

**JORGE LUIZ DOS SANTOS POSSAS**

**PRÉ VALIDAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE OVOALBUMINA NA  
VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**

**PPGVS / INCQS  
FIOCRUZ  
2012**

# PRÉ VALIDAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE OVOALBUMINA NA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA

**Jorge Luiz dos Santos Possas**

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de  
Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância  
Sanitária.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Wlamir Corrêa de Moura

Rio de Janeiro  
2012

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Pré validação do ensaio imunoenzimático para quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela

Jorge Luiz dos Santos Possas

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Prof. Antônio Eugênio de Almeida

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Prof.<sup>a</sup> Lúcia Maria Corrêa Werneck

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Prof.<sup>a</sup> Clarice Lima do Canto Abreu

Orientador: \_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Prof. Wlamir Corrêa de Moura

Rio de Janeiro

2012

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

Possas, Jorge Luiz do Santos

Pré-validação do ensaio imunoenzimático de quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela / Jorge Luiz dos Santos Possas. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

48 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados a Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Wlamir Corrêa de Moura

1. Vacina. 2. Febre Amarela. 3. Técnicas Imunoenzimáticas. 4. Albuminas. I. Título.

Título em inglês: Pre validation of the Enzyme Linked Immunoassay for quantification of Ovalbumin content in yellow fever vaccine

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo.

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

Ao meu chefe MSc. Jarbas Emílio dos Santos, pela confiança depositada.

À chefia do Departamento de Imunologia pela consideração e apoio.

Aos colegas do LVV-I, por todo apoio e carinho, em especial à Michelle Cardoso do Nascimento e Deivid Wanderson C. dos Anjos.

Aos colegas do LID pela solidariedade e ensinamentos.

Aos amigos do Departamento de Imunologia que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Ao meu amigo e compadre MSc. Reginaldo Assad Miller pela oportunidade de fazer parte desta Instituição.

À direção do INCQS, pela confiança e apoio a este trabalho.

Aos colegas e professores da turma de especialização/2011 pelo carinho e atenção dedicados.

## RESUMO

Sistemas de garantia da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação e a ISO/IEC 17025 requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Validação é o processo pelo qual a confiabilidade, uma medida objetiva da reprodutibilidade intra e inter-laboratorial, e a sua relevância são avaliadas com o objetivo de dar suporte a um uso específico. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependerão das condições sob as quais o teste será usado e os propósitos para os quais seus resultados serão aplicados. Na prática, o objetivo da validação é dar ao laboratório assim como às autoridades, garantia de que cada resultado que será obtido na rotina estará suficientemente próximo ao valor “real” desconhecido da amostra. Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes bias e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas esta abordagem é inconveniente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente. O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura e é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora a expressão da soma da veracidade (ou bias) e da precisão (ou desvio padrão). Este método utiliza ainda o uso do Perfil de Exatidão baseado em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade. No presente trabalho aplicamos e avaliamos o uso do Conceito do Erro Total, dos perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na validação de um ELISA para determinação do teor de ovoalbumina em vacinas contra febre amarela, utilizando o intervalo de concentrações preconizado na literatura específica de 33 a 167% da concentração alvo (5µg/ml) e um intervalo controle bem abaixo desta faixa (0,33 a 2,5%). O conceito do Erro Total apresentou sensibilidade satisfatória e foi capaz de identificar o desempenho insatisfatório da técnica nas concentrações controle fora da faixa de quantificação. A pré-validação do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina demonstrou que o ensaio apresenta satisfatórias - exatidão, repetitividade, precisão intermediária e veracidade, é um método confiável e conveniente para avaliar o teor de ovalbumina.

