

## 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 ovoalbumina 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 ug/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 química<sup>1</sup>. 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)<sup>2</sup>.

Sistemas de garantia da qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação e a ISO/IEC 17025<sup>3</sup>, requerem o uso de procedimentos analíticos devidamente validados. Embora seja aceito que métodos farmacopeicos não requeiram revalidação<sup>4</sup>, 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 confiáveis<sup>5</sup>.

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da International Conference on Harmonization (ICH)<sup>6</sup>, 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”<sup>5</sup>. 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 ambos<sup>2</sup>.

O ICH<sup>6</sup> 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 verdadeiro<sup>7</sup>) e a Precisão (grau de concordância entre resultados independentes de testes/medições, obtidos sob condições especificadas<sup>7</sup>).

A Norma ISO 5725<sup>8</sup>, em sua parte 1, provê 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 referência<sup>7</sup>) e da Precisão (grau de concordância entre expectativas de um resultado de teste ou medição e um valor verdadeiro<sup>7</sup>), 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 aleatório<sup>7</sup>). Essa abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”<sup>9</sup>, 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 melhorias<sup>10</sup>.

Esse conceito se baseia na utilização de um intervalo de conteúdo- $\beta$  de tolerância, inicialmente proposto por Mee<sup>11</sup> que define um intervalo que contém uma proporção esperada  $\beta$  de futuros resultados, seguindo a notação clássica em estatística,  $\beta$  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 insatisfatório<sup>12</sup>. 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.<sup>5</sup>).

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-laboratórios<sup>5</sup>).

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<sup>10,13-16</sup>.

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 isto<sup>17</sup>.

### 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<sup>2,10,16-21</sup>. 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 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. 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<sup>22,23</sup>.

Essa abordagem tem sido utilizada extensivamente para métodos físico químicos, e Findlay et al.<sup>24</sup> recomendaram seu uso para validação de imunoenaios no campo farmacêutico; Gibelin et al.<sup>2</sup> comprovaram sua utilidade em ensaios de avaliação de atividade viral em cultura de células na produção de vacinas aviárias; Dos Santos et al.<sup>25</sup> aplicaram o conceito do Erro Total na validação de um ensaio de potência para vacina viral contra poliomielite oral; e Gaudin e Laurentie<sup>26</sup> 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 Suich<sup>27</sup> e Derringer<sup>28</sup> 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 aceitação<sup>19</sup>.

### 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 Teste<sup>7</sup> e, segundo a EURACHEM<sup>29</sup>, 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-la<sup>3</sup>.

### 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  $\leq 5 \mu\text{g}/\text{dose}$ <sup>30</sup>. 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 variabilidade<sup>31</sup>.

### A Ovoalbumina

A ovoalbumina está presente na clara do ovo e corresponde a 54% da proteína da clara<sup>32</sup>. 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  $\mu\text{g}$  por dose) são suficientes para induzir reações graves de hipersensibilidade, mas raramente fatais em crianças com alergia ao ovo<sup>33</sup>.

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 concentração<sup>16</sup>);
- Linearidade (relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada em retorno através da curva de calibração<sup>16</sup>);
- 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.<sup>17</sup>, 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 Brasileira<sup>30</sup> 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  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foi diluído para obter as diferentes concentrações utilizadas.

### **Padrão de Calibração**

O padrão de calibração foi utilizado na concentração 1,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , como recomendado na Farmacopeia Brasileira<sup>30</sup>.

### **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  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Posteriormente, os valores de densidades óticas (OD) obtidos com as concentrações 1,25; 1,82 e 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  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  $\mu\text{g}$  a 0,008  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . 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 antiovoalbumina (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 antiovoalbumina (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 EDQM<sup>34</sup>.

### **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 USP<sup>35</sup>, visando abranger a faixa de 33 a 167% da concentração alvo de 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , uma vez que o limite de aceitação do teor de ovoalbumina na vacina de febre amarela são 5,0  $\mu\text{g/dose}$ . As concentrações escolhidas foram 25% (1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 36,4% (1,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 100% (5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 137% (6,86  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 200% (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### *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 USP<sup>35</sup>, 0,31% (0,0156  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 1,25% (0,0625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 5% (0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 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 CombiStats<sup>34</sup>.

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

Grubbs<sup>36</sup> 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<sup>10,19,20,37</sup>, e o perfil de Exatidão dos resultados obtidos no modelo 4PL nas diferentes concentrações estudadas foi construído como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>. 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.<sup>17</sup>, 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<sup>-1</sup> 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 WHO<sup>38</sup>.

### Veracidade

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

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

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

μ = média dos resultados obtidos

μ<sub>T</sub> = concentração nominal

### Precisão

A partir das concentrações estimadas, utilizando as fórmulas clássicas dos quadrados mínimos em uma ANOVA, como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>, foram calculadas a variância da Repetibilidade  $\sigma_i^2$ , utilizando os resultados das diferentes replicatas em cada ensaio, da Precisão entre-ensaios  $\sigma_\beta^2$ , utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios, e da Precisão Intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios ( $\sigma_{\mu}^2 = \sigma_i^2 + \sigma_\beta^2$ ), 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  $\sqrt{\sigma^2/\mu_T}$  nos oito níveis de concentrações, como anteriormente descrito<sup>8,10,17</sup>.

### Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total, segundo Rozet et al.<sup>17</sup>, 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 ± 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 Brasileira<sup>30</sup> (1,0 µg.mL<sup>-1</sup>) no cálculo de resultados do ensaio, frente a concentrações mais próximas à concentração alvo (5,0 µg.mL<sup>-1</sup>). Estes perfis também foram analisados pelos Índices Globais de Conveniência.

### Índice de Exatidão

Derringer e Suich<sup>27</sup> e Derringer<sup>28</sup> 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.<sup>17</sup>. 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.

### Critérios de aceitação da Exatidão

Para que um método de imunoensaio seja aceito, é recomendado que a precisão intermediária (CV%) e a Veracidade (ER%) sejam ambas  $\leq 20\%$  (25% no LIQ)<sup>39</sup>.

Foram computados para cada concentração estudada os intervalos de tolerância de expectativa  $\beta$  (IT- $\beta$ ) ajustados para 95%, que foram comparados aos limites de aceitação  $\pm 20\%$  ( $\lambda$ ). Os resultados obtidos no modelo 4PL foram plotados em gráficos para construir o Perfil de Exatidão. Assim, o IT- $\beta$  é o intervalo em que é esperado que uma proporção de 95% dos futuros resultados esteja dentro. Portanto, os IT- $\beta$  que estiverem dentro os limites de aceitação apresentam as condições para um método ser considerado válido<sup>16</sup>.

### Cálculo da Incerteza

Foi realizada uma avaliação do Tipo A, utilizando o CV% intraensaios, como descrito em Health Protection Agency<sup>40</sup>. 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 Grubbs<sup>36</sup> 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

**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	79,08	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	5,73	8,43
CV (%) PI	20,25	17,39	22,42	5,00	4,98	5,41	5,14	6,24
Aceitação	$\pm 20\%$							

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  $\beta$  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.<sup>39</sup> 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 FDA<sup>1</sup>. 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.

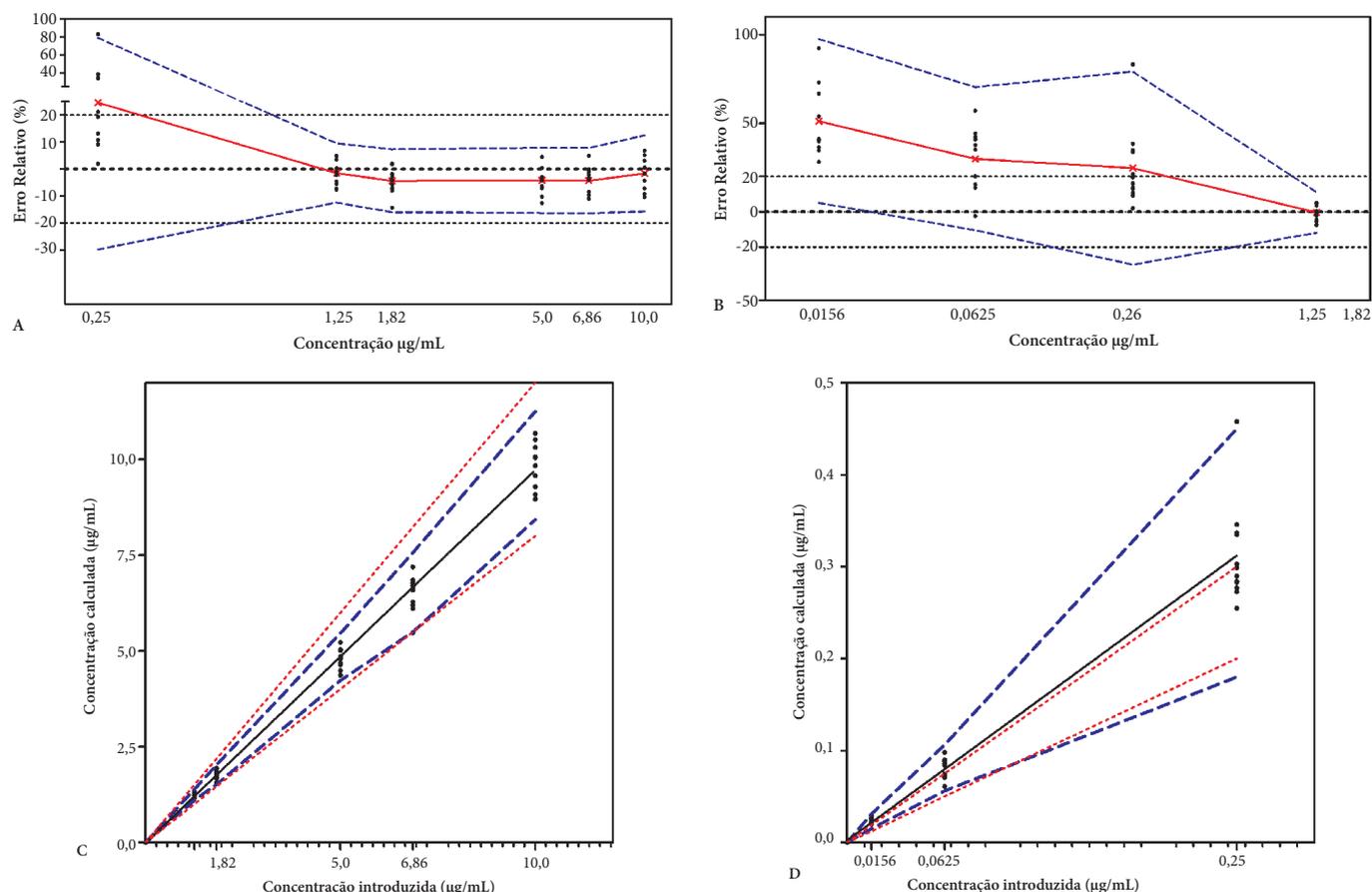
### Linearidade

A Linearidade de um método analítico é sua capacidade, dentro de um intervalo definido, de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra<sup>16</sup>. 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- $\beta$  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  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ),



**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  $\beta$ . 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  $\beta$  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.

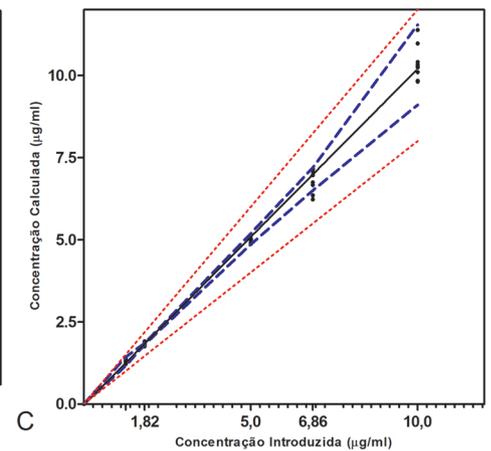
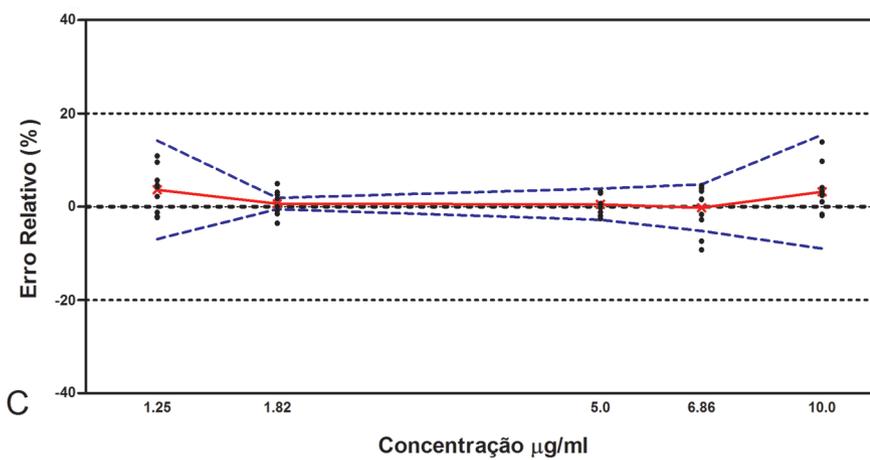
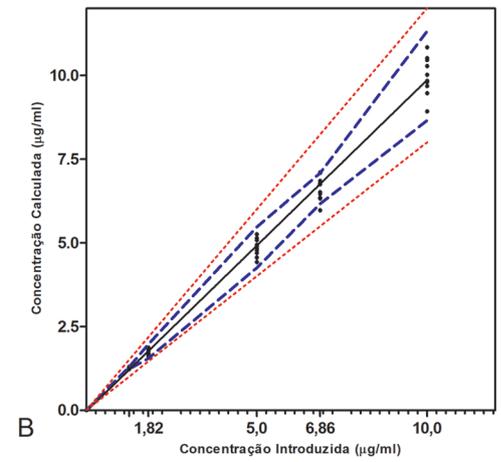
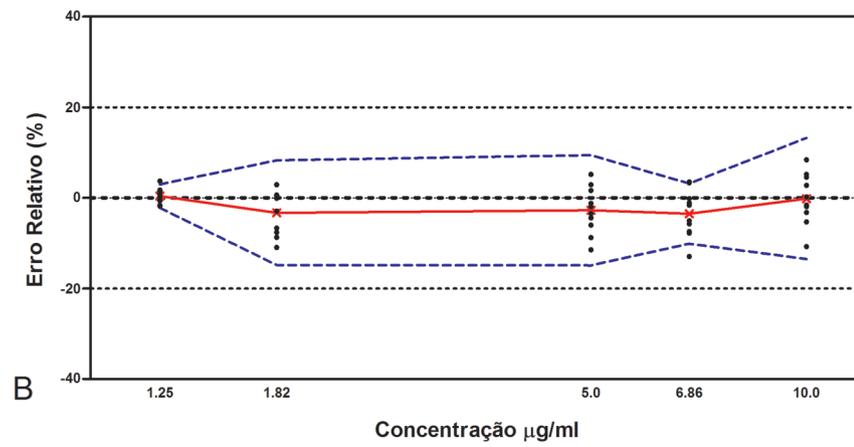
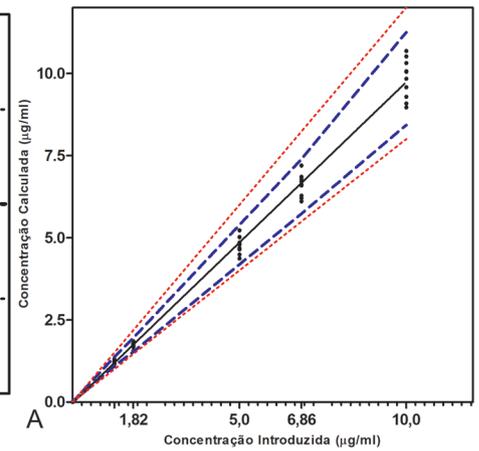
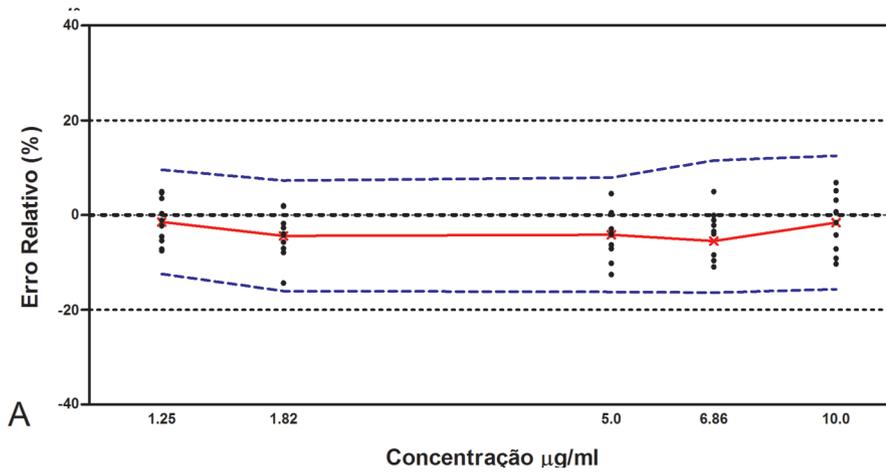
### Determinação da Incerteza de Teste

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 Agency<sup>40</sup>.

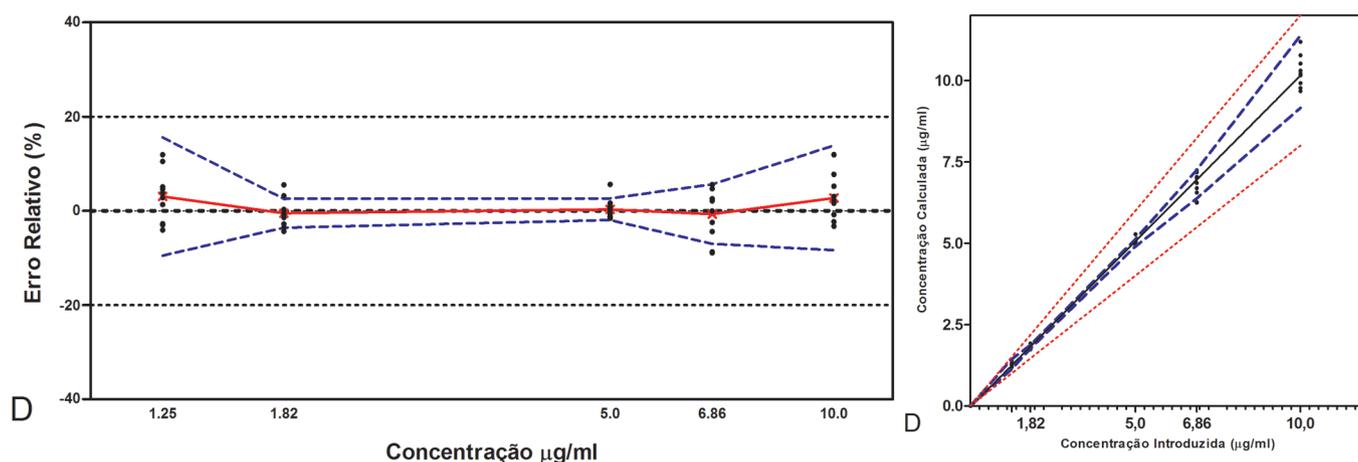
Os valores de incertezas obtidos no Intervalo de Estudo foram os seguintes, por cada concentração:  $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0837$ ;  $U = \pm 16,75$ );  $1,82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0659$ ;  $U = \pm 13,17$ );  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc =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



(continua)



**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  $\beta$ . 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  $\beta$  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 Brasileira<sup>28</sup>, 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 ICH<sup>6</sup>, 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 ensaios<sup>4</sup>).

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<sup>10,18,19,37</sup>. 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 validação<sup>25</sup>, 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 USP<sup>35</sup>. 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 USP<sup>35</sup>, avaliando as concentrações de 0,31% ( $0,00156 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a 5% ( $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 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 Grubbs<sup>36</sup>, 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 Resposta 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 avaliada<sup>16</sup>.

Rozet et al.<sup>17</sup>, ao avaliarem a Função de Resposta, 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  $IT\beta$  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 USP<sup>32</sup> 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 componente<sup>2</sup>. 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 ELISA<sup>39</sup>, 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<sup>10,16-20</sup>. 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- $\beta$  (IT $\beta$ ) 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 observadas<sup>16</sup>.

O Limite Inferior de Quantificação foi 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , os IT $\beta$  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.<sup>17</sup>, 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 Laurentie<sup>26</sup>, 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 Brasileira<sup>30</sup> 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 microplacas, 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

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 estimação 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.  $\beta$ -Expectation and  $\beta$ -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, Prétat 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

- 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 KJ, 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. País de Gales (UK); 2005.