e precisão observadas (ROZET *et al.*, 2007b).

O Limite Inferior de Quantificação foi 0,18 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, os IT β de 95% garantem com um erro de 5% que quando este método analítico for usado para medir uma amostra que contenha ovoalbumina nesta concentração, 95 vezes em 100 o resultado obtido estará entre 0,126 e 0,234 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ de ovoalbumina. Finalmente a Exatidão do método pode ser demonstrada com a utilização dos perfis de Exatidão em todo Intervalo de Estudo somente quando os resultados foram calculados com os modelos 4PL e 5PL.

Usamos então os índices descritos por Rozet *et al.*, (2007b), sendo o principal o Índice de Exatidão (IE) que é um índice global de conveniência do desempenho do método e depende do Índice de Intervalo de Dose (ID), Índice de Veracidade (IV) e Índice de Precisão (IP). No presente estudo, o emprego dos Índices permitiu escolher o modelo de 5PL, cujo desempenho nos Perfis de Exatidão foi semelhante ao do modelo 4PL, uma vez que o modelo 5PL apresentou Índice de Exatidão (0,81) superior ao apresentado pelo modelo 4PL (0,80). O baixo IE obtido pelo modelo PAR (0,64) é

mais uma prova da aplicação do conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na validação de métodos bioanalíticos.

Tais índices permitem quantificar o desempenho dos testes quando comparações, de modelos de curvas de calibrações são realizadas em diferentes Perfis de Exatidão.

O IE obtido no pré-estudo de validação do EDTO foi 0,70 (POSSAS et al, 2013). Gaudin e Laurentie (2009) relataram IE de 0,64 ao empregar estes índices na validação de um kit de ELISA para detecção de Nicarbazina residual em ovos.

6 CONCLUSÕES

Os critérios de aceitação da SFSTP para o conceito do Erro Total e dos Perfis de Exatidão para validação de métodos apresentam vantagens sobre critérios baseados na estimação de pontos para avaliar a veracidade e precisão, principalmente na validação de ensaios biológicos. A abordagem do intervalo de confiança prove um controle maior dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método satisfatório.

A validação em uso do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina demonstrou que o ensaio apresenta satisfatórias - Exatidão, Repetibilidade, Precisão Entre-Ensaio, Precisão Intermediária e Veracidade, é um método que provê resultados confiáveis para avaliar o teor de ovoalbumina, confirmando os resultados obtidos na fase de pré-estudo de validação.

A próxima etapa será uma investigação mais detalhada do efeito da matriz das amostras sobre a quantificação do teor de ovoalbumina, ainda para a publicação destes resultados.

REFERÊNCIAS

- ALPHA Diagnostic International; Mouse Anti-Ovalbumin Ig ELISA Kit Cat. No. 600-100-OGG; For Semi-Quantitative Determination of Anti-Ovalbumin Total Ig (IgG+IgA+IgM) in Biological Fluids; Instruction Manual No. M-600-100-OGG. Disponível em: <http://www.4adi.com/objects/catalog/product/extras/600-100-OGG.pdf>; em 10/01/2012.
- BENCHIMOL, J. L. (org.). Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2001.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 2 jun 2003.
- BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). V872 Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p.
- BRASIL, ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025:2005: Requisitos gerais para competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
- CATT, K., TREGGAR, G.W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. *Science*, v. 158, p. 1570–2. 1967.
- CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; BERVOAS-MARTIN, S.; BOULANGER, B.; CHEVALIER, P. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP STP pharma sciences, v.7, n. 3, p. 169-194, 1997.
- CROWTHER, J. F. ELISA theory and practice. *Methods in Molecular Immunology*, v. 42. Humana Press, Totowa. 1995.
- DeSILVA, B.; SMITH, W.; WEINER, R.; KELLEY, M.; SMOLEC, J.; LEE, B.; KHAN, M.; TACEY, R.; HILL, H.; CELNIKER, A. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 11, p. 1885-1900, 2003.
- DUDLEY, R. A.; EDWARDS, P.; EKINS, R.P. *et al.* Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* v. 31, p. 1264 – 1271, 1985.
- DERRINGER, G. & SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

- DERRINGER, G. C. A balancing act: optimizing a product's properties. *Quality Progress*, p. 51-58. 1994.
- EDQM – Council of Europe. CombiStats v5.0, www.combistats.eu
- EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr. Guideline on bioanalytical method validation. 2011
- ENGVALL, E.; PERLMAN, P. "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry*. v.8, n. 9, p. 871-874, 1971.
- EURACHEM. CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, English edition, 2^a ed. Prague, 2000.
- FAN, X.; SUBRAMANIAM, R.; WEISS, M. F.; MONNIER, V. M. Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7 cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor kappaB and intracellular reactive oxygen species formation.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FINDLAY, J. W. A. & DILLARD, R.F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*, v.9, n. 2, article 29. E260-E267. 2007.
- GIBELIN, N.; DUPONT, D.; IMBERT, S.; ROZET, E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 877, n. 23, p. 2407-11, 2009.
- HARTMANN, C. J.; MASSART, D. L.; MCDOWALL, R. D. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *Pharm. Biomed. Anal.* v. 12, p.1337-43, 1994.
- HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 17, p. 193-218, 1998.
- HE, X.; TSANG, T. C.; LUO, P.; ZHANG, T.; HARRIS, D. T. Enhanced tumor immunogenicity through coupling cytokine expression with antigen presentation. *Cancer Gene Ther.*, v. 10, p. 669-677, 2003.
- HAVEN, M. C.; ORSULAK, P. J.; ARNOLD, L.L. *et al.* Data-reduction methods for immunoradiometric assays of thyrotropin compared. *Clin. Chem.* v. 33, p. 1207 – 1210, 1987.
- HOFFMAN, D. & KRINGLE R. Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models. *J. Biopharm. Stat.* v. 15, p. 283–293, 2005.
- HOFFMAN, D.; KRINGLE, R. A total error approach for the validation of quantitative analytical methods. *Pharm Res.* v. 24, n. 6, p.1157-63, 2007.

- HUBERT, P. H.; CHIAP, P.; CROMMEN, J. *et al.*, The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Anal. Chim. Acta.* v.391, p.135–148. 1999.
- HUBERT, P. H.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. *et al.* Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. *STP Pharma Pratiques*, v. 13, n. 3, p. 101-138, 2003.
- HUBERT, P. H.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 36, p. 579-86, 2004.
- HUBERT, P. H.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 45, p. 70-78, 2007a.
- HUBERT, P. H.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 45, p. 82-96. 2007b.
- HUBERT, P. H.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. *et al.* Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal Part IV. Examples of application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 48, p. 760–71, 2008.
- INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil), Vocabulário Internacional de Metrologia, Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008) 1ª Ed. Brasileira do VIM, Tradução autorizada - JCGM 200:2008. 2008.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q5A (R1): viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, Geneva, 1999.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, 2005.
- ISO 5725, Application of the Statistics-Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement — Part 1: General principles and definitions. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 1994.
- ISO, International Organization for Standardization. ISO 3534-1: Statistics—Vocabulary and Symbols. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 2006.
- ISO. International Organization for Standardization. ISO 3534-2. Statistics – Vocabulary and symbols – Part 2: Applied statistics. 2. ed. Genebra: International Organization for Standardization; 2006.

- LEQUIN, R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* v. 51, n. 12, p. 2415–8, 2005.
- LI-CHAN, E. C. Y.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science and Technology*, 4th ed.; Stadelman, W. J., Cotterill, O. J., Eds.; Haworth Press: New York, 1995; pp 105 175.
- MEE, R. W. β -Expectation and β -Content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics.* v. 26, n. 3, p.251-4, 1984.
- METZ, B.; HENDRIKSEN, C. F. M.; JISKOOT, W.; KERNSTEN, G. F. A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* v. 20, p. 2411-2430, 2002.
- POSSAS J. L. S. Pré validação do ensaio imunoenzimático para quantificação do teor de ovoalbuminana na vacina contra febre amarela, Monografia de Especialização. PPGVS/INCQS/ FIOCRUZ; 2012.
- POSSAS J. L. S.; DOS SANTOS J. E.; NASCIMENTO, M. C.; DOS SANTOS, P. A. DOS ANJOS, D. W. C.; MOURA, W. C. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de um ensaio imunoenzimático. *Rev. Inst. Ad. Lutz.* v. 71, n. 4, p. 691-705, 2012.
- RODBARD, D.; FRAZIER, G. R. Statistical analysis of radioligand assay data. *Methods Enzymol.* v. 37, p. 3 – 22, 1975.
- ROZET E, WASCOTTE V, LECOUTURIER N, PRÉAT V, DEWÉ W, BOULANGER B, *et al.* Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation. Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta.* v. 591, p. 239-47, 2007.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS E., OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B., HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 111–125, 2007a.
- ROZET, E.; WASCOTTE, V.; LECOUTURIER, N.; PRÉAT, V.; DEWÉ, W.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. H. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal. Chim. Acta* v. 591, p. 239-47, 2007b.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, E.; RUDAZ, S. BOULANGER, B.; HUBERT, P.; *J. Chromatogr. A*; Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. v. 1158, p. 126-37, 2007c.
- SAVIGE, J. A.; PASPALIARIS, B.; SILVESTRINI, R.; DAVIES, D.; NIKOLOUTSOPOULOS, T.; STURGESS, A., NEIL, J; POLLOCK, W.; DUNSTER, K.; HENDLE, M. A review of immunofluorescent patterns associated with

- antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol.* v. 51, p. 568-75. 1998.
- SFSTP, Commission report, B. RAYMOND, A. GAILLANDRE, N. GIBELIN, N. *et al.* Guideline for the validation of biological assay methods; STP Pharma Pratiques, v. 15, n. 5, pp 364-83; 2005.
- SOUSA, A. M. C.; Manual de normalização de trabalhos acadêmicos /. Rio de Janeiro: INCQS, 2011.
- STREEL, B., CECCATO, A., KLINKENBERG, R., HUBERT, P. H. Validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of loperamide in human plasma. *J. Chromatogr. B* v. 814, p. 263-273, 2005.
- TEZUKA, H.; YOSHIKAWA, M. Presented at the Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, Tokyo, Japan, 1995; p 163.
- USA, U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration - FDA/CDER. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation; 2013
- USA - USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA). Process Analytical Technology (PAT) Initiative, FDA, Rockville, MD, 2004.
- USA - USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA), International Conference on Harmonization (ICH): Quality Risk Management (Q9), Fed. Regist.vol. 71. 32105–32106. 2006.
- USA - USP-UNITED STATES PHARMACOPOEIA, mon. <1033>, Biological Assay Validation. 2010.
- VAN WEEMEN, B. K, SCHUURS, A. H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* v. 15, n.3, p. 232–6, 1971.
- VIDOVIC, D.; GRADDIS, T.; CHEN, F.; SLAGLE, P.; DIEGEL, M.; STEPAN, L.; LAUS, R. Antitumor vaccination with HER-2-derived recombinant antigens. *Int. J. Cancer.* v. 102, p. 660-664, 2002.
- VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S ; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER, R.
Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm. Res.* v. 24, n. 10, p. 1962-73, 2007.
- WALES, Health Protection Agency. Uncertainty of Measure in testing. National Standard Method QSOP 4 issue 5. (UK); 2005.
- WIDE, L. & PORATH, J. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. *Biochem Biophys Acta*, v. 30, p. 257–60, 1966.
- YALOW, R. & BERSON, S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* v. 39, p. 1157–75, 1960.

ANEXO 1 - REAGENTES E SOLUÇÕES

REAGENTES

Os reagentes carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico, fosfato monopotássico, ácido cítrico, ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck; soro albumina bovina fração V, TMB, ovalbumina grau VI, peróxido de hidrogênio, da Sigma e Leite desnatado em pó da Difco (NFDM 1%). Todos os reagentes foram de alta pureza e adquiridos comercialmente.

SOLUÇÕES

a) Tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9.6

Carbonato de sódio (Na_2CO_3)	0,75 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	1,5 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Autoclavar a 121°C – 1 atm por 20 minutos. Estocar a 2 a 8°C . Utilizar no prazo de 12 meses.

b) Tampão citrato-fosfato pH 5.0

Solução A: Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,8 g
Água destilada qsp	500 mL
Solução B: Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	3,5 g
Água destilada qsp	500 mL

Adicionar a solução B na solução A, para ajustar o pH para 5,0. Autoclavar a 121°C – 1 atm por 20 minutos. Estocar a 2 a 8°C . Utilizar no prazo de 12 meses.

c) PBS – Salina tampão fosfato

Cloreto de sódio (NaCl)	8 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,2 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	1,13 g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

Autoclavar a 121°C – 1 atm por 20 minutos. Estocar a 2 a 8°C. Utilizar no prazo de 12 meses.

d) Ácido sulfúrico – 2M

Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	55 ml
Água destilada q.s.p	500 ml

Estocar a temperatura ambiente (18 a 25°C). Utilizar no prazo de 12 meses.

e) Soro albumina bovina 3% (BSA)

Soro albumina bovina (BSA)	15 g
Água destilada q.s.p	500 ml

f) Tetrametilbenzidina (TMB)

3,3,5,5, Tetrametilbenzidina	0,1 g
DMSO (Dimetilsulfoxido)	10 ml

g) Ovalbumina Padrão (100 µg/ml)

Ovalbumina Grau VI	1g
Água destilada	10 ml

Misturar bem sem agitação para evitar a formação de espuma. Esta será a solução mãe. Diluir 100 µl da solução mãe em 100 ml de água destilada para obter uma concentração de 100 µg/ml. Armazenar a -17°C a -25°C e utilizar no prazo de 12 meses.

h) Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes

H₂O₂ 100 volumes 30 ml
 Água destilada q.s.p 100 ml

Armazenar a 2 a 8°C e utilizar no prazo de 12 meses. Soluções preparadas no momento de uso.

i) Suspensão de captura

Tampão Carbonato-bicarbonato pH 9,610 ml
 Soro de captura anti-ovalbumina (coelho)1µl

j) Tampão de lavagem (PBS/T20 0,05%)

PBS.....1000 ml
 Tween 20.....500 µl

Misturar bem

k) Tampão de trabalho (PBS/T20 0,05%/NFDM 1%)

PBS/T20.....100 ml
 Leite em pó desnatado.....1g
 Misturar bem

l) Suspensão do conjugado

Tampão de trabalho (PBS/T20 0,05%/NFDM 1%)..... 10 ml
Soro conjugado..... 15µl

Volume usado para uma placa

m) Solução do substrato

Tampão Citrato-fosfato..... 10 ml
TMB/DMSO..... 100 µl
H₂O₂ 30vl..... 5 µl

ANEXO 2

POSSAS J. L. S.; DOS SANTOS J. E.; NASCIMENTO, M. C.; DOS SANTOS, P.A. ANJOS, D.W.C.; MOURA, W.C. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de um ensaio imunoenzimático. Rev.. Inst. Ad. Lutz. 71(4):691-705, 2012.

Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático

Use of the total error concept, the accuracy profiles and the accuracy index in the pre-study validation of an enzyme-linked immunosorbent assay

RIALA6/1523

Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Wlamir Corrêa de MOURA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ. Tel.: (21) 3865-5130. E-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br
Recebido: 18.04.2012 - Aceito para publicação: 08.11.2012

RESUMO

O uso do conceito do Erro Total em validação de métodos analíticos é abordagem que incorpora a expressão da soma da veracidade e da precisão. Esse método utiliza ainda os Perfis de Exatidão baseados em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade e prevê o controle do risco de aceitar uma metodologia imprópria. Com a finalidade de avaliar o uso dessas ferramentas para efetuar a validação de bioensaios, foram aplicados o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão no pré-estudo de validação de ELISA para determinar o teor de ovalbumina em vacinas, abrangendo-se o intervalo de 33-167% da concentração alvo (5,0µg/mL) e um intervalo controle abaixo dessa faixa (0,33-2,5%). O pré-estudo de validação demonstrou que o ensaio apresenta exatidão, precisão, linearidade e veracidade em conformidade no intervalo de concentrações 1,25-10µg/mL, e mostrou ser ensaio confiável para avaliar o teor de ovalbumina. A abordagem do conceito do Erro Total é ferramenta para efetuar validações que apresentam desempenho superior à abordagem clássica, que avalia os componentes de veracidade e precisão isoladamente, e é capaz de identificar deficiências na Exatidão de um bioensaio.

Palavras-chave. vacina, validação, bioensaio, erro total, ELISA.

ABSTRACT

The use of the Total Error approach for validating the analytical methods incorporates the expression of the sum of trueness and precision. This analysis also uses the Accuracy Profiles based on tolerance intervals (or prediction intervals) to determine whether a calibration model will provide quality results and to predict the control of risk in accepting an inadequate methodology. In order to evaluate the use of the Total Error, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index approaches for validating bioassays, these tools were used in the pre-study of validation of an ELISA for determining the ovalbumin contents in vaccines. And it covered the range of 33-167% of target concentration (5.0 µg/mL) and the control interval below this range (0.33-2.5%). The pre-study validation showed that this assay demonstrates complying accuracy, precision, linearity and accuracy in the concentration range of 1.25-10µg/mL and it is a reliable methodology to assess the ovalbumin contents. The Total Error approach is a validation tool that shows superior performance, when compared to the classical analysis, which assesses the trueness and precision components separately, and it is qualified to identify the deficiencies in the accuracy of a bioassay.

Keywords. vaccine, validation, bioassay, total error, ELISA.

INTRODUÇÃO

Os bioensaios, normalmente usados para estimar a potência de drogas, distinguem-se de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores-alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos oriundos da base biológica, eles tipicamente exibem maior variabilidade em relação aos testes baseados em química¹. Cada unidade experimental tem uma individualidade que confere características que diferem de uma unidade para a outra. Como consequência, uma variabilidade, por vezes importante, é observada. Além dessa variabilidade inerente às unidades experimentais, devem ser consideradas todas as outras fontes de variação: fatores imprevisíveis ou sistemáticos que não estejam sob controle (como efeito de lotes de reagente, efeito da temperatura, variação ao longo do tempo e interferências específicas)².