Palavras-chave: vacina, febre amarela, técnicas imunoenzimáticas, albumina

## ABSTRACTS

Quality assurance systems such as Good Manufacturing Practices and ISO/IEC 17025 require the use of properly validated analytical procedures. Validation is the process by which the reliability, an objective measure of intra and inter-laboratory reproducibility, and their relevance are evaluated in order to support a specific use. The levels of reliability and relevance required will depend on the conditions under which the test will be used and the purposes for which their results will be applied. In practice, the purpose of validation is to give to the laboratory and to the authorities, insurance that each result will be obtained in routine will be sufficiently close to "real" value of the unknown sample. The classical methods of validation and quality control assess the magnitude of the bias and precision components separately (t-test and chi-square in validation or control charts in routine), but this approach is inconvenient, because a very small values of a component will not compensate for the failure of another component. The use of confidence intervals and / or Total Error in validation of methods have been discussed or proposed in the literature and is a statistical and evidence-based approach that incorporates the expression of the sum of the Trueness (or bias) and Precision (or standard deviation). This method also uses the use of Accuracy Profile based on tolerance intervals (or prediction intervals) to decide whether a calibration model gives quality results. In this work we apply and evaluate the use of the concept of Total Error, the of Accuracy Profiles and Precision Indices in the validation of an ELISA for ovalbumin content determination in yellow fever vaccines, using the concentration range recommended in the specific literature 33 to 167% of target concentration (5µg/ml) and a control range of very lower content (0.33 to 2.5%). The concept of Total Error showed satisfactory sensitivity and was able to identify the unsatisfactory performance of the control concentrations outside the range of quantification. The pre-validation of the ELISA to detect the content of ovalbumin showed that the test has satisfactory - accuracy, repeatability, intermediate precision and trueness, is a convenient and reliable method to assess the level of Ovalbumin.

Keywords: vaccine, yellow fever, immunoenzymatic techniques, albumin

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Função de Resposta do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina Residual quando o logaritimo da (média+1) das opacidades densimétricas é plotado contra o Logaritimo da concentração em  $\mu\text{g/ml}$ .....33
- Gráfico 2 – Perfil de Exatidão obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL no intervalo de doses de 0,25 a 10,0  $\mu\text{g/ml}$  e de 0,0156 a 1,25  $\mu\text{g/ml}$ .....35
- Gráfico 3 – Perfil de Linearidade obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL no intervalo de doses de 1,25 a 10,0  $\mu\text{g/ml}$  e de 0,0156 a 0,25 10,0  $\mu\text{g/ml}$ .....37



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vantagens da utilização do ELISA.....	4
Figura 2 – Microplaca de titulação com 96 orifícios.....	6
Figura 3 – Esquema da realização do ELISA.....	7
Figura 4 – Representação esquemática de um perfil de exatidão.....	23

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Esquema de diluições para preparação das concentrações do padrão.....	25
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 1,25 a 10 µg/ml.....	32
Tabela 2 – Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,0156 a 0,25 µg/ml.....	33
Tabela 3 – Resultados das curvas de calibração dos dez ensaios obtidas com o ajuste de curva logística de quatro parâmetros das absorbâncias em função do logaritmo da concentração (diluições) do padrão de calibração.....	33
Tabela 4 – Média das absorbâncias em opacidades densimétricas para cada concentração introduzida.....	33
Tabela 5 – Resultados obtidos para construção do Perfil de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina.....	34
Tabela 6 – Resumo dos resultados da pré-validação do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina.....	36
Tabela 7 – Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão.....	38
Tabela 8 – Resultados das Incertezas de Medição relativas à Determinação do Teor de Ovoalbumina Residual para cada nível de concentração investigado na pré-validação.....	38

## SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu_T$  – Valor de referência

$\bar{x}_i$  – Valor médio

$S_I^2$  = Variância intra ensaios

$S_E^2$  = Variância entre ensaios

$S_T^2$  = Variância Total

$\pm\lambda$  – Limites de aceitação

4PL – Curva logística de quatro parâmetros

5PL – Curva logística de cinco parâmetros

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPFc – Boas Práticas de Fabricação correntes

CV% – Coeficiente de Variação percentual

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare

EDTO – ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina

EIA – Enzyme Immunoassay

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER% – Erro Relativo Percentual

FDA – Food and Drug Administration

ICH – International Conference on Harmonization

IGC – Índice global de conveniência

I<sub>V</sub> – Índice de Veracidade

I<sub>D</sub> – Índice de intervalo de doses

$I_P$  – Índice de Precisão

$I_E$  – Índice de Exatidão

ISO – International Organization for Standardization, o nome não é uma sigla, mas vem do radical grego Iso que significa igual.

$IT_\beta$  – intervalo de tolerância de expectativa- $\beta$

K – fator de abrangência

LBA – Ligand Binding Assays

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

n = Replicatas de determinações

p = Sessões de ensaios independentes

p/v – peso/volume

PBS - Phosphate Buffered Saline – Salina Tamponada com Fosfatos

$R^2$  – Coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado

RIA – Radioimunoensaio

SFSTP – Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SPF (Specific Pathogen Free) – livre de micro-organismos patogênicos

USP – United States Pharmacopoeia

$u_c$  – Incerteza Padrão Combinada

U – Incerteza Expandida

gl – graus de liberdade

OD – Densidade ótica

m – número de concentrações

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 FEBRE AMARELA.....	1
1.2 A vacina contra Febre Amarela.....	1
1.2.1 A ovoalbumina.....	2
1.3 O ELISA.....	4
1.3.1 Definição.....	4
1.3.2 Histórico do ELISA.....	5
1.3.3 Princípios da técnica.....	7
1.3.4 ELISA na detecção do teor de ovoalbumina residual na vacina contra febre amarela.....	8
1.4 GARANTIA DA QUALIDADE.....	9
1.5 INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	9
1.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	10
1.7 A VARIABILIDADE DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	12
1.8 ABORDAGEM CLÁSSICA DA ICH - <i>INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION</i> .....	12
1.9 DEFINIÇÕES DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....	14
1.9.1 Linearidade X Função de resposta .....	14
1.9.2 Veracidade.....	15
1.9.3 Exatidão.....	16
1.9.4 Precisão.....	18
1.9.5 Intervalo de doses e limites de quantificação.....	19
1.10 O CONCEITO DO ERRO TOTAL ( <i>TOTAL ERROR</i> ) E O PERFIL DE EXATIDÃO ( <i>ACURACY PROFILE</i> ).....	20
1.10.1 Perfil de exatidão.....	22
1.11 ÍNDICES GLOBAIS DE CONVENIÊNCIA.....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 GERAL.....	24
2.2 ESPECÍFICO.....	24
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	25
3.1 AMOSTRAS ANALISADAS.....	25
3.2 ELISA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE OVOALBUMINA (EDTO).....	25
3.3 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.....	26
3.4 MATRIZ DE ENSAIOS.....	27
3.5 ESTUDO DE PRÉ-VALIDAÇÃO.....	28
3.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
3.5.2 Análise de Variância.....	28
3.5.3 Veracidade.....	28
3.5.4 Precisão.....	28
3.5.5 Exatidão.....	28
3.5.6 Índices globais de conveniência.....	29
3.6 CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO.....	31
3.7 CÁLCULO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	31

<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 FUNÇÃO DE RESPOSTA .....	32
4.2 PERFIL DE EXATIDÃO.....	34
4.3 LINEARIDADE.....	37
4.4 ÍNDICES GLOBAIS DE CONVENIÊNCIA.....	38
4.5 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	38
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FEBRE AMARELA

A febre amarela foi durante quatrocentos anos um desafio à Medicina, sendo ainda hoje, uma importante causa de morbidade e de alta letalidade, em vastas zonas das regiões tropicais da África e da América do Sul. A partir do século XVII, essa doença dizimou milhares de vidas em extensas epidemias urbanas nesses dois continentes (BENCHIMOL, 2001 *apud* NETTO, 2010).

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da febre amarela infecta e se replica em células dendríticas epidérmicas, fibroblastos e macrófagos nos linfonodos regionais. Produz uma pequena viremia e se espalha por todo o organismo atingindo o fígado, principal órgão-alvo da infecção além de baço, rins, medula óssea e músculos cardíacos esqueléticos. O espectro clínico da infecção por vírus da febre amarela varia de formas assintomáticas, formas leves ou moderadas com doença febril não específica e formas ictéricas graves, em aproximadamente 20% das infecções. O quadro típico ocorre, após a incubação de 3 a 6 dias, com início abrupto de febre, calafrio, cefaléia intensa, mialgia generalizada, anorexia, náuseas e hemorragia gengival. Este período dura cerca de 3 (três) dias e é acompanhado de viremia. Pode seguir-se um período de remissão em que melhoram os sintomas (FIGUEIREDO, 2007 *apud* NETTO, 2010).

## 1.2 A VACINA CONTRA FEBRE AMARELA

Em 1937, logo após o desenvolvimento da cepa 17D, por Theiler e Smith, nos Laboratórios da Fundação Rockefeller e a constatação de sua capacidade imunogênica para o homem, esta cepa foi trazida para o Brasil. A produção da vacina contra a febre amarela pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, iniciou-se em março de 1937, e nesse mesmo ano foi usada pela primeira vez em maior escala durante o surto epidêmico de febre amarela ocorrido no município de Varginha/MG. Posteriormente, foi utilizada em programas de vacinação em outros estados brasileiros, com grande sucesso. A partir de então, a vacina passou a ser aplicada na área endêmica, de forma sistemática como a melhor alternativa para o controle da febre amarela no país (BRASIL, 2004 *apud* NETTO).



Todas as vacinas contra a febre amarela atuais derivam da cepa 17D. Durante a fase inicial de produção da vacina nos Estados Unidos e Brasil no período de 1937-1941, duas linhagens principais da 17D (17DD e 17D-204) foram utilizadas também para produção de vacinas. Em 1957 a OMS publicou “*Requirements for Yellow Fever Vaccine*” que unificou o lote de semente e procedimentos industriais (NETTO, 2010).

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. Esse lote deve ser avaliado quanto à neurovirulência em macacos suscetíveis e não pode apresentar micro-organismos estranhos. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano (NETTO, 2010).

A suspensão viral é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após a clarificação da suspensão viral por método adequado para remoção de resíduos celulares, algumas substâncias estabilizadoras, que, comprovadamente, não alteram a eficácia e segurança do produto, são adicionadas. Antes do envase e liofilização, o produto é analisado também quanto à esterilidade, concentração de vírus e nitrogênio protéico. Se a produção da vacina ocorrer em ovos embrionados, 2% e não menos que 20 ovos são separados para controle. Ao final da produção da vacina, estes ovos não-infectados com a cepa vacinal têm que demonstrar ausência de patógenos específicos para aves. O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

### 1.2.1 A ovoalbumina

Os ovos contêm numerosas substâncias com potencial, demonstrando efeitos terapêuticos e fornecendo as necessidades nutricionais básicas, sendo vários destes ovos já produzidos em escala industrial, tanto para fins alimentícios quanto

para aplicações médicas. Também foi demonstrado que o conteúdo dos ovos pode ser manipulado, através de vários métodos, para atingir certas funcionalidades, destinadas à dieta ou produção de imunobiológicos vacinais (CATT & TREGGAR, 1967).

Além disso, a pesquisa continuada para identificar novas funções biológicas dos componentes do ovo da galinha ajudará a definir métodos para melhorar ainda mais o seu valor, como fonte de inúmeros compostos biologicamente ativos com benefícios específicos para a saúde humana e animal, assegurando o seu papel no tratamento e prevenção das doenças crônicas e doenças infecciosas (CATT & TREGGAR, 1967).

Várias proteínas da clara do ovo e seus peptídeos demonstraram atividade imunomoduladora. A ovoalbumina, presente no ovo, corresponde a 54% da proteína da clara (LI-CHAN *et al.*, 1995).

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

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

Quando empregada na produção de vacinas, o conteúdo utilizado de ovoalbumina é um fator de influência na tolerância ao imunobiológico, cujo resíduo da produção deve ser  $\leq 5 \mu\text{g}/\text{dose}$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª edição, 2010).

### 1.3 O ELISA

#### 1.3.1 Definição

ELISA e EIA são as abreviações das siglas dos nomes das técnicas em inglês “enzyme-linked immunosorbent assay” e Ensaio Imunoenzimático, respectivamente. São métodos poderosos e úteis para estimar concentrações de matérias na ordem de ng/mL a pg/mL em soluções, como soro, urina, esperma e sobrenadante de células (SAVIGE, 1998). Ensaios imunoenzimáticos têm sido amplamente usados em pesquisas de ciências naturais.

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

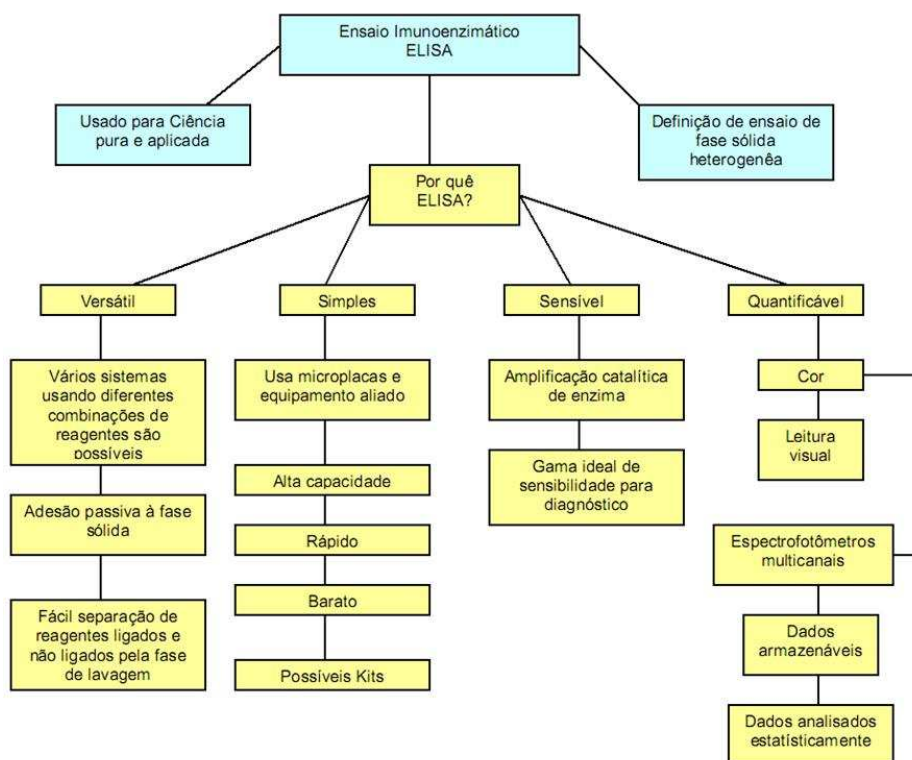


Figura 1 – Vantagens da utilização do ELISA  
 Fonte: Adaptado de Crowther, J. R.; 2002.

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

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

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

Todos os três sistemas podem ser usados em um ensaio chamado ELISA de competição ou ELISA de inibição.

### 1.3.2 Histórico do ELISA

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

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

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

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

Quando as enzimas (tais como peroxidase) reagem com substratos apropriados, como Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolina-6-sulfônico) (ABTS) ou 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), ocorre uma mudança em sua cor, que é usada como um sinal. No entanto, o sinal deve estar associado à presença de anticorpos ou antígenos, por isso a enzima deve estar ligada a um anticorpo adequado. Este processo de vinculação foi desenvolvido independentemente por Stratis Avrameas e G.B. Pierce (LEQUIN, 2005). Uma vez que é possível remover qualquer anticorpo ou antígeno não ligado por lavagem, o anticorpo ou o antígeno deve ser fixado à superfície do recipiente, ou seja, a fase sólida adsorvida tem que estar preparada. Uma técnica para fazê-lo foi publicada por Wide e Porath (1966).

Durante os anos 1960 e início dos anos 1970, muitos sistemas de teste RIA eram essencialmente métodos "caseiros" desenvolvidos por pesquisadores individuais, que não podiam manter o ritmo (principalmente financeiro) de fabricantes comerciais que contavam com recursos e instalações, tais como a Boehringer-Mannheim (Alemanha), Abbott (Estados Unidos), e Organon Teknika (Holanda), para citar apenas alguns. A comercialização de kits de testes de ELISA estava começando. As técnicas de fase sólida (WIDE e PORATH, 1966; CATT e TREGGAR, 1967) foram usadas no desenvolvimento de microplacas de titulação com 96 poços (figura 2), na qual um antígeno ou um anticorpo é covalentemente ligado a um suporte sólido. Os avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento de aparelhos automáticos de pipetagem, pipetas multicanais e os leitores de microtitulação em placas e lavadores automáticos, e na década de 1980 instrumentos de teste totalmente automatizados foram fabricados pela Boehringer-Mannheim e Abbott, entre outros.



Figura 2 – Microplaca de titulação com 96 orifícios.

Fonte: [http://88proof.com/synthetic\\_biology/blog/archives/439](http://88proof.com/synthetic_biology/blog/archives/439)

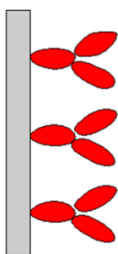
### 1.3.3 Princípios da técnica

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

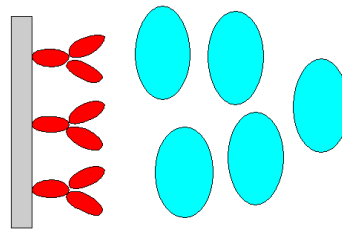
Depois é realizada uma lavagem com PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Salina Tamponada com Fosfatos). Posteriormente, é feito o bloqueio com uma proteína (por exemplo soro de cabra, leite desnatado, albumina sérica bovina - BSA) para que esta ocupe os espaços livres (sítios inespecíficos que podem gerar resultados falso positivos ou negativos).

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

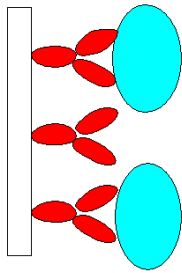
Em seguida, o produto é tratado com anticorpos secundários que se ligará ao antígeno ou anticorpo primário e a superfície é lavada novamente para a retirada do anticorpo secundário que não se ligou. Estes Ac's possuem uma enzima acoplada que irá produzir uma substância colorida em presença de um substrato. Medindo-se a intensidade da cor formada, pode-se quantificar e verificar a presença de alguma substância de interesse. O princípio da técnica é demonstrado esquematicamente na figura 3.



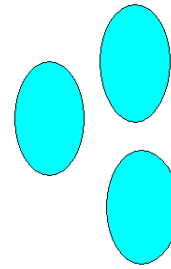
1. "Sensibilização" da placa. Ac adicionado se liga ao plástico, excesso é lavado;



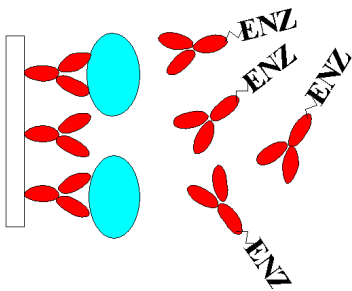
2. Adicionada amostra e retirado Ag não ligado aos Ac por lavagem;



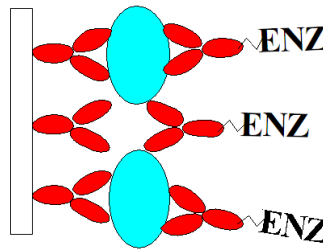
3. O Ag presente na amostra se liga aos Ac fixados na placa;



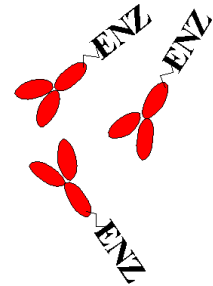
4. Os Ag não ligados são removidos por lavagem;



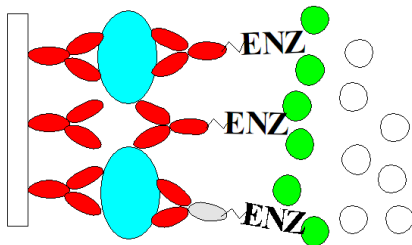
5. Anticorpos marcados com enzima são adicionados



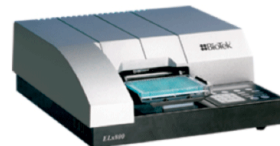
6. Ac se ligam aos Ag



7. Os Ac não ligados são removidos por lavagem



8. O substrato cromógeno é adicionado



9. As enzimas ligadas aos Ac reagem com o substrato desenvolvendo coloração que é lida no espectrofotômetro

Figura 3 – Esquema da realização do ELISA  
 Fonte: Adaptado de Crowther, J. R.; 2002.

### 1.3.4 ELISA na detecção do teor de ovoalbumina residual na vacina contra febre amarela

Três frascos de um mesmo lote de vacina liofilizada e ovoalbumina padrão são submetidos ao método imunoenzimático ELISA. A curva padrão de ovoalbumina é feita nas concentrações de 100 µg a 0,5µg com diluições usando fator 2 e a vacina diluída em tampão fosfato-salina PBS/T20 0,05%/NFDM (salina tampão fosfato com

tween 20 e leite em pó desnatado). Inocular cada diluição iniciando em 1:10 e usar o fator 2 em dois orifícios da placa de 96 orifícios previamente sensibilizada com soro anti-ovoalbumina (coelho) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 e bloqueada com soro albumina bovina a 3% (p/v). A incubação é feita por 30 minutos a 37 °C. As placas são lavadas com salina tampão fosfato PBS /T20 0,05% (salina tampão fosfato com tween 20) e o soro anti-ovoalbumina (coelho) conjugado a peroxidase em tampão fosfato-salina PBS /T20 0,05%/NFDM é adicionado. É feita nova incubação por 30 minutos a 37 °C e nova lavagem. A reação é revelada como substrato para a peroxidase em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e é interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A leitura é feita em leitor de microplacas a um comprimento de onda duplo de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual é calculado utilizando a curva logística de quatro parâmetros em um software estatístico como o CombiStats<sup>®</sup> do EDQM (2004). A vacina é considerada satisfatória se o conteúdo de ovoalbumina residual for menor ou igual a 5 µg/dose (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 1.4 GARANTIA DA QUALIDADE

Um dos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação correntes (BPFc) é que os fabricantes de produtos médicos, incluindo drogas e equipamentos, tenham um programa de garantia da qualidade. A garantia da qualidade é um sistema completo de abordagem para garantir a segurança e eficácia de produtos acabados. O controle da qualidade é normalmente considerado um item do sistema de garantia da qualidade. É o mais básico ou mais simples tipo de programa da qualidade. O controle da qualidade primariamente consiste de inspeções e ensaios como meio inicial de detectar problemas e é apenas parte do sistema de Garantia da Qualidade. Este princípio tem como resultado o uso de preparações de referência, orientações sobre ensaios e os critérios de liberação para a segurança e eficácia (METZ *et al.*, 2002).

#### 1.5 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A incerteza de Medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (grandeza submetida à medição), com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2008) e segundo a



EURACHEM (2000), é a indicação quantitativa da qualidade dos resultados de medição, sem a qual os mesmos não poderiam ser comparados entre si, com os valores de referência especificados ou com um padrão. Uma vez que o valor verdadeiro do resultado de uma medição é desconhecido qualquer resultado de uma medição será somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando em questão. Sendo assim, a representação completa de tal mensurando deverá incluir a dúvida deste resultado, a qual é traduzida pela sua incerteza de medição (EURACHEM, 2000).

## 1.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

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

Validação é o processo pelo qual a confiabilidade, uma medida objetiva da reprodutibilidade intra e inter-laboratorial, e a sua relevância são avaliadas com o objetivo de dar suporte a um uso específico. Um método é considerado validado quando suas características de desenvolvimento, vantagens e limitações foram adequadamente determinadas para um propósito específico. Não há níveis de reprodutibilidade ótimos ou mínimos ou associados ao teor de ovoalbumina que deverão ser alcançados para uma validação de sucesso. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependerão das condições sob as quais o teste será usado

e os propósitos para os quais seus resultados serão aplicados (HUBERT *et al.*, 1999, HUBERT *et al.*, 2004).

Durante um estudo de validação, medidas são tomadas em múltiplas sessões de ensaios independentes (k) com replicatas de determinações (n) em cada sessão. É assumido que os erros aleatórios para os k-ésimas sessões de ensaios e as n-ésimas replicatas apresentam distribuição normal e independente com média zero e variâncias  $\sigma^2_I$  e  $\sigma^2_E$ , respectivamente. Estas variâncias  $\sigma^2_I$  e  $\sigma^2_E$ , correspondem à variabilidade intra ensaios e entre ensaios do método, respectivamente. A variabilidade total do ensaio é dada por  $\sigma^2_T = \sigma^2_I + \sigma^2_E$ . Isto normalmente é referido como modelo de efeito aleatório de fator único. Usando a análise de variância (ANOVA) para modelo de efeito aleatório de fator único balanceado (número constante de replicatas em todas as sessões), os quadrados médios intra e entre ensaios podem ser usados para obter estimativa da variância intra-ensaios, da variância entre-ensaios e da variância total.

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

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

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

A extensão do prazo de validade de reagentes críticos (exceto padrões de referência) pode ser justificada através do comportamento aceitável de amostras de controle da qualidade se elas forem frequentemente testadas nos ensaios e a

extensão de um prazo de validade deve ser cuidadosamente documentada baseada nestes dados (DeSilva *et al.*, 2003).

## 1.7 A VARIABILIDADE DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Ensaio biológico (também chamados bioensaios) são métodos para estimar a potência de uma droga ou material através da utilização da reação causada pela sua aplicação em unidades experimentais vivas. São partes integrantes da avaliação da qualidade para produção e venda no mercado de vários produtos biológicos e alguns produtos não biológicos. Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (p. e. animais, células vivas, ou complexos funcionais de receptores alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes baseados em química (USP, 2010).

## 1.8 ABORDAGEM CLÁSSICA DA ICH - *INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION*

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

- Linearidade;
- Exatidão;
- Precisão (repetitividade e precisão intermediária);

- Especificidade;
- Faixa;
- Limite de quantificação.

O objetivo de um bom método analítico é quantificar com certeza cada um dos valores desconhecidos em amostras analisadas. Ou seja, a diferença entre os resultados obtidos e o valor “verdadeiro” deve ser suficientemente pequena. Dois componentes podem influenciar esta diferença: a Exatidão (ou bias) do método e sua Precisão. O bias demonstra quanto os resultados desviam “em média” ou sistematicamente de um valor verdadeiro e a precisão expressa como os resultados variam em torno do valor médio quando as medidas são repetidas. Um “bom” método analítico deveria de uma forma ideal, dar resultados próximos de um valor verdadeiro da amostra, i.e. dentro de algum limite de aceitação. Esta “proximidade” está diretamente ligada ao tamanho do bias e da precisão do método (BOULANGER *et al.*, 2007).

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

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

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

## 1.9 DEFINIÇÕES DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

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

### 1.9.1 Linearidade X Função de resposta

Linearidade de um procedimento é sua habilidade (em uma dada faixa) de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito na amostra. Em ensaios biológicos, geralmente não é possível obter a potência diretamente de uma medida individual. Uma curva padrão é quase sempre usada, com incremento de doses e repetições, para obter um único resultado válido. Este resultado deve mostrar-se proporcional à concentração do analito na amostra (SFSTP, 2005).

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

Este entendimento ficou claro desde 1995 e então, para evitar estas confusões, o guia de validação de métodos analíticos do FDA (2001) não contém mais o termo “linearidade”, mas apenas “calibração/curva padrão” sem restrições particulares exceto que “*o modelo mais simples que adequadamente descreve a relação concentração-resposta deverá ser usado*”.

### 1.9.2 Veracidade

Veracidade é um conceito relacionado aos erros sistemáticos (HUBERT *et al.*, 2003; ISO 5725, 1994: ISO 3534-1, 2006). Na norma ISO 5725 (1994), parte 1 (Princípios gerais e definições) a definição de Veracidade (seção 3.7) é: “A proximidade de concordância entre o valor médio obtido de uma grande série de resultados de ensaios e um valor de referência aceito. A medida de Veracidade é normalmente expressa em termos de bias. Veracidade tem sido referida como ‘exatidão da média’. Este uso não é recomendado.” Inclusive é expresso como a distância do valor médio de uma série de medidas ( $\bar{x}_i$ ) e um valor de referência  $\mu_T$ .

Este conceito é medido pelo bias, pelo bias relativo ou pela recuperação:

$$\text{Bias} = \bar{x}_i - \mu_T$$

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

$$\text{Recuperação (\%)} = 100 \times \left( \frac{\bar{x}_i}{\mu_T} \right) = 100 - \text{Bias relativo (\%)}$$

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

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

### 1.9.3 Exatidão

A “exatidão de medição” não é uma grandeza e não lhe é atribuído um valor numérico. Uma medição é dita mais exata quando é caracterizada por um erro de medição menor. A “exatidão de medição” é algumas vezes entendida como o grau de concordância entre valores medidos que são atribuídos ao mensurando (INMETRO, 2008).

O Erro Total de medição dos resultados obtidos a partir de um procedimento analítico está relacionada ao grau de concordância entre os valores encontrados, ou seja, os resultados, e o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito. O grau de concordância observado é baseado na soma dos erros sistemáticos e aleatórios, ou seja, o Erro Total associado ao resultado. Conseqüentemente, o erro de medição é a expressão da soma de veracidade (ou bias) e precisão (ou desvio padrão), ou seja o Erro Total. Como mostrado abaixo, cada medição  $X$  tem três componentes: o  $\mu_T$  verdadeiro valor da amostra, o bias do método (estimado pela média de vários resultados) e a precisão (estimada pelo desvio-padrão ou, na maioria dos casos, a precisão intermediária). Equivalentