

Validação de ensaio imunoenzimático utilizando-se o Conceito do Erro Total, os Perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão como alternativa à abordagem clássica do ICH

Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay by using the Total Error Concept, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index as alternatives to the traditional ICH approach

RIALA6/1667

Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Eduardo de Bonis de BRITTO, Antônio Eugênio Castro Cardoso de ALMEIDA, Wlamir Corrêa de MOURA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865-5130. E-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br

Recebido: 23.06.2015 - Aceito para publicação: 29.12.2015

RESUMO

O uso do conceito do Erro Total em validação de métodos analíticos é uma abordagem que incorpora a soma da veracidade e precisão. Este método utiliza ainda Perfis de Exatidão baseados em intervalos de tolerância para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade, e realiza o controle do risco de aceitar uma metodologia imprópria. Foram aplicados o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão na validação de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinar o teor residual de ovoalbumina em vacinas. Este estudo testou uma amostra pura e fortificada com três diferentes concentrações (baixa, média e alta). A abordagem foi usada também para avaliar o método de cálculos que renderia resultados mais exatos. Os resultados obtidos no intervalo de concentrações testado com o modelo de cálculos escolhido foram: veracidade - ER% de 1,61 % a 12,15 %; precisão intermediária - CV% de 6,91 % a 9,31 % e o Erro Total de 9,83 % a 19,07 %, obtendo-se dados em conformidade com os guias internacionais. O estudo demonstrou que o método empregado é confiável para avaliar o teor de ovoalbumina, e que a abordagem do Conceito do Erro Total apresenta aplicabilidade na validação de ensaios imunoenzimáticos.

Palavras-chave. validação, imunoensaio, erro total, perfis de exatidão, índices de exatidão, ELISA.

ABSTRACT

The use of Total Error Concept for validating analytical methods is an approach that incorporates the sum of the Trueness and the Precision. This method also uses the accuracy profiles based on the tolerance intervals for whether a calibration model will give the quality results and it enables to control the risk in accepting an inappropriate methodology. The Total Error Concept, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index were applied in this study for validating an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the residual contents of ovalbumin in vaccines. This study tested a pure vaccine sample and spiked with three different concentrations (low, medium and high). Also an approach was used for evaluating the calculations methods which would yield the most accurate results. The obtained results in the concentrations range tested with the chosen model were: Trueness - ER% from 1.61 % to 12.15 %; intermediate precision - CV% from 6.91 % to 9.31 %; and the Total Error from 9.83 % to 19.07 %, which are in conformity with the international guides. This study showed that the method is reliable to evaluate the ovalbumin contents, and that the Total Error Concept approach has applicability for validating enzyme immunoassays.

Keywords. validation, immunoassay, total error, accuracy profile, accuracy index, ELISA.

INTRODUÇÃO

A Febre Amarela é a febre viral hemorrágica original, uma sepse viral pansistêmica apresentando virêmia, febre, prostração, injúrias hepáticas, renais e miocárdicas, hemorragia, choque e alta letalidade¹. O nome da doença se deve à icterícia que afeta alguns pacientes, causada pelas severas injúrias hepáticas².

É estimado que ocorram 200.000 casos de Febre Amarela causando 30.000 mortes, a cada ano mundialmente, 90 % dos casos acontecendo na África. O vírus é endêmico em áreas tropicais da África e América Latina². A doença não ocorre na Ásia e países do Pacífico mesmo com a presença do vetor do ciclo urbano, o mosquito *Aedes aegypt*, o que ainda não é completamente entendido³.

A vacinação é a medida de maior importância na prevenção da Febre Amarela. Em áreas de alto risco onde a cobertura vacinal é baixa, o pronto reconhecimento e controle de surtos, usando a imunização, são fundamentais para conter epidemias².

No Brasil, a vacina contra Febre Amarela é produzida com vírus atenuado. É adotado o sistema de lote semente primário da cepa vacinal 17D, por meio de passagens em ovos de galinha SPF (Specific Pathogen Free – Livre de Patógenos Específicos) embrionados para obter o lote semente secundário⁴.

A ovoalbumina, que corresponde a mais de 50 % das proteínas presentes na clara do ovo, é um resíduo da produção capaz de induzir reações em indivíduos alérgicos, devendo ser verificado seu teor. A Farmacopeia Brasileira⁴ descreve o método imunoenzimático de detecção e estabelece o limite $\leq 5,0 \mu\text{g/dose}$. No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o Laboratório Nacional de Controle, a quantificação de ovoalbumina residual é feita usando o ensaio imunoenzimático (ELISA), desenvolvido por Biomanguinhos (FIOCRUZ - RJ)⁴. O ELISA para Detecção do Teor de Ovoalbumina (EDTO) é do tipo sanduíche, utilizando anticorpos de captura e conjugado à peroxidase, que são reagentes derivados de fontes biológicas.

Validação

A implementação de sistemas de acreditação de laboratórios de análise, com base na norma ISO 17.025⁵, é no presente uma realidade. Dois requisitos fundamentais figuram na parte 5 da ISO 17.025⁵: a definição de procedimentos para validar métodos e estimar a incerteza de medição⁶.

Na indústria farmacêutica, validações de métodos analíticos seguem o guia ICH Q2(R1)⁷, onde é definido como objetivo principal deste tipo de estudo demonstrar que o método analítico é apropriado ao uso a que se destina. Entretanto, este guia faz a ressalva de que métodos analíticos utilizados em produtos biológicos e biotecnológicos podem ser validados, em alguns casos, com abordagens diferentes das descritas naquele guia. Isto se deve ao fato de ser difícil seguir o guia ICH⁷, especialmente no caso de produtos derivados de matrizes biológicas (soros e vacinas), e/ou usando ensaios biológicos ou de ambos⁸.