Sistemas de garantia da qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação e a ISO/IEC 17025³, requerem o uso de procedimentos analíticos devidamente validados. Embora seja aceito que métodos farmacopeicos não requeiram revalidação⁴, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para garantir que esses métodos sejam aplicáveis na sua utilização e pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado.

A conformidade de um dado método com os objetivos de uso é normalmente avaliada em duas fases. Primeiro uma fase de "pré-estudo" é conduzida para provar, com base em um desenho de experimento, que o método é capaz de apresentar resultados de qualidade. Então, no uso de rotina, o laboratório deve verificar se o método analítico de interesse se mantém válido ao longo do tempo e que cada corrida obtenha medidas confiáveis⁵.

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da International Conference on Harmonization (ICH)⁶, no entanto, na introdução desse guia, parte II, é declarado que "devido a sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos ou biotecnológicos, em alguns casos, podem ser abordados de forma diferente deste documento"⁷. Manter-se fiel às recomendações do ICH é inviável, especialmente no caso de produtos compostos por matrizes biológicas (vacinas e soros), e/ou de uso de ensaios biológicos ou de ambos⁸.

O ICH⁶ recomenda que para estudos de validação de ensaio de natureza quantitativa os parâmetros mais relevantes a serem avaliados são a Linearidade (habilidade, em uma dada faixa, do ensaio obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra), a Exatidão (grau de concordância entre resultados de um teste ou resultado de uma medição e o valor verdadeiro⁹) e a Precisão (grau de concordância entre resultados independentes de testes/medições, obtidos sob condições especificadas⁹).

A Norma ISO 5725¹⁰, em sua parte 1, prevê uma definição adequada para a determinação da Exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da Veracidade (grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência¹¹) e da Precisão (grau de concordância entre expectativas de um resultado de teste ou medição e um valor verdadeiro¹¹), sendo a Veracidade expressa como a Tendência (do termo inglês *bias*, diferença entre a expectativa de resultado de um teste ou medição e um valor verdadeiro, expressando o total do erro sistemático em contraste ao erro aleatório¹¹). Essa abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de "Conceito do Erro Total"⁹, desde sua publicação inicial pela comissão da "Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques" (SFSTP), tem sido difundida, já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias¹⁰.

Esse conceito se baseia na utilização de um intervalo de conteúdo- β de tolerância, inicialmente proposto por Mee¹¹ que define um intervalo que contém uma proporção esperada β de futuros resultados, seguindo a notação clássica em estatística, β representa a probabilidade de ocorrência do Erro tipo II - a probabilidade de aceitar-se a hipótese nula quando ela está errada; nesse contexto corresponderá ao erro de concluir que um resultado esteja satisfatório quando ele estiver insatisfatório¹². Essa abordagem global considera um procedimento conforme se a probabilidade de que a diferença entre cada medida de uma amostra e seu "valor verdadeiro" estiver dentro de limites de aceitação predefinidos pelo analista. O valor dos limites deve ser escolhido de acordo com o objetivo de uso dos resultados. O objetivo é ligado às normas utilizadas para o ensaio (e.g. 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc.⁹).

Na fase de pré-estudo, o procedimento de validação consiste em mensurar um conjunto de

amostras para o qual os valores nominais sejam conhecidos e organizados de acordo com um desenho de experimento ideal. O desenho deverá permitir que sejam mensurados a Veracidade e a Precisão nos diferentes valores nominais e, se necessário, prover uma decomposição da precisão global nos seus diversos componentes de variâncias (repetibilidade, entre-ensaios e entre-laboratórios⁶).

É de primordial importância ter definições claras dos parâmetros de validação diferentes para avaliar a validade deste. Também é necessário ter metodologias de acordo com essas definições e, conseqüentemente, utilizar métodos estatísticos que sejam relevantes com essas definições, com o objetivo da validação e com o objetivo do método analítico.

Vários autores têm assinalado as inconsistências entre algumas definições dos parâmetros e os procedimentos experimentais propostos para avaliá-los em documentos dedicados à validação de métodos analíticos na área farmacêutica, juntamente com os riscos e problemas ao tentar lidar com os contraditórios, e às vezes cientificamente irrelevantes, requisitos e definições. Para ensaios bioanalíticos, revisões extensas já avaliaram o problema da diferença da definição de exatidão relativa e veracidade^{10,12-16}.

Apenas quando a avaliação da exatidão dos resultados leva em conta o conceito do Erro Total, haverá garantias tanto ao laboratório quanto aos órgãos reguladores da habilidade do método em atingir seu propósito, enquanto a decisão baseada na avaliação em separado do critério de veracidade e precisão não pode atingir isto¹⁷.

O Conceito do Erro Total

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura^{2,10,19-21}. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto os aleatórios. O conceito do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Outra vantagem é que essa abordagem permite o controle do risco de aceitar-se um método impróprio enquanto prevê garantias de que os resultados das medições, que serão obtidos durante o uso futuro do método validado, estarão incluídos dentre limites de aceitação fixados de acordo com os requisitos. Esse último ponto não é apenas essencial para o analista, assim como suas conclusões e

diagnóstico são feitos em relação aos resultados obtidos. Também é uma crescente exigência das autoridades regulatórias gerenciar o risco associado ao uso desses métodos na análise de rotina^{22,23}.

Essa abordagem tem sido utilizada extensivamente para métodos físico químicos, e Findlay et al.²⁴ recomendaram seu uso para validação de imunoenaios no campo farmacêutico; Gibelin et al.² comprovaram sua utilidade em ensaios de avaliação de atividade viral em cultura de células na produção de vacinas aviárias; Dos Santos et al.²⁵ aplicaram o conceito do Erro Total na validação de um ensaio de potência para vacina viral contra poliomielite oral; e Gaudin e Laurentie²⁶ aplicaram o conceito na revalidação de um ensaio imunoenzimático anteriormente validado pela abordagem clássica.

O Perfil de Exatidão e o Índice de Exatidão

O Perfil de Exatidão é uma ferramenta para tomada de decisão para acessar a validade de um método analítico, ou seja, sua habilidade para quantificar o mais exatamente quanto possível e é obtido simplesmente através da ligação dos limites inferiores e da ligação dos limites superiores. A inclusão do Perfil de medição de erro, dentro dos limites de aceitação preestabelecidos nos níveis-chave, deve ser examinada antes de declarar que o procedimento é válido sobre um intervalo específico de valores. Derringer e Suich²⁷ e Derringer²⁸ elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, que permitem calcular um Índice denominado Índice de Exatidão. Quando aplicados aos Perfis de Exatidão, esses índices permitem aumentar a objetividade da tomada de decisão.

Estimar os parâmetros Veracidade e Precisão, variância intrasséries e variância interséries em cada nível de concentração, não é o objetivo final, mas uma etapa necessária para calcular a proporção esperada de resultados situados nos limites de aceitação¹⁹.

Cálculo da Incerteza

A incerteza de Medição é um parâmetro associado a um resultado de medição ou teste que caracteriza a dispersão dos valores que razoavelmente são atribuídos a uma particular quantidade submetida à medição ou característica submetida ao Teste⁷ e, segundo a EURACHEM²⁹, é a indicação quantitativa da qualidade dos resultados de medição, sem a qual os mesmos não poderiam ser comparados entre si, com os

valores de referência especificados ou com um padrão. No entanto, a norma ISO 17025 reconhece que, em determinados casos, a natureza do método de teste pode impedir um cálculo da incerteza de medição rigoroso, válido metrológica e estatisticamente, mas define que laboratórios de ensaio devem possuir e aplicar procedimentos para estimá-la³.

A Vacina Contra Febre Amarela

A vacina contra febre amarela é constituída de vírus "vivo" atenuado e apresentada sob a forma liofilizada. Após a reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH. A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente primário da cepa 17D, da qual, por meio de passagens em ovos embrionados de galinha SPF (Specific Pathogen Free – livre de micro-organismos patogênicos) ou em cultura de células suscetíveis, se origina o lote-semente secundário.

Quando a vacina é produzida em ovos, a ovoalbumina é um resíduo da produção e só pode estar presente em uma concentração $\leq 5 \mu\text{g}/\text{dose}$ ²⁰. A detecção é feita por um ensaio imunoenzimático (ELISA) desenvolvido em Biomanguinhos (FIOCRUZ – RJ). Ensaio imunoenzimáticos envolvem reagentes derivados de fontes biológicas e podem estar sujeitos a uma inerente variabilidade²¹.

A Ovoalbumina

A ovoalbumina está presente na clara do ovo e corresponde a 54% da proteína da clara²². É um dos principais alérgenos da clara do ovo de galinha e é frequentemente a causa de reações de hipersensibilidade a alimentos. As alergias ao ovo ocorrem em cerca de 0,5% da população e em cerca de 5% das crianças com alergias. Quantidades de proteínas do ovo encontrado na vacina contra influenza (ou seja, cerca de 0,02 a 1,0 μg por dose) são suficientes para induzir reações graves de hipersensibilidade, mas raramente fatais em crianças com alergia ao ovo²².

A proposta desta pesquisa é avaliar abordagens alternativas para validação de métodos de bioensaios quantitativos do tipo imunoenzimático, aplicando o conceito do Erro total, o Perfil de Exatidão e os Índices Globais de Conveniência com a finalidade de testar a capacidade dessas ferramentas em demonstrar a adequação de um método à finalidade de uso.

MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de avaliar a utilização do Conceito do Erro Total como ferramenta em validações de bioensaios, no presente trabalho realizamos o pré-estudo de validação do ensaio imunoenzimático (ELISA) cujo propósito de uso é a determinação do teor de ovoalbumina residual (EDTO) para vacinas contra Febre Amarela, sendo, portanto, classificado como um ensaio de determinação de impurezas.

O trabalho consistiu de diferentes etapas:

a) Pré-estudo de validação – como uma etapa necessária para aplicação do conceito do Erro Total, a construção dos Perfis de Exatidão e o cálculo do Índice de Exatidão foram determinados os seguintes parâmetros:

- Função de Resposta (relação entre a resposta instrumental e a concentração¹⁵);

- Linearidade (relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada em retorno através da curva de calibração¹⁶);

- Intervalo de Quantificação;

- Limite de Quantificação;

- Veracidade;

- Precisão (intraensaios, entre ensaios e precisão intermediária).

b) Avaliação da Exatidão do ensaio utilizando o Conceito do Erro Total para construir Perfis de Exatidão dos resultados, obtidos no modelo de regressão não linear logística de quatro parâmetros (modelo 4PL).

c) Avaliação dos perfis de Exatidão utilizando os Índices Globais de Conveniência, como descrito por Rozet et al.¹⁷, para o cálculo do Índice de Exatidão.

d) Os perfis de Exatidão foram ainda utilizados para identificar a concentração de padrão de ovoalbumina que, ao ser utilizada na elaboração da curva de calibração, obteria resultados mais exatos, comparando a concentração recomendada na Farmacopeia Brasileira²⁰ com outras concentrações do padrão utilizadas no estudo.

Amostras de Padrões

O pré-estudo de validação analisou apenas amostras de padrões diluídas ora como padrão de calibração, ora como padrões de validação em diferentes concentrações. Foi utilizado um lote de padrão de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512), preparado no laboratório, na concentração

de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que foi diluído para obter as diferentes concentrações utilizadas.

Padrão de Calibração

O padrão de calibração foi utilizado na concentração 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, como recomendado na Farmacopeia Brasileira²⁰.

Padrões de Validação

Foram utilizados padrões de validação nas concentrações 0,0156; 0,0625; 0,25; 1,25; 1,82; 5,0; 6,86 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Posteriormente, os valores de densidades óticas (OD) obtidos com as concentrações 1,25; 1,82 e 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram utilizados na construção da curva padrão para determinação das concentrações dos demais padrões de validação em função destas, com a finalidade de avaliar a concentração de padrão que renderia resultados mais exatos.

Método analítico: ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina

Os padrões de ovoalbumina de calibração e de validação foram submetidos ao EDTO. A curva padrão de ovoalbumina foi realizada com oito diluições contendo de 1,0 μg a 0,008 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A cada ensaio, o padrão de calibração e os padrões de validação foram previamente diluídos em salina tamponada com fosfatos com tween 20 e leite em pó desnatado (PBS/T20 0,05%/NFDm), visando obter as concentrações desejadas, e foram aplicados nos primeiros poços sendo diluídos, com fator dois, a partir dos segundos poços da placa até completar um total de oito diluições para cada padrão. Controles positivos e negativos (branco) foram incluídos em cada placa. A placa de 96 orifícios (MaxSorp[™], Nunc, NY, USA) foi previamente sensibilizada com anticorpos de coelho antiovalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 e bloqueada com albumina sérica bovina a 3% (p/v). A incubação foi realizada por 30 min a 37 °C. As placas foram lavadas com salina tamponada com tween 20 (PBS/T20 0,05%) e o anticorpo de coelho antiovalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) conjugado a peroxidase em PBS/T20 0,05%/NFDm foi adicionado. Foi realizada nova incubação por 30 min a 37 °C e nova lavagem. A reação foi revelada com o substrato para a peroxidase em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e foi interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A leitura das DOs foi realizada em leitor de microplacas a um comprimento de onda

bicromático de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando o modelo 4PL no software estatístico CombiStats do EDQM²⁴.

Pré-estudo de validação

Matriz de Ensaios

Com a finalidade de avaliar os parâmetros definidos, uma matriz de ensaios foi desenhada visando obter o máximo de informações de cada corrida e foi estabelecido que seriam realizadas no mínimo cinco corridas válidas ($p = 5$) com cinco concentrações do padrão ($m = 5$) em duas replicatas ($n = 2$). Foram estudados dois intervalos de doses: o Intervalo de Estudo e o Intervalo de Controle.

Intervalo de Estudo

Para o intervalo de estudo, as concentrações foram proporcionalmente espaçadas em escala logarítmica, como recomendado em USP²⁵, visando abranger a faixa de 33 a 167% da concentração alvo de 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uma vez que o limite de aceitação do teor de ovoalbumina na vacina de febre amarela são 5,0 $\mu\text{g}/\text{dose}$. As concentrações escolhidas foram 25% (1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 36,4% (1,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 100% (5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 137% (6,86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 200% (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Intervalo de Controle

Para o intervalo de controle, posteriormente, quatro ensaios adicionais ($p = 4$) com três replicatas ($n = 3$) foram realizados utilizando três concentrações ($m = 3$), abaixo do intervalo recomendado em USP²⁵, 0,31% (0,0156 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 1,25% (0,0625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 5% (0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), para testar a sensibilidade da abordagem adotada, estendendo o Intervalo de doses até o esgotamento da resposta, avaliando o comportamento do ensaio deliberadamente fora do intervalo 33-167%.

Um total de nove ensaios válidos foi utilizado no estudo, cinco do Intervalo de Estudo e quatro do Intervalo Controle.

Análise Estatística

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para cada replicata de cada concentração do padrão, para cada um dos ensaios, pelo modelo de regressão não linear logística de quatro parâmetros (modelo 4PL), utilizando o software CombiStats²⁴.

A homogeneidade dos resultados de ensaios obtidos em cada concentração foi avaliada pelo método de

Grubbs²⁶ para identificação de valores aberrantes (*outliers*). Apenas uma replicata foi identificada como valor aberrante e foi substituído pelo valor da outra replicata para permitir a realização dos cálculos, uma vez que foi adotado um modelo balanceado que necessita de um número idêntico de corridas e replicatas para cada concentração.

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total, seguindo as recomendações da SFSTP^{10,19,20,27}, e o perfil de Exatidão dos resultados obtidos no modelo 4PL nas diferentes concentrações estudadas foi construído como descrito por Rozet et al.¹⁷. Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foram empregados os Índices de Conveniência Globais, em que o Índice de Exatidão foi calculado utilizando o Índice de Intervalo, o Índice de Veracidade e o Índice de Precisão obtidos como descrito em Rozet et al.¹⁷, para tanto, uma planilha do Microsoft Excel[®] foi elaborada e validada frente aos dados do referido artigo.

Foram também comparados, através do Índice de Exatidão, os perfis de Exatidão obtidos quando os resultados foram calculados utilizando as concentrações 1,25; 1,82 e 5,0 µg.mL⁻¹ do padrão na construção da curva de calibração.

Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

O Intervalo de um bioensaio é definido como as concentrações ou potências para as quais tenha sido demonstrado que o método analítico tenha níveis satisfatórios de Veracidade e Precisão Intermediária, e o Limite Inferior de Quantificação será a menor concentração ou potência em que essas condições forem atendidas.

O Limite Inferior de Detecção foi considerado como sendo três desvios padrões acima da média do branco (controle de *background*), como recomendado em WHO²⁸.

Veracidade

A Veracidade do método, expressa pelo Erro Relativo % (ER%), foi determinada como descrito por Rozet et al.¹⁷, utilizando-se a equação 1.

$$ER\% = 100 \left(\frac{\mu - \mu_r}{\mu_r} \right)$$

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

μ = média dos resultados obtidos

μ_r = concentração nominal

Precisão

A partir das concentrações estimadas, utilizando as fórmulas clássicas dos quadrados mínimos em uma ANOVA, como descrito por Rozet et al.¹⁷, foram calculadas a variância da Repetibilidade σ_r^2 , utilizando os resultados das diferentes replicatas em cada ensaio, da Precisão entre-ensaios σ_e^2 , utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios, e da Precisão Intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios ($\sigma_e^2 + \sigma_r^2 + \sigma_i^2$), que permitiram avaliar a precisão do método pela determinação da Repetibilidade, da Precisão entre-ensaios e da Precisão Intermediária, expressas como Coeficiente de Variação percentual (CV%) obtidos através da divisão dos desvios padrões calculados pela concentração nominal $\sqrt{\sigma^2/\mu}$, nos oito níveis de concentrações, como anteriormente descrito^{8,10,17}.

Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total, segundo Rozet et al.¹⁷, foi construído um Intervalo de conteúdo- β (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) de 95%, com nível de confiança γ de 95%. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o ER% e a precisão intermediária e demonstra a exatidão do método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de $\pm 20\%$ (A, B). Quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como exato; quando não, o método não foi aceito. A Exatidão foi então demonstrada pelos Perfis de Exatidão construídos que foram avaliados pelo Índice de Exatidão.

Comparação de diferentes concentrações do padrão de calibração

Foram ainda comparados os perfis de Exatidão obtidos quando diferentes concentrações foram utilizadas para gerar a curva de calibração, visando testar a eficiência da concentração definida na Farmacopeia Brasileira²⁹ (1,0 µg.mL⁻¹) no cálculo de resultados do ensaio, frente a concentrações mais próximas à concentração alvo (5,0 µg.mL⁻¹). Estes perfis também foram analisados pelos Índices Globais de Conveniência.

Índice de Exatidão

Derringer e Suich²⁷ e Derringer²⁸ elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, que variam de 0 a 1, para aumentar a objetividade da tomada de decisão, permitindo demonstrar a qualidade geral do

método sendo validado sob o Intervalo estudado. Para tanto, foi necessário atribuir um IGC ao Intervalo de doses (I_d), à veracidade (I_v) e à precisão (I_p), os cálculos foram realizados segundo Rozet et al.¹⁷. Finalmente, para estimar a qualidade geral do método, foi calculado um Índice denominado Índice de Exatidão (I_e), que é definido como a combinação dos critérios anteriores através da obtenção da média geométrica dos três Índices.

Crítérios de aceitação da Exatidão

Para que um método de imunoenensaio seja aceito, é recomendado que a precisão intermediária (CV%) e a Veracidade (ER%) sejam ambas $\leq 20\%$ (25% no LIQ)¹⁸.

Foram computados para cada concentração estudada os intervalos de tolerância de expectativa β (IT- β) ajustados para 95%, que foram comparados aos limites de aceitação $\pm 20\%$ (λ). Os resultados obtidos no modelo 4PL foram plotados em gráficos para construir o Perfil de Exatidão. Assim, o IT- β é o intervalo em que é esperado que uma proporção de 95% dos futuros resultados esteja dentro. Portanto, os IT- β que estiverem dentro os limites de aceitação apresentam as condições para um método ser considerado válido¹⁶.

Cálculo da Incerteza

Foi realizada uma avaliação do Tipo A, utilizando o CV% intraensaios, como descrito em Health Protection Agency¹⁹. Foram calculadas a Incerteza Padrão Combinada (uc) e a Incerteza Expandida (U)

para o ensaio. A Incerteza Expandida provê um intervalo que, acredita-se, deve incluir o valor do mensurando com um alto nível de confiança sendo obtida através da multiplicação da uc pelo fator de abrangência (k). Foi utilizado $k = 2$, provendo aproximadamente 95% de nível de confiança para uma distribuição normal.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo utilizando o modelo 4PL por replicata, por dia e por concentração. Utilizando o padrão na concentração de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para construção da curva de calibração, podem ser observados na tabela 1-A, para o intervalo de concentrações de 1,25 a $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Intervalo de Estudo), e na tabela 1-B, para o intervalo de concentrações de 0,0156 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Intervalo de Controle). Os resultados de cada grupo foram submetidos ao teste de Grubbs²⁰ para verificar sua homogeneidade. Houve apenas um valor aberrante que foi substituído pelo valor da replicata para permitir a realização dos cálculos.

Esses resultados foram utilizados no pré-estudo de validação do ensaio para os cálculos dos parâmetros estudados.

Perfil de Exatidão, Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção do Perfil de Exatidão

Tabela 1. Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no Intervalo de Estudo, abrangendo as concentrações de 1,25 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) e do Intervalo Controle, abrangendo as concentrações de 0,0156 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B)

A											
CI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,25		1,82		5,00		6,86		10,00		
Replicatas	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	
Ensaio 1	1,312	1,294	1,692	1,771	4,645	4,792	6,786	6,589	9,840	9,287	
Ensaio 2	1,254	1,309	1,854	1,856	5,226	5,017	7,200	6,856	10,070	10,517	
Ensaio 3	1,222	1,236	1,676	1,744	4,806	4,686	6,623	6,202	10,316	10,686	
Ensaio 4	1,160	1,156	1,559	1,716	4,372	4,491	6,282	5,479*	9,085	8,970	
Ensaio 5	1,194	1,182	1,748	1,787	4,854	5,024	6,711	6,108	9,578	10,053	

B									
CI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0156			0,0625			0,25		
Replicatas	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3
Ensaio 1	0,022	0,021	0,020	0,071	0,075	0,071	0,255	0,273	0,277
Ensaio 2	0,022	0,021	0,022	0,072	0,084	0,090	0,346	0,335	0,299
Ensaio 3	0,027	0,026	0,030	0,098	0,088	0,061	0,337	0,303	0,458
Ensaio 4	0,024	0,024	0,024	0,086	0,089	0,088	0,283	0,290	0,284

CI = concentração introduzida; *: Valor identificado como aberrante

Possas JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.

Tabela 2. Resultados obtidos para construção do Perfil de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina

Parâmetro	Concentração introduzida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
	0,0156	0,0625	0,25	1,25	1,82	5,00	6,86	10,00
Média calculada	0,0236	0,0812	0,3116	1,2319	1,7403	4,7913	6,5639	9,8402
Tendência*	51,16	29,90	24,65	+1,45	+4,38	+4,17	+4,32	+1,60
LST (%)	97,38	70,30	59,08	9,54	7,29	7,89	7,77	12,48
LIT (%)	4,95	+10,49	+29,79	+12,44	+16,04	+16,24	+16,40	+15,67
LST ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,031	0,106	0,45	1,37	1,95	5,39	7,39	11,25
LIT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,015	0,056	0,18	1,09	1,53	4,19	5,75	8,43
CV (%) PI	20,25	17,39	22,42	5,00	4,98	5,41	5,14	6,24
Aceitação	± 20%							

LIT = Limite inferior de tolerância; LST = Limite superior de tolerância; *: Erro Relativo; CV = Coeficiente de variação; PI = Precisão intermediária.

do EDTO quando os resultados foram calculados com o modelo 4PL. Os limites de Tolerância de Expectativa β foram calculados para 95% de conteúdo e os limites de aceitação $\pm \lambda$ foram definidos como $\pm 20\%$, como preconizado por De Silva et al.³⁹ para ensaios de ligação.

A Figura 1 (a) e (b) apresenta os Perfis de Exatidão construídos com esses dados. Na Figura 1a, foram incluídas as concentrações do Intervalo de Estudo em que a Exatidão foi conforme (1,25; 1,82; 5,0; 6,86 e 10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e, para permitir uma comparação, a primeira concentração do Intervalo de Controle em que não foi mais possível quantificar a Ovoalbumina com Veracidade e Precisão (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na Figura 1b, foram inseridas as concentrações do Intervalo Controle em que não foi mais possível a detecção com Exatidão (0,0156 a 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Da mesma forma, para permitir uma comparação, foi incluída a primeira concentração do Intervalo de Estudo que apresentou Exatidão conforme (1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O Intervalo de Quantificação foi determinado como sendo [1,25 a 10,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] e o Limite Inferior de Quantificação foi a concentração 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O Limite de Detecção, determinado como a média do branco mais três vezes seu desvio padrão, indicou a concentração aproximada de 0,002 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Função de Resposta

Ao ser avaliada a Função de Resposta, através da curva de calibração, determinada para o padrão de calibração, nos nove ensaios realizados com os resultados obtidos no modelo 4PL das concentrações em função das respostas obtidas (absorbância medida em DOs), foi conforme em todas as curvas obtidas, o que pode ser avaliado pelo coeficiente de determinação r^2 maior que

0,99 em oito das nove curvas (dados não apresentados). As nove curvas foram capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta, como recomendado em FDA¹. Com a mesma finalidade, foi calculado o coeficiente de determinação entre a média das densidades óticas (Y) em função da concentração (X) em cada grupo de concentração do Intervalo de Estudo e o resultado obtido para $r^2 = 0,9892$ ($p = 0,0005$), que também descreve satisfatoriamente a relação concentração-resposta.

Linearidade

A Linearidade de um método analítico é sua capacidade, dentro de um intervalo definido, de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra¹⁸. Para tanto, um modelo linear foi ajustado para todas as concentrações calculadas com o modelo 4PL para os padrões de validação (1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de todas as séries como uma função da concentração introduzida no Intervalo de Estudo. A equação da regressão foi $y = -0,008493.x + 0,9732$ e r^2 foi 0,9916.

Também visando avaliar a Linearidade do método, o intervalo de tolerância de Expectativa- β absoluto foi aplicado. A Figura 1 (c) e (d) apresenta os perfis de linearidade obtidos no estudo, separando o Intervalo em que o método apresentou linearidade conforme, que compreende as concentrações do Intervalo de Estudo (1c), de 1,25 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, daquelas do Intervalo Controle (1d), de 0,00156 a 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em que não foi possível demonstrar resposta linear.

Índices Globais de Conveniência

Os resultados obtidos para os Índices Globais de Conveniência, quando foi incluída a primeira concentração do intervalo controle (0,25 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$),

Possas JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.

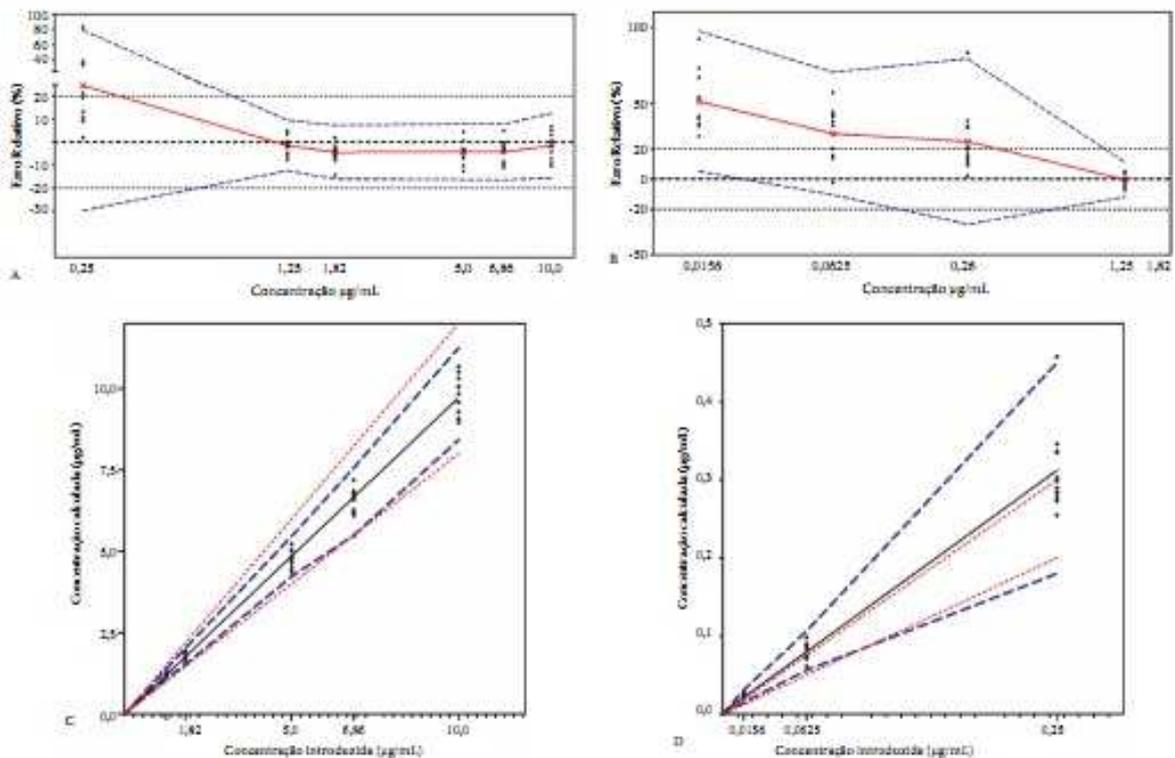


Figura 1. Perfil de Exatidão obtido contra o padrão na concentração $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a determinação do teor residual de ovalbumina, usando a curva logística de 4 parâmetros no intervalo de doses de $0,25$ a $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A) e de $0,0156$ a $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B). Visando permitir a comparação, foram incluídas a primeira concentração fora da faixa no gráfico A ($0,25 \mu\text{g}$) e a primeira concentração dentro da faixa no gráfico B ($1,25 \mu\text{g}$). A linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação $\pm 20\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95% de Expectativa de Tolerância β . Os pontos são os erros relativos % por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 20\%$), o ensaio é capaz de quantificar com Exatidão, de outra forma não. Perfis de Linearidade obtidos nos intervalos de doses de $1,25$ a $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C) e de $0,00156$ a $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D). A linha contínua representa a linha de identidade ($x = y$), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos calculados $\pm 20\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância β em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 20\%$), o ensaio é capaz de quantificar com Linearidade satisfatória, de outra forma não.

foram: Índice de Intervalo = 0,90; Índice de Veracidade = 0,80; Índice de Precisão = 0,37; o Índice de Exatidão, que é um resumo dos três anteriores, foi = 0,62. Quando foi avaliado apenas o intervalo de Estudo ($1,25$ a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram obtidos: Índice de Intervalo = 1,00; Índice de Veracidade = 0,99; Índice de Precisão = 0,37 e o Índice de Exatidão foi = 0,70.

Determinação da Incerteza de Teste

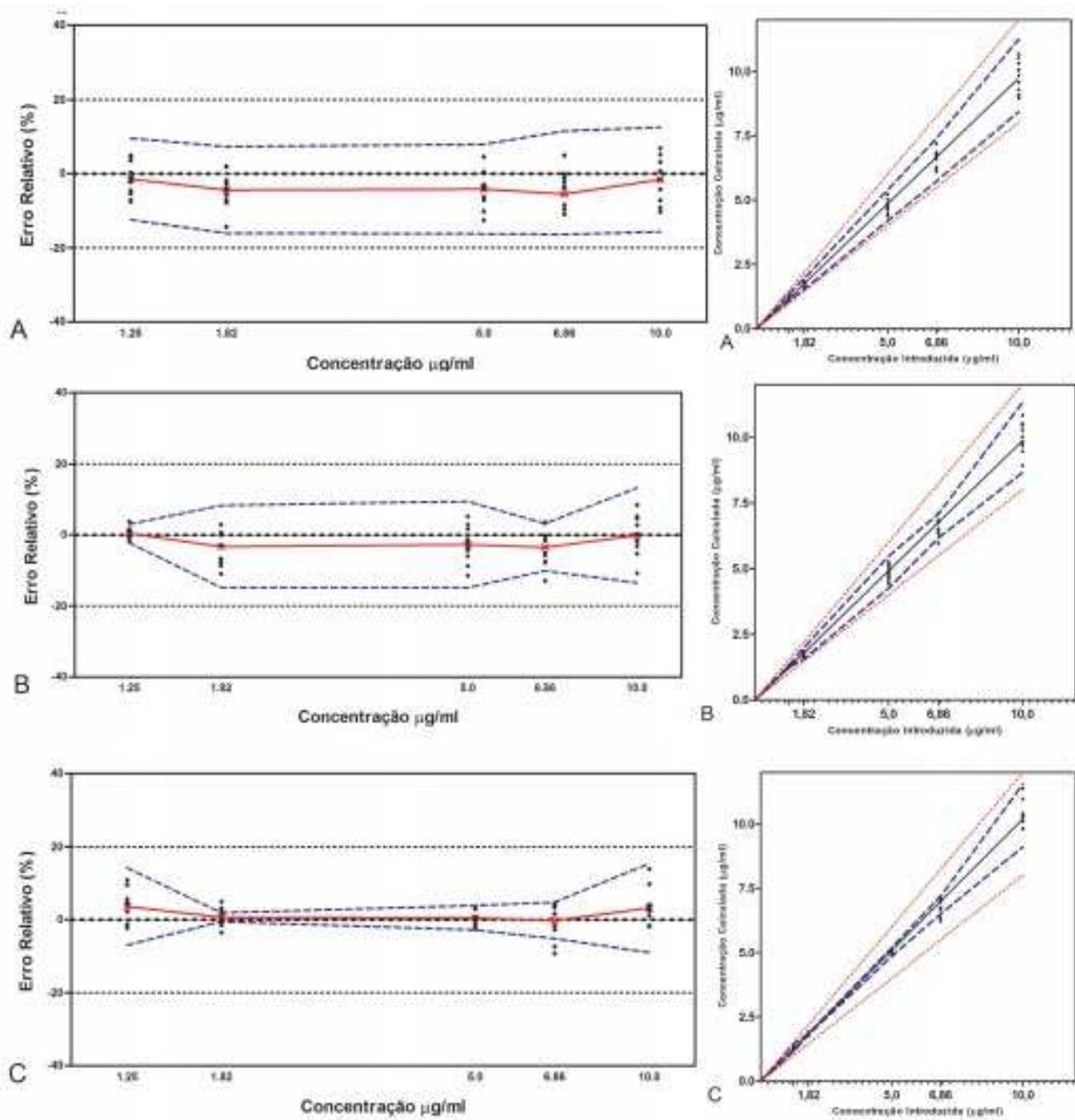
Foram calculadas as Incertezas Padrões Combinadas (uc) e as Incertezas Expandidas (U), para cada diferente nível de concentração do Intervalo de Estudo, como descrito em Health Protection Agency¹⁶.

Os valores de incertezas obtidos no Intervalo de Estudo foram os seguintes, por cada concentração: $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($uc = 0,0837$; $U = \pm 16,75$); $1,82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($uc = 0,0659$; $U = \pm 13,17$); $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($uc = 0,0146$; $U = \pm 2,92$); $6,82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($uc = 0,0298$; $U = \pm 5,97$) e $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($uc = 0,0130$; $U = \pm 2,62$).

Comparação de diferentes concentrações de padrão de calibração

A Figura 2 mostra os perfis de Exatidão obtidos quando diferentes concentrações de padrão foram utilizadas na elaboração da curva de calibração das corridas de ensaio. Os resultados obtidos com a

Possas JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.



(continua)

Poças JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.

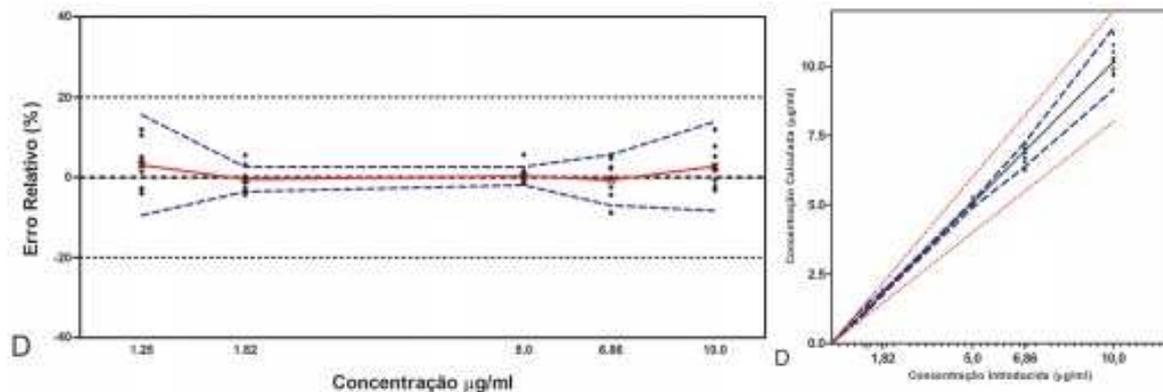


Figura 2. Perfis de Exatidão e de Linearidade obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando o modelo de 4 parâmetros no intervalo de doses de 1,25 a 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando diferentes concentrações do padrão como padrão de calibração. Em (A) = 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; em (B) = 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; em (C) = 1,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e em (D) = 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nos gráficos dos perfis de Exatidão, a linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação $\pm 20\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95% de Expectativa de Tolerância β . Os pontos são os erros relativos % por replicatas dos padrões de validação. Nos gráficos dos perfis de Linearidade, a linha contínua representa a linha de identidade ($x = y$), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos calculados $\pm 20\%$ e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância β em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ($\pm 20\%$), o ensaio é capaz de quantificar com Exatidão e/ou Linearidade satisfatória, de outra forma não.

concentração recomendada na Farmacopeia Brasileira²⁶, 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 2(A), foram comparados com os resultados obtidos utilizando as concentrações 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 2(B); 1,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 2(C) e 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 2(D). Os perfis obtidos foram então analisados pelos Índices Globais de Conveniência, que podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão: O Índice de Exatidão é um resumo dos três primeiros índices, quantificando a qualidade geral do método sendo validado sobre o Intervalo de Estudo

Índice	Concentração do padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	1,00	1,25	1,82	5,00
I_v	0,970	0,985	0,988	0,991
I_i	1,000	1,000	1,000	1,000
I_p	0,384	0,481	0,741	0,725
I_e	0,720	0,780	0,901	0,896

I_v = Índice de Veracidade; I_i = Índice de Intervalo; I_p = Índice de Precisão; I_e = Índice de Exatidão.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização do Conceito do Erro Total como ferramenta em validações de bioensaios. Para tanto, foi conduzido um pré-estudo de validação do ELISA para Detecção

do Teor de Ovalbumina residual (EDTO) em vacinas contra febre amarela. Segundo o ICH⁶, o ensaio é classificado como um ensaio do tipo II, ou seja, um teste quantitativo para determinação de impurezas, sendo preconizadas para esse tipo de ensaio as determinações de Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Limite de Quantificação, Exatidão e Robustez (recomendada apenas durante o desenvolvimento de novos ensaios⁶).

No entanto, alguns desses parâmetros geram dúvidas em sua interpretação, devido à forma como são descritos nas publicações oficiais e guias dos principais organismos internacionais (ICH, ISO, FDA, EURACHEM, VIM etc.).

Buscamos revisões apresentadas em artigos recentes que analisam criticamente as definições e fazem sugestões de como abordá-las corretamente em estudos de validações. Sendo assim, adotamos a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir o perfil de Exatidão do EDTO, como sugerido pela comissão da SFSTP^{10,18,19,27}. Para essa finalidade, foram determinados o Intervalo, Limite Inferior de Detecção, a Veracidade, a Linearidade e a Exatidão do método.

Com a experiência adquirida no Laboratório de Vacinas Virais do INCQS na utilização do Conceito do Erro Total em recente validação²⁸, aplicamos também

esse conceito na validação do EDTO. A natureza desse ensaio permitiu a construção do Perfil de Exatidão, estudando um intervalo que abrangeu de 33 a 167% da concentração alvo ($5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), como recomendado em USP²². O perfil foi construído com as Concentrações de Estudo, de 25% ($1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 200% ($10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com doses proporcionalmente espaçadas na escala logarítmica e um Intervalo Controle, deliberadamente fora do Intervalo recomendado em USP²², avaliando as concentrações de 0,31% ($0,00156 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 3% ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), visando à depleção completa da resposta com a finalidade de avaliar a sensibilidade da abordagem do Perfil de Exatidão.

Os resultados absolutos (concentração) de cada replicata, para cada concentração, de ambos intervalos de concentrações incluídos no pré-estudo de validação ($0,0156$ a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,25$ a $10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foram considerados homogêneos quando avaliados pelo teste de Grubbs²³, ocorrendo apenas um valor aberrante, uma vez que foi adotado um modelo de análise balanceado que requer números constantes de replicatas e corridas de ensaios para todas as concentrações, o valor da replicata válida foi repetido para fins de cálculos. Esses resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

Diferenciar claramente a Função de Reposta de Linearidade permite aplicar o conceito de Linearidade não apenas aos valores relativos, mas também aos valores absolutos do método, como para titulações em que os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração. Tentativas de prover uma Resposta de Função são, entretanto, sem uso e impraticáveis se não houver um sinal ou resposta; no entanto, a linearidade dos resultados poderá ser avaliada²⁴.

Rozet et al.¹⁷, ao avaliarem a Função de Reposta, consideraram satisfatórios nesse item ensaios imunoenzimáticos que apresentaram coeficientes de determinação muito próximos ao obtido em nosso estudo. O coeficiente de determinação (r^2) obtido em nosso estudo, na avaliação da Função de Resposta, descreveu satisfatoriamente a relação concentração-resposta, indicando que aproximadamente 98,9% da variabilidade eram compartilhados por x e y.

Os perfis de Linearidade, elaborados utilizando o conceito do Erro Total, utilizaram os valores absolutos obtidos nos ensaios, inseridos em gráficos com os limites de aceitação absolutos de $\pm 20\%$ calculados para cada concentração para o Intervalo de Estudo e para o

Intervalo Controle separadamente e os IT β absolutos que foram conectados, de modo semelhante ao empregado na avaliação de Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada conforme apenas quando os intervalos foram incluídos nos limites de aceitação, indicando que o método pôde quantificar com exatidão, o que se restringiu a todas as cinco concentrações do Intervalo de Estudo (25 a 200%), estando de acordo com o intervalo preconizado em USP²² para quantificação (33 a 167%). No Intervalo Controle, o método não conseguiu detectar as concentrações de forma Linear, como era esperado, isto comprova a sensibilidade da aplicação do conceito do Erro Total na validação de métodos analíticos.

A precisão do método foi conforme no Intervalo de Estudo de $1,25$ a $10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (25 a 200%), com um CV% máximo de 6,65%, variando de 5,25 a 6,65% para a precisão Intermediária. No intervalo de Controle, a precisão do método foi sensivelmente menor, atingindo dois dígitos nas três concentrações estudadas, sendo 22,42% a máxima, variando de 17,39 a 22,42%. Da mesma forma, a Veracidade foi conforme apenas no Intervalo de Estudo, sendo a Tendência (ER%) máxima obtida -4,91%, variando de -0,45 a -4,91%. No Intervalo Controle, as Tendências encontradas foram mais elevadas, sendo a máxima 51,16%, variando de 24,65 a 51,16%.

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes tendência e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas essa abordagem é inconveniente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente². Em nosso estudo, isto pode ser comprovado no Intervalo Controle, pois, se fossem aplicados apenas os limites de aceitação de 25% no LIQ como preconizado para imunoenaios do tipo ELISA²⁵, a concentração $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ teria sido aceita como conforme, pois apresentou Tendência (ER%) = 24,65% e Precisão Intermediária = 22,42%, no entanto os Perfis de Linearidade e de Exatidão demonstraram que somente a análise conjunta da Tendência (Veracidade) e Precisão foi capaz de identificar a inadequação dessas concentrações em apresentar resultados confiáveis.

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura^{10,14-20}. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto aleatórios. O conceito

do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Além disso, é uma medida única e abrangente do desempenho do método, ao invés de uma avaliação da Tendência e da variabilidade do método separadamente.

Na maioria das vezes, um procedimento analítico visa quantificar sobre um intervalo de quantidades ou concentrações. Consequentemente, durante a fase de validação, as amostras são preparadas para cobrir de forma adequada esse intervalo, e um intervalo de tolerância de expectativa- β (IT β) é calculado em cada nível. Entretanto, quando analisarmos amostras, apenas o Erro Total de sua medição pode ser levado em conta, nessa amostra. É impossível separar os Erros Sistemático e Aleatório. Uma vantagem dessa abordagem é que reflete mais diretamente o comportamento de ensaios individuais e irá resultar em menor rejeição de corridas na rotina do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da Tendência e Precisão observadas¹⁶.

O Limite Inferior de Quantificação foi 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, os IT β de 95% garantem com um erro de 5% que quando este método analítico for usado para medir uma amostra que contenha ovoalbumina nessa concentração, 95 vezes em 100 o resultado obtido estará entre 1,10 e 1,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ovoalbumina.

A Exatidão do método pôde ser demonstrada com a utilização dos perfis de Exatidão em todo Intervalo de Estudo, o que foi quantificado usando os índices descritos por Rozet et al.¹⁷, sendo o principal o Índice de Exatidão (I_e) que é um índice global de conveniência do desempenho do método e depende do Índice de Intervalo de Dose, Índice de Veracidade e Índice de Precisão. No presente estudo, para testar a sensibilidade dos Índices, incluímos os resultados da concentração 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aos cálculos do Intervalo de Estudo, obtendo assim $I_e = 0,62$. O I_e obtido para o Intervalo de Estudo foi 0,70; ligeiramente superior ao relatado por Gaudin e Laurentie²⁸, de 0,64, ao empregar esses índices na validação de um kit de ELISA para detecção de Nicarbazina residual em ovos.

Tais índices permitem quantificar o desempenho dos testes e são muito úteis quando comparações, por exemplo, de modelos de curvas de calibrações são realizadas em diferentes Perfis de Exatidão.

A curva de calibração, realizada seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira²⁰ na concentração de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não foi incluída no Perfil de Exatidão por não ter sido possível, por limitações de espaço das micropalacas, correr essa concentração em

duplicatas, o que impediu sua comparação com as demais concentrações devido ao modelo estatístico empregado, que necessita calcular a variância intraensaios. Embora não tenham sido possíveis tais comparações, essa concentração situa-se em uma zona de risco, entre a última concentração que apresentou resultados válidos (1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a primeira fora do intervalo de quantificação (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Com a finalidade de comparar o desempenho do método utilizando diferentes concentrações do padrão na elaboração da curva de calibração, os resultados foram recalculados utilizando as concentrações 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como padrão de calibração. Os resultados obtidos foram utilizados para elaborar os perfis de Exatidão, que foram comparados com o obtido com a concentração de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os perfis foram avaliados ainda com os Índices Globais de Conveniência. Foi observado que a concentração que rendeu resultados mais exatos foi 1,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, como notado nos perfis e confirmado pelo Índice de Exatidão de 0,901 obtido com essa concentração, superior aos obtidos pelas demais concentrações. O menor índice foi o obtido pela concentração recomendada de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, nossos resultados indicam que se a concentração 1,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for utilizada em lugar de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ haverá melhoria na Exatidão do método, o que deve ser confirmado na fase de validação em uso do ensaio.

CONCLUSÃO

A proposta desta pesquisa foi avaliar a utilização de abordagens alternativas para validação de um método de bioensaio quantitativo do tipo imunoenzimático, aplicando o conceito do Erro Total, o Perfil de Exatidão e os Índices de Exatidão, como descrito pela SFSTP, com a finalidade de avaliar a capacidade de essas abordagens demonstrarem a adequação do método à sua finalidade de uso. Essa abordagem permite o controle do risco de aceitar-se um método impróprio enquanto provê garantias de que os resultados das medições que serão obtidos durante o uso futuro do método validado estarão incluídos dentre limites de aceitação fixados de acordo com os requisitos.

Para tanto foi desenvolvido o pré-estudo de validação do EDTO que demonstrou que o ensaio apresenta Exatidão, Função de Resposta, Linearidade, Repetibilidade, Precisão Intermediária e Veracidade conformes e é um método confiável para avaliar o teor

Possas JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.

de ovoalbumina no Intervalo de concentrações de 1,25 a 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O que nos permitiu concluir que a abordagem de validação do Conceito do Erro Total descrita pela SFSTP é uma ferramenta eficiente para validação de bioensaios, sendo capaz de discriminar o Intervalo de concentrações em que o ensaio validado quantificou a ovoalbumina com Exatidão (Intervalo de Estudo) do Intervalo fora do limite de quantificação, em que o ensaio apresentou Exatidão e Linearidades não conformes (Intervalo Controle).

Concluimos também que os critérios de aceitação da SFSTP para o conceito do Erro Total e dos Perfis de Exatidão para validação de métodos apresentam vantagens sobre critérios baseados na estimativa de pontos para avaliar a exatidão e precisão, o que foi evidenciado ao se avaliar os resultados obtidos na concentração 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Intervalo Controle, que teria sido aceita como conforme na avaliação isolada da Veracidade e da Precisão, mas não o foi na abordagem alternativa.

Os resultados obtidos indicam ainda que a utilização da concentração 1,82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para elaborar a curva de calibração do ensaio garantirá uma melhor Exatidão na detecção de resíduos de ovoalbumina no EDTO, o que, no entanto, deve ser confirmado na fase de validação em uso do ensaio.

AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi produzido como monografia de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária; aos colegas do Departamento de Imunologia que contribuíram na realização deste trabalho; à Biomanguinhos/FIOCRUZ pelo fornecimento dos insumos para realização dos ensaios.

REFERÊNCIAS

1. US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration – FDA. Center for Biologics Evaluation and Research – CBER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville; 2001.
2. Gibelin N, Dupont D, Imbert S, Rozet E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J Chromatogr B*. 2009;877:2407-11.
3. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025:2005: Requisitos gerais para competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 2 jun 2003.
5. Boulanger B, Dewé W, Gilbert A, Govaerts B, Maumy M. Risk management for analytical methods based on the total error concept: Conciliating the objectives of the pre-study and in-study validation phases. *Chem Intell Lab Sys*. 2007;86:198-207.
6. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva; 2005.
7. ISO. International Organization for Standardization. ISO 3534-2. Statistics – Vocabulary and symbols – Part 2: Applied statistics. 2. ed. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
8. ISO. International Organization for Standardization. ISO 5725. Application of the Statistics – Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement – Part 1: General principles and definitions. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
9. Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Boulanger B, Chevalier P, Chiap P, et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques. 1997;7:169-94.
10. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36:579-86.
11. Mee RW. β -Expectation and β -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics*. 1984;26(3):251-4.
12. Feinberg M, Boulanger B, Dewé W, Hubert Ph. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem*. 2004;380:502-14.
13. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. *STP Pharm Prat*. 2003;13(3):101.
14. Hartmann C, Massart DL, McDowall RD. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *Pharm Biomed Anal*. 1994;12:1337.
15. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17:193.
16. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158:111-25.
17. Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, Prêat V, Dewé W, Boulanger B, et al. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation. Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta*. 2007;591:239-47.
18. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
19. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of

Possas JLS, Santos JE, Nascimento MC, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(4):691-705.

- quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:70-8.
20. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part III. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:82-96.
 21. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean E, Rudaz S, et al. Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. *J Chromatogr A*. 2007;1158:126-37.
 22. USA – US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration (FDA). Process Analytical Technology (PAT) Initiative. Rockville; 2004.
 23. USA – US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration (FDA). International Conference on Harmonization (ICH): Quality Risk Management (Q9). Fed. Regist. 2006;71:32105-6.
 24. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biom Anal*. 2000;21:1249-73.
 25. Dos Santos JE, Nascimento MC, Dos Santos PA, Nogueira ACA, Moura WC. Aplicação do Conceito do Erro Total na validação do ensaio de potência da Vacina Oral contra a Poliomielite. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):613-21.
 26. Gaudin V, Laurentie M. Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs. *J Chromatogr B*. 2009;877:2358-62.
 27. Derringer GC, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J Qual Tech*. 1980;12(4):214-9.
 28. Derringer GC. A balancing act: optimizing a product's properties. *Qual Progr*. 1994;51-8.
 29. EURACHEM. Citac Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. English edition. 3. ed. Praga; 2012.
 30. Brasil. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília (DF): Anvisa; 2010. v. 2. p. 1363-4.
 31. Miller KI, Bowsher RR, Celniker A, Gibbons J, Gupta S, Lee JL, et al. Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules: Summary Report. *Pharm Res*. 2001;18(9):1373-83.
 32. Li-Chan ECY, Powrie WD, Nakai S. The chemistry of eggs and egg products. In: Stadelman, WJ, Cotterill OJ, editors. *Egg Science and Technology*. 4. ed. Haworth Press: New York; 1995. p.105-75.
 33. Alpha Diagnostic International. Mouse Anti-Ovalbumin Ig. ELISA Kit Cat. N° 600-100-OGG. For Semi-Quantitative Determination of Anti-Ovalbumin Total Ig (IgG+IgA+IgM) in Biological Fluids. Instruction Manual N° M-600-100-OGG.
 34. EDQM – Council of Europe. CombiStats v.4.0.
 35. USA – United States Pharmacopoeia. 1033: Biological Assay Validation. In: USP 35 NF30. Rockville (EUA); 2012;1. Suppl:5174-85.
 36. Grubbs F. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. *Ann Math Stat*. 1969;27-58.
 37. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part IV. Examples of application. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48:760-1.
 38. WHO. World Health Organization. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. Geneva: WHO; 1997. p. 65-73.
 39. De Silva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharm Res*. 2003;20(11):1885-900.
 40. Health Protection Agency. Uncertainty of Measure in testing. National Standard Method QSOP 4 issue 5. Pais de Gales (UK); 2005.