No entanto, a norma ISO 17.025⁵, adotada no INCQS, só considera necessária a validação de métodos normalizados quando tenham sofrido modificações. Por esta razão, após a adoção de alguns desvios na técnica descrita na Farmacopéia Brasileira⁴, o EDTO foi submetido a um pré-estudo de validação no INCQS, utilizando a abordagem do Erro Total, demonstrando sua relevância e precisão apropriadas ao objetivo de uso e a confiabilidade da aplicação da abordagem alternativa de validação do Conceito do Erro Total. O estudo foi descrito por Possas et al⁹.

Conceito do Erro Total e Perfis de Exatidão

A abordagem do Erro Total se baseia na construção de perfis de exatidão como descrito pela “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP)¹⁰⁻¹³ e tem sido amplamente discutida¹⁴. Em 2003, a “American Association of Pharmaceutical Scientists” (AAPS) recomendou sua utilização na validação de ensaios de ligação de macromoléculas¹⁵. A partir de 2012, a “European Medicines Agency” (EMA) implementou as normas para validação de métodos bioanalíticos que incluem a abordagem do Erro Total¹⁶ e o

FDA publicou, em 2013, uma revisão de seu guia para validação de métodos bioanalíticos¹⁷, incorporando a abordagem do Erro Total¹⁸, embora ainda não tenha sido implementada. Apesar destes guias serem focados em métodos bioanalíticos para medir a concentração de drogas em matrizes biológicas obtidas em estudos clínicos ou toxicológicos, eles contêm orientações úteis sobre algumas questões fundamentais e definições no domínio das validações de ensaios do tipo imunoenzimáticos aplicáveis à área de controle da qualidade para liberação de lotes^{16,18}.

O princípio básico dos perfis de exatidão consiste em combinar figuras de mérito, obtidas em condições de precisão intermediária, e limites de tolerância de expectativa β em uma ilustração gráfica que permite tomar uma decisão sobre a validade do método⁶.

Em resumo, a abordagem do Erro Total e dos perfis de exatidão consiste de: a) construir um intervalo bicaudal com limites de tolerância de expectativa β (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) com o nível de confiança desejado γ (por exemplo, 95 %); b) comparar o intervalo (LI, LS) com os limites de aceitação adotados (A, B); c) se (LI, LS) estiverem completamente dentro (A, B), o método é aceito; caso contrário, o método não é aceito.

O ICH⁷ recomenda que os parâmetros mais relevantes para validação de métodos quantitativos são linearidade (do inglês *linearity* - habilidade, dentro um dado intervalo, de obter resultados de teste que sejam diretamente proporcionais à quantidade de analito nas amostras⁷) e exatidão (do Inglês *accuracy* - grau de concordância entre um resultado de teste ou resultado de medição e o valor verdadeiro¹⁹).

Escolha do modelo estatístico de cálculo de resultados de ensaio

Uma fonte significativa de variabilidade nas curvas de calibração pode ser proveniente do modelo estatístico utilizado para o ajuste da curva, portanto, é extremamente importante a escolha de um modelo apropriado para este cálculo²⁰. Alguns autores^{10,21} introduziram

o uso do perfil de exatidão baseado nos intervalos de tolerância para decidir se um modelo de calibração obterá resultados de qualidade²².

Definições dos parâmetros de validação

É importante ressaltar que tem sido incentivado no meio científico a adoção das definições do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)²³, no entanto este vocabulário é direcionado às medições de grandezas. Ao se trabalhar com testes como um ELISA, que medem características, uma alternativa mais apropriada é a adoção das definições da norma ISO 3534-2¹⁹, guia que incorpora definições que abrangem tanto medições (de grandezas), quanto testes (de características).

Também há divergências entre as definições de importantes parâmetros de validação em diferentes normas e áreas científicas^{22,24}. A veracidade, precisão e a exatidão são três termos fundamentais como parâmetros de validação de métodos analíticos. A veracidade (do inglês *trueness*) é o grau de concordância entre a expectativa de um resultado de teste/medição e um valor verdadeiro¹⁶. A medida da veracidade é normalmente expressa em termos de tendência (do inglês *bias*), sendo a diferença entre a expectativa de um resultado de teste/medição e um valor verdadeiro, é o erro sistemático total em contraste com o erro aleatório¹⁹. A precisão (do inglês *precision*) é definida como o grau de concordância entre resultados de testes/medições independentes, obtidos em condições estipuladas (repetibilidade, entre ensaios, precisão intermediária, reprodutibilidade). A medida da precisão é normalmente expressa em termos de imprecisão e calculada como desvio padrão (e.g. coeficiente de variação) dos resultados dos testes/medições. Depende apenas da distribuição dos erros aleatórios e não se relaciona com o valor verdadeiro¹⁹. A exatidão dos resultados do método (do inglês *accuracy*), grau de concordância entre o resultado do teste/medição e o valor verdadeiro¹⁹, por conseguinte, refere-se a um erro total de medição²⁵, determinado pela combinação da veracidade e da precisão²⁶.

Validação em uso

O presente trabalho tem a finalidade de confirmar a aplicabilidade do conceito do Erro Total e dos perfis de exatidão, avaliados pelo índice de exatidão, como alternativa à abordagem pontual recomendada pelo ICH na validação de métodos analíticos. Para tanto, dá continuidade ao processo de validação do EDTO anteriormente avaliado em um pré-estudo de validação⁹, agora na fase de validação em uso do ensaio. Um avanço em relação ao pré-estudo foi a adoção de características e critérios de aceitação para validação preconizados pela EMA¹⁶, específicos para ensaios bioanalíticos do tipo ensaios de ligação, categoria que abrange os imunoenaios. Esta norma oficial não estava em vigor no período da realização do pré-estudo de validação. Dentre as principais características de um método bioanalítico preconizadas pela EMA¹⁶ essenciais para garantir a aceitabilidade do desempenho e da confiabilidade dos resultados analíticos, as que se aplicam ao EDTO são: seletividade, curva de calibração (função de resposta), intervalo de quantificação, limite inferior de quantificação, veracidade e precisão.

O estudo de validação em uso foi desenvolvido em duas etapas:

a) Avaliação do método estatístico de cálculos de resultados capaz de prover resultados mais exatos, onde foram avaliados a regressão logística de quatro parâmetros (4PL), a regressão logística de cinco parâmetros (5PL) e o modelo de linhas paralelas (PAR), pelo uso dos perfis de exatidão e do índice de exatidão como descrito anteriormente por Possas et al⁹.

b) Usando os resultados obtidos no modelo escolhido para os cálculos de resultados, foram determinados os seguintes parâmetros recomendados em EMA¹⁶ para ensaios imunoenzimáticos: veracidade; precisão (repetibilidade, inter-ensaios e precisão intermediária); linearidade; intervalo de quantificação; limites de quantificação avaliados como descrito por Possas et al⁹; curva de calibração e seletividade foram avaliados como recomendado em USA^{17,18,27}, respectivamente.

Faz-se necessário ressaltar algumas

diferenças metodológicas entre o presente estudo, a validação em uso, e o pré-estudo de validação⁹: algumas abordagens na fase de validação em uso foram adotadas em consequência dos resultados do pré-estudo⁹, como a concentração 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o padrão de calibração. Na fase de pré-estudo foram usados apenas padrões de calibração e padrões de validação (diluídos em PBS) e as concentrações foram expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na fase de validação em uso, foram testados o padrão de calibração e uma amostra de vacina ora pura, ora fortificada com três concentrações de ovoalbumina (amostras de validação) e as concentrações destas foram expressas em $\mu\text{g.0,5 mL}^{-1}$, volume da dose da vacina. Na fase de pré-estudo a versão do programa de computador utilizado para cálculo de resultados não incluía o modelo de cálculos 5PL que foi incorporado à nova versão lançada em 2013, o que permitiu a comparação dos três modelos na fase de validação em uso. No entanto, na realização do pré-estudo, foi realizada uma comparação dos resultados utilizando os dois modelos disponíveis 4PL e PAR que não foi incluída na publicação, servindo apenas para embasar a escolha do modelo adotado naquela fase, o 4PL.

Outro avanço em relação ao pré-estudo foi a adoção de características e critérios de aceitação para validação preconizados pela EMA¹⁶, específicos para ensaios bioanalíticos do tipo ensaios de ligação, categoria que abrange os ELISAs. Esta norma oficial não estava em vigor no período da realização do pré-estudo de validação.

Em relação ao pré-estudo, o cálculo da incerteza também foi modificado para uma abordagem mais abrangente, incorporando em sua determinação os dados de Veracidade e Precisão Intermediária obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrão de Calibração

Para o ajuste da curva de calibração uma solução estoque padrão de calibração de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512, pó liofilizado, $\geq 98\%$) na concentração de

100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (p/v) foi preparada e diluída em água destilada a 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (p/v).

Amostras de validação

Na fase de validação em uso, foi testado um único lote de vacina contra febre amarela. A cada ensaio, foi testada a amostra pura paralelamente à mesma amostra deliberadamente fortificada (“spiked”) com três concentrações de ovoalbumina. O conjunto de amostras pura (doravante referida como 0,18 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$, teor médio determinado em três ensaios prévios) e fortificadas, foi denominado “amostras de validação”. Para fortificação das amostras, foi utilizada a solução estoque padrão de ovoalbumina diluída na amostra de vacina para obter as seguintes concentrações em relação ao limite de aceitação do teor de ovoalbumina de 5,0 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$: baixa = 25 % (1,25 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$), Média = 100 % (5,0 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$), e Alta = 300 % (15 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$). Na prática, foram usadas alíquotas arredondadas e foi aplicada uma correção a estas concentrações para efeito de cálculo, os valores assumidos foram: 0,18; 1,26; 5,05 e 14,9 $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$.

Método analítico: ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina

Os padrões de calibração de ovoalbumina e amostras de validação foram submetidos ao EDTO como descrito por Possas et al⁹, exceto onde mencionado. A curva padrão de ovoalbumina foi elaborada com oito diluições contendo de 0,2 μg a 0,0016 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A cada ensaio, o padrão de calibração e as amostras de validação foram pré diluídas visando obter as concentrações desejadas. Como no ensaio de rotina, foram diluídos a 1/10 e aplicados nos primeiros poços, sendo diluídos com fator dois a partir dos segundos poços da placa até completar um total de oito diluições para o padrão e para cada amostra. Controles positivos e negativos (branco) foram incluídos em cada placa. A leitura das Densidades Óticas (DOs) foi feita em leitor de microplacas (VersaMax - Molecular Devices, Califórnia, EUA) a um comprimento de onda bicromático de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando os modelos 4PL, 5PL e

PAR no software estatístico CombiStats[®] do EDQM²⁸.

Desenho do estudo - 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. Foram realizadas cinco corridas válidas ($p = 5$) com amostras de um mesmo lote de vacina contra febre amarela, fortificadas com três concentrações de padrão de ovoalbumina mais a amostra pura ($m = 4$) em placas duplicatas ($n = 2$). Visando incluir concentrações pura, baixa, média e alta. A amostra de vacina pura serviu para determinar a diferença entre o teor original (média dos resultados de todos os ensaios) e o recuperado nas amostras fortificadas. Um total de 40 resultados foi obtido nesta etapa.

Posteriormente, foram realizados quatro ensaios para avaliação da seletividade como recomendado em USA²⁷ onde foram testados uma amostra de vacina e o padrão de ovoalbumina (2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): a) como padrão de calibração diluído em PBS, b) como padrão de validação também diluído em PBS, c) como padrão de validação utilizando a amostra de vacina como diluente (matriz). Um total de 20 resultados foi obtido nesta etapa.

Análise Estatística

Escolha do modelo de cálculos usando o conceito do Erro Total

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para as duplicatas de placa e concentrações dos ensaios pelos métodos de 4PL, 5PL e PAR, utilizando o programa de computador CombiStats^{®28}, versão 5, visando determinar qual destes modelos rende resultados mais exatos.

Posteriormente, os resultados obtidos com o modelo escolhido foram utilizados para calcular os demais parâmetros de validação definidos.

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP¹⁰⁻¹³ e o perfil de exatidão dos resultados obtidos com os três modelos de curva nas diferentes concentrações estudadas, construído

como descrito por Rozet et al²⁵. Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foi empregado o índice de exatidão²⁵, 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 GraphPad Prism[®] (San Diego, Califórnia, EUA).

Veracidade

A veracidade do método, expressa como a tendência em Erro Relativo % (ER%), foi determinada como descrito por Rozet et al²⁵, utilizando 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_T = concentração nominal

Precisão

A partir das concentrações estimadas, utilizando uma ANOVA como descrito por Rozet et al²⁵, foram calculadas a variância da repetibilidade ($\sigma_i^2 \sigma_i^2$), utilizando os resultados das diferentes replicatas em cada ensaio; da precisão entre-ensaios ($\sigma_e^2 \sigma_e^2$), utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios e da precisão intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios ($\sigma_{IP}^2 = \sigma_i^2 + \sigma_e^2$), 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 por divisão dos desvios padrões calculados pela concentração nominal ($(\sqrt{\sigma^2})/\mu_T$) nos quatro níveis de concentrações como anteriormente descrito por Hubert et al¹⁰ e por Rozet et al²⁵.

Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total,

foi construído um Intervalo de Tolerância de Expectativa- β , com nível de confiança γ de 95 %. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o ER% e a precisão intermediária e apresenta a exatidão dos resultados obtidos no 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 apresentando resultados exatos; quando não, o método foi rejeitado. A exatidão foi então analisada pelos perfis de exatidão construídos e avaliados pelo índice de exatidão.

Índice de exatidão

Derringer e Suich²⁹ e Derringer³⁰ elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, variando de 0 a 1, para aumentar a objetividade da tomada de decisão permitindo avaliar 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 feitos segundo Rozet et al²⁵. 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 obtido 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 Limite Inferior de Quantificação - LIQ)¹⁶ e o Erro Total $\leq 30\%$ (40 % no LIQ)¹⁶.

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 nos três modelos de cálculos foram plotados em gráficos para construir o perfil de exatidão. Assim, o IT- β é o intervalo que contém uma proporção de 95 % dos futuros resultados.

Determinação dos Parâmetros de Validação

Uma vez escolhido o modelo de cálculos que rende resultados mais exatos, foram calculados os demais parâmetros de validação.

Seletividade

Para produtos associados a matrizes complexas, seletividade (às vezes referida como especificidade) envolve a comprovação da ausência de interferência dos componentes da matriz ou a presença daqueles relacionados ao produto. Isto pode ser avaliado pela diluição paralela do padrão com e sem a presença dos componentes potencialmente interferentes. Se as curvas forem similares e os resultados estiverem de acordo com o esperado para uma comparação de padrão-com-padrão, o ensaio é específico para o componente. Para esta finalidade tanto os resultados quanto a similaridade devem ser avaliados usando testes de equivalência apropriados²⁷.

Para avaliar a seletividade do método foram analisados paralelamente, em quatro ensaios adicionais, um padrão de calibração (2,0 µg.mL⁻¹), um padrão de validação (idêntico ao anterior, 2,0 µg.mL⁻¹), uma amostra de vacina e um padrão diluído em amostras de vacina (2,0 µg.mL⁻¹). O ER% obtido para os padrões de validação e para o padrão diluído em amostra de vacina (subtraído o valor obtido para a amostra de vacina) deve ser $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ no LIQ). Para avaliar a equivalência das curvas de calibração foram comparadas as inclinações obtidas para cada padrão testado.

Curva de Calibração (Função de Resposta)

É a relação entre a resposta instrumental e a concentração¹⁷. Foi avaliada pela curva de calibração, determinada para o padrão de calibração nos ensaios realizados, avaliando as concentrações introduzidas em função das respostas obtidas (absorbância medida em Densidades Óticas - DOs). As curvas devem ser capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta¹⁷. Serão comparados os parâmetros coeficiente de determinação (r^2) e inclinação (Hill Slope) de cada curva obtida.

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 $\pm 20\%$ ¹⁶. A Linearidade foi analisada utilizando os perfis de linearidade para avaliar o método. Foram considerados os valores absolutos obtidos nos ensaios, para determinar qual o intervalo em que seria possível obter resposta linear utilizando o método.

Intervalo e Limite Inferior de Quantificação

O Intervalo de um ensaio é definido como as concentrações ou potências para as quais tenha sido confirmado que o método analítico tenha níveis conformes de veracidade e precisão intermediária e o limite inferior de quantificação será a menor concentração ou potência em que estas condições forem atendidas.

Cálculo da Incerteza

É o parâmetro associado ao resultado da medição ou ao resultado do teste, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à quantidade particular sujeita à medição ou a característica sujeita a teste¹⁹. Foi realizada uma avaliação do Tipo A, a partir de uma série de observações repetidas, utilizando métodos estatísticos. Foram utilizados os resultados da precisão intermediária e da Tendência dos resultados obtidos com o modelo escolhido. Foram calculadas a Incerteza padrão combinada (u_c) e a incerteza expandida (U) com um fator de abrangência (k) igual a 2, próximo ao intervalo de 95 % de confiança. Os cálculos foram realizados como descrito pelo Nordtest Project³¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada no presente estudo a eficácia do uso do conceito do Erro Total e dos perfis de exatidão, avaliados pelo índice de exatidão na validação de métodos analíticos,

como alternativa à abordagem pontual recomendada pelo ICH. Para tanto foi realizada a validação em uso de um imunoenensaio, o EDTO em vacinas contra febre amarela dando continuidade ao processo iniciado com o pré-estudo de validação descrito por Possas et al⁹.

O estudo de validação em uso incorporou mudanças metodológicas em relação ao pré-estudo de validação⁹, como descrito na introdução. Assim, foi aplicada a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir os perfis de exatidão do EDTO, como descrito pela comissão da SFSTP^{10-13,25}. Em uma primeira etapa, para selecionar o modelo de ajuste de curvas que rendia resultados mais exatos, foram avaliados os modelos 4PL, 5PL e PAR utilizando os perfis de exatidão e os índices de exatidão calculados a partir dos parâmetros veracidade e precisão, combinados para demonstrar a exatidão dos resultados. O modelo 5PL apresentou os resultados mais exatos e foi o escolhido. Em uma segunda etapa, foram utilizados os resultados obtidos com o modelo 5PL para avaliar as demais características recomendadas em EMA¹⁶ para validação de ensaios bioanalíticos do tipo imunoenzimáticos: linearidade, intervalo de quantificação, limite inferior de quantificação, curva de calibração e seletividade.

De acordo com a ISO 17.025⁵, validação não pode simplesmente ser a caracterização do método em termos de valores de mérito, ou seja, apenas calcular um desvio padrão de repetibilidade não quer dizer que o método esteja válido. Esses dados são úteis, mas devem confrontar o objetivo do método⁶. A utilização do critério do Erro Total, que incorpora a avaliação simultânea dos erros sistemáticos e aleatórios, é uma abordagem estatística e cientificamente lógica.

Os guias de validação de métodos bioanalíticos da EMA¹⁶ e do FDA¹⁸ incorporam a abordagem do Erro Total com especificações para este parâmetro para os diferentes tipos de ensaios, destacando a relevância desta abordagem alternativa em validações de ensaios desta natureza. No entanto, esses documentos utilizam o termo “exatidão”, como no guia ICH⁷,

em lugar do termo veracidade, como definido pela ISO²⁶, expressando o Erro Total como a soma da “exatidão” e da precisão. No documento do FDA¹⁸, é feita a ressalva de que o termo Exatidão é às vezes substituído pelo termo veracidade em algumas normas.

Uma busca na base de dados PubMed por estudos de validação de ELISAs, publicados nos últimos 10 anos, revelou 736 artigos. Usando os termos “Accuracy profile” e “Total Error” foram encontrados 34 e 55 artigos, respectivamente e finalmente usando os termos “Immunoassay” e “Total Error”, aparecem 29 artigos. Um levantamento na base Scielo encontrou apenas quatro (Validação e ELISA) e dois (Validação e Ensaio). No Laboratório de Vacinas Virais do INQCS, foi aplicada a abordagem do Erro Total em validações de ensaios biológicos³² e imunoenzimáticos⁹. Os números revelam a relevância de estudos de validação no cenário científico internacional e a escassez de publicações destes estudos em periódicos nacionais.

Escolha do modelo de cálculo usando o conceito do Erro Total

Uma fonte significativa de variabilidade nas curvas de calibração pode ser proveniente do modelo estatístico utilizado para o ajuste, portanto, é extremamente importante a escolha de um modelo apropriado para este cálculo²⁰. 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 após 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.

O controle estatístico de processo realizado com as inclinações da curva de calibração demonstrou que as curvas obtidas em cada placa replicata foram válidas e estavam sob controle (dados não apresentados). Os resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

Tabela 1. Resultados calculados para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,18 a 14,9 $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$	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 $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$	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 $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$	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

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção dos Perfis de Exatidão do EDTO quando os resultados foram calculados com o ajuste de curva logística de 4PL, curva logística de 5PL e modelo de PAR. Os limites de tolerância de expectativa β (relativos e absolutos) foram calculados para 95 % de conteúdo e os limites de aceitação $\pm \lambda$ foram definidos como ± 30 % como preconizado para o Erro Total de ensaios de ligação¹⁶.

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) estavam

todos respectivamente dentro ± 20 % e foram ≤ 20 %, critérios de aceitação recomendados para estes parâmetros avaliados individualmente¹⁶. O Erro Total variou de 9,83 % no modelo 5PL a 31,09 % no PAR.

No pré-estudo de validação do EDTO, foi obtido o valor máximo de tendência (ER%) = -4,91 % (amplitude -0,45 a -4,91 %) e de precisão intermediária, o CV% máximo de 6,65% (amplitude de 5,25 a 6,65%). Os resultados obtidos no presente estudo para veracidade e precisão intermediária, embora satisfatórios em relação aos critérios de aceitação, apresentaram valores superiores aos da fase de pré-estudo,

Tabela 2. Resultados obtidos para construção dos Perfis de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina por modelo de cálculo: A – Curva Logística de 4 parâmetros; B - curva Logística de 5 parâmetros; C – Modelo de Linhas Paralelas

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 absolutos em $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$

provavelmente devido a um efeito da matriz de componentes biológicos do produto, uma vez que na fase de pré-estudo foram testados apenas padrões de validação diluídos em PBS e não amostras fortificadas. No entanto, tal efeito não foi significativo e não interferiu na seletividade do método, apresentando-se conforme com os critérios de aceitação adotados para este parâmetro²⁷.

Os parâmetros veracidade (ER%) e precisão intermediária (%CV) foram combinados na escolha do melhor modelo de ajuste para cálculo dos resultados (4PL, 5PL e PAR) utilizando a construção dos perfis de exatidão.

A Figura 1 - A, B e C apresenta os perfis de exatidão construídos. Em A, foram inseridos os resultados obtidos com 4PL, em B os resultados de 5PL e em C utilizando PAR. Os perfis de exatidão comprovaram que os modelos de ajuste de 4PL e 5PL descreveram a relação concentração-resposta com exatidão em todo intervalo de concentrações estudado.

Índices de Exatidão

Para avaliar objetivamente os perfis de exatidão foram calculados os índices globais de conveniência e combinados no índice de exatidão para cada modelo de cálculo utilizado. Os resultados foram: índice de precisão (4PL=0,26; 5PL=0,43 e PAR=0,07); índice de intervalo (4PL=1,00; 5PL=1,00 e PAR=0,14); índice de veracidade (4PL=1,00; 5PL=0,89 e PAR=0,59) e a combinação dos três, o índice de exatidão (4PL=0,635; 5PL=0,723 e PAR=0,179).

O índice de exatidão mais elevado apresentado pelo modelo 5PL (0,723) indicou ser este o modelo de cálculos que permitiu obter resultados mais exatos. Baseado nestes resultados, o 5PL foi o modelo de cálculos escolhido.

A escolha do modelo de cálculos utilizando os perfis de exatidão, que permitem quantificar o desempenho destes modelos, comprova a importância da validação, uma vez que na análise de rotina as concentrações do analito nas amostras são desconhecidas e não podem ser comparadas a um valor verdadeiro. A escolha de um modelo inadequado, como se mostrou o PAR, pode levar o laboratório a emitir resultados inexatos.

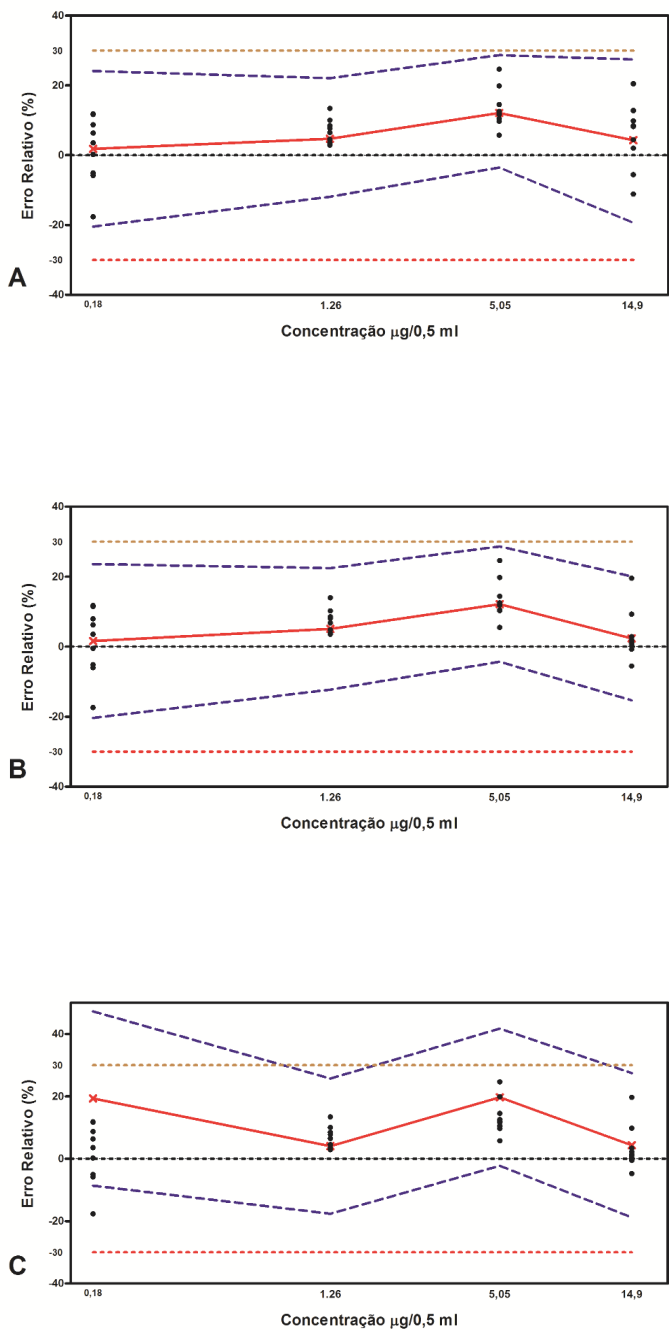


Figura 1. Perfis de Exatidão obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL (A), 5PL (B) e PAR (C) no intervalo de doses de 0,18 a 14,9 µg/0,5 mL⁻¹. A linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação ± 30 % e as linhas tracejadas 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 (± 30 %)

O I_E obtido no pré-estudo de validação do EDTO⁹ utilizando a 4PL foi 0,70, próximo aos obtidos pelos modelos 4PL e 5PL. Gaudin e Laurentie¹⁴ relataram I_E de 0,64 ao empregar estes índices na validação de um kit de ELISA para detecção de Nicarbazina residual em ovos.

Parâmetros de validação determinados com o modelo 5PL

Uma vez escolhido o modelo 5PL como o que produziu os resultados mais exatos, foram calculados os demais parâmetros de validação recomendados em EMA¹⁶. O resumo dos resultados é apresentado na Tabela 3. Na determinação da veracidade o ER % variou de 1,61 % a 12,15 %; o CV % para avaliação da precisão intermediária variou de 6,91 % a 9,31 % e o Erro Total de 9,83 % a 19,07 %. Boemer et al³⁵ aplicaram pela primeira vez os perfis de exatidão baseados em intervalos de tolerância na medição do Erro Total em um ELISA para quantificação dos níveis de Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) em amostras de sangue seco de recém-nascidos, fixando os limites de aceitação em ± 30, como no presente estudo. Myler et al³⁶ reportaram a validação em uso de um ELISA sanduíche para quantificação de uma proteína de fusão em pacientes de transplantes renais e hepáticos, relataram veracidade e precisão conformes, obtendo: ER% entre -4 e 4 %, CV % ≤ 13 % e Erro Total entre 6-15 %. Cullen et al³⁷, na validação de um ELISA, reportaram precisão inter-ensaios com CV % ≤ 12,1 % e ER % ≤ 10,9 %, o Erro Total do ensaio foi ≤ 23 %. A repetibilidade do ensaio na concentração de padrão de validação “alta” foi CV % ≤ 5,5 %. De Bock et al³⁸ descreveram a validação de um ELISA para detecção de citocromo 3A4 em microsomas hepáticos humanos, onde quantidades entre 2 e 300 pmol.mg⁻¹ de proteína microsomal puderam ser quantificados usando o modelo 5PL com fator de ponderação 1/x. Os CV % de repetibilidade e entre-ensaios ficaram entre 9,54 e 13,98 %, e entre 10,51 e 14,55 %, respectivamente. O ER % variou entre -5,96 e 6,68 %, e o Erro Total entre 11,93 e 21,23 %. Laurentie e Gaudin³⁹ relataram ER % = 2,0 % e CV % de precisão intermediária = 13,8 s%, na validação de um ELISA para detecção de Sulfametazina em leite, quando o modelo 5PL foi utilizado.

Os resultados relatados por todos estes autores são concordantes com os obtidos no presente estudo para veracidade, precisão e Erro Total, utilizando o modelo 5PL.

Seletividade

A análise de variância dos 20 resultados obtidos nos quatro ensaios para avaliação

da seletividade ($p = 0,071$) demonstrou a homogeneidade dos resultados. Todos os valores de ER% estavam no intervalo $\pm 20\%$ e a análise de variância das inclinações das curvas obtidas para os padrões de calibração, validação e padrão diluído em amostras ($p = 0,7345$) demonstrou a equivalência das inclinações. Portanto o método apresenta seletividade conforme para a ovoalbumina.

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos com o modelo 5PL na validação em uso do ensaio para determinação do teor residual de ovoalbumina em vacinas e critérios de aceitação adotados

Parâmetro	Resultados/conclusão	Critério de Aceitação
Seletividade	Amplitude do ER% (-17,95 a 11,06 %) Conclusão = Conforme	O ER% deve ser $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ no LIQ) da concentração nominal fortificada tanto em diluente quanto em amostra ²⁷
Veracidade	Amplitude do ER% = 1,61 a 12,15 % Conclusão = Conforme	ER%* $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ no LIQ e LSQ) ¹⁶
Repetibilidade	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) ¹⁶
Precisão Entre ensaios	Amplitude CV% = 0,00 a 6,49 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) ¹⁶
Precisão Intermediária	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ($\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) ¹⁶
Exatidão (Erro Total)	0,18 = [-20,47; 24,13] 1,26 = [-12,62; 22,06] 5,0 = [-4,48; 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) ¹⁶ Os limites de tolerância de expectativa β relativos devem estar incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$) ²⁵
Curva de Calibração	R > 0,98 nas 10 curvas de calibração realizadas. Conclusão = Conforme	Equação mais simples que descreve a função ¹⁷
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 $\pm 20\%$ ¹⁶ e limites de tolerância de expectativa β absolutos devem estar incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$) ²⁵
Intervalo de Quantificação	0,18 a 14,9 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Intervalo que apresentou resultados com Exatidão conforme ¹⁶
Limite Inferior de Quantificação	0,18 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Menor concentração no Intervalo que apresentou resultados com Exatidão conforme ¹⁶

Curva de Calibração (Função de Resposta)

A função de resposta foi avaliada pela curva de calibração, determinada para o padrão de calibração, considerando as concentrações introduzidas em função das respostas obtidas (absorbância medida em DOs). A avaliação das 10 diferentes curvas de calibração por cada replicata nos cinco ensaios realizados quando foi ajustada a regressão linear simples do logaritmo das concentrações (diluições) em função do logaritmo das respostas obtidas (absorbâncias), tendo todas as curvas sido satisfatórias, o que pode ser percebido pelo valor de R maior que 0,98. Todas as curvas foram capazes de descrever adequadamente a relação concentração-resposta, como recomendado em USA^{17,18}. A similaridade entre as inclinações obtidas nas 10 curvas foi comprovada pelo teste F ($p = 0,7374$), o que indica não haver diferença estatística significativa entre os valores.

Linearidade

Diferenciar claramente a curva de calibração (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 onde os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração²².

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 $\pm 20\%$ ¹⁶.

As médias e os intervalos de aceitação $\pm 20\%$ por concentração foram: 0,18 = 0,183 (0,144 a 0,216); 1,26 = 1,324 (1,01 a 1,51); 5,05 = 5,66 (4,04 a 6,06) e 14,9 = 15,25 (11,2 a 17,88). O coeficiente de correlação entre as concentrações introduzidas e concentrações calculadas foi 0,999 ($p = 0,0006$), equação: $Y = 1,022X + 0,1431$. O teste de desvio de linearidade ($p = 1,0$) indicou relação linear perfeita entre as concentrações introduzidas e as concentrações calculadas.

Também visando avaliar a linearidade,

o intervalo de tolerância de expectativa- β absoluto foi aplicado para construir a Figura 2 que apresenta os perfis de linearidade obtidos no estudo pelo modelo de ajuste 5PL que compreende as concentrações de 0,18 a 14,9 $\mu\text{g} \cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$. Neste caso, os limites de tolerância de expectativa β absolutos devem estar incluídos nos limites de aceitação ($\pm 30\%$)²⁵.

Na avaliação da linearidade, como recomendado pelo EMA¹⁶ todas as concentrações calculadas apresentaram valores das concentrações fortificadas $\pm 20\%$, confirmando a relação linear do ensaio. Também foi elaborado o perfil de linearidade aplicando o conceito do Erro Total que 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. Os IT β absolutos foram conectados, de modo semelhante ao empregado

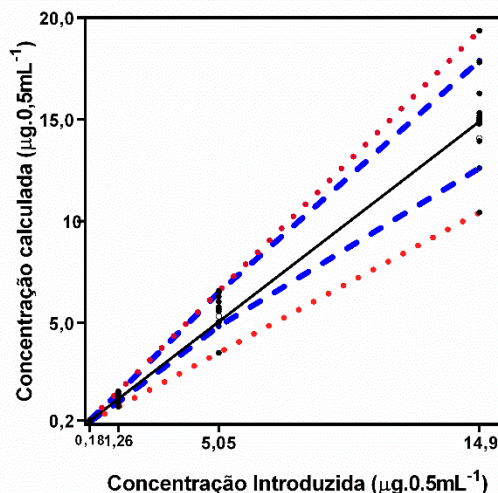


Figura 2. Perfis de Linearidade obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva; 5PL como modelo de cálculos no intervalo de doses de 0,18 a 14,9 $\mu\text{g} \cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$

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

na avaliação da Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada conforme no modelo 5PL.

O limite inferior de quantificação foi $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$, a menor concentração incluída no estudo onde foi possível quantificar a ovoalbumina com exatidão. Este resultado é comparável ao obtido no pré-estudo de validação, uma vez que naquele estudo os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o LIQ foi a concentração $1,25 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ a menor concentração do intervalo de estudo capaz de ser quantificada com exatidão e na concentração abaixo $0,25 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$, no intervalo de controle não foi mais possível fazê-lo. Corrigindo a expressão para $\mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$, temos as concentrações $0,625 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ e $0,125 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ respectivamente. A concentração $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ está entre as duas concentrações e no presente estudo, em relação às demais concentrações estudadas, apresentou perda da precisão, como esperado no LIQ, embora a tendência tenha sido equivalente.

Cálculo da Incerteza

Foram calculadas as incertezas padrão combinada (u_c) e incerteza expandida (U) a partir dos valores determinados para a precisão intermediária e para a tendência para os resultados obtidos com o modelo 5PL para cada diferente nível de concentração do Intervalo estudado. As incertezas determinadas foram: $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ ($u_c = 4,93 \%$; $U = 9,86 \%$); $1,26 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ ($u_c = 6,26 \%$; $U = 12,52 \%$); $5,05 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ ($u_c = 12,63 \%$; $U = 25,27 \%$) e $14,9 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ ($u_c = 4,42 \%$; $U = 8,83 \%$).

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes veracidade e precisão separadamente, mas esta abordagem é pouco eficiente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente³³.

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura^{10-13,25,33}. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos (veracidade) quanto aleatórios (precisão).

Uma vantagem desta abordagem é refletir mais diretamente o comportamento de ensaios individuais, o que resultará em menor rejeição de corridas em uso, do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da tendência e precisão observadas²². O reconhecimento do valor do Erro Total em validações foi consolidado com as publicações de guias internacionais que incorporam esta abordagem em validações de métodos bioanalíticos como a AAPS¹⁵, SFSTP^{10-13,25}, EMA¹⁶ e FDA¹⁸.

CONCLUSÃO

O estudo confirma a aplicabilidade do conceito do Erro Total e dos Perfis de Exatidão para validação de métodos, apresentando vantagens sobre abordagens baseadas na estimação de pontos para avaliar a Veracidade e Precisão, principalmente na validação de ensaios bioanalíticos do tipo imunoenzimáticos. 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 permite concluir que o ensaio apresenta – seletividade, veracidade, repetibilidade, precisão entre-ensaios, precisão intermediária, exatidão, curva de calibração e linearidade conformes no intervalo de $0,18$ a $14,9 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$, e é um método confiável para avaliar o teor de ovoalbumina.

AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi produzido como dissertação de conclusão do Curso de Mestrado 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. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:11-20.
2. WHO, Yellow fever; Fact sheet N°100. Updated March 2014.
3. Monath TP. The absence of yellow fever in Asia—cause for concern? *Virus Inf Exch Newsl South East Asia West Pac*. 1989;6:106-7.
4. Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
5. ABNT NBR ISO/IEC. 17025:2005: Requisitos gerais para competência Técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
6. Feinberg M, Laurentie M. A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred Qual Assur*. 2006;11:3-9. [DOI:10.1007/s00769-005-0081-9].
7. 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.
8. 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*. 2009;877:2407-11. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.010].
9. 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*. 2012;71(4):691-705.
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. 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;45:70-78.
12. 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.
13. 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;48:760-71. [DOI: 10.1016/j.jpba.2008.07.018].
14. 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2358-62. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.021].
15. 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):1885-1900.
16. European Medicine Agency - EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
17. USA, 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; draft; 2001.
18. USA, U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration - FDA/CDER. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation - draft; 2013.

19. International Organization for Standardization. ISO 3534-2, Statistics — Vocabulary and symbols - Part 2: Applied statistics. 2nd ed. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 2006.
20. Cox KL, Devanarayan, V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay Methods. *In*: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2014. Disponível em [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>].
21. Hoffman D, Kringle R. Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models. *J Biopharm Stat*; 2005(5):283–93.
22. 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(1-2):111–125.
23. 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.
24. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J Chromatogr A*. 2007;1158:174–83.
25. Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, Pr at V, Dew  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.
26. 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. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 1994.
27. United States Pharmacopoeia – USP. <1033> Biological Assay Validation. 2010.
28. EDQM – Council of Europe. CombiStats v5.0, www.combistats.eu.
29. Derringer GC, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J Qual Tech*. 1980;12(4): 214-219.
30. Derringer GC. A balancing act: optimizing a product’s properties. *Qual Progr*, 1994;51-58.
31. Nordtest project. 1589-02. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Version 3.1. May 2012. Disponível em: [www.nordtest.info].
32. 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.
33. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
34. Boulanger B, Dew  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. [DOI:10.1016/j.chemolab.2006.06.008].
35. Boemer F, Bours V, Schoos R, Hubert P, Rozet E. Analytical validation based on total error measurement and cut-off interpretation of a neonatal screening TSH-immunoassay. *J Chromatogr B*. 2009;877(23):2412-7. [DOI:10.1016/j.jchromb.2008.11.004].
36. Myler HA, Phillips KR, Dong H, Tabler E, Shaikh M, Coats V et al. Validation and life-cycle management of a quantitative ligand-binding assay for the measurement of Nulojix(®), a CTLA-4-Fc fusion protein, in renal and liver transplant patients. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1215-26. [DOI: 10.4155/bio.12.79].

37. Cullen VC, Fredenburg RA, Evans C, Conliffe PR, Solomon ME. Development and advanced validation of an optimized method for the quantitation of A β 42 in human cerebrospinal fluid. *AAPS J*. 2012;14(3):510-8. [DOI: 10.1208/s12248-012-9360-7].
38. De Bock LI, Colin P, Boussery K, Van Bocxlaer J. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of cytochrome 3A4 in human liver microsomes. *Talanta*. 2012;15(99):357-62. [DOI: 10.1016/j.talanta.2012.05.064].
39. Layrentie M, Gaudin V. Use of the total error approach to evaluate the performance of a semi-quantitative immunological method (BIAcore method) for detecting sulfamethazine in bovine milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2375-9. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.069].
40. Possas JLS: 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 de mestrado profissional]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2014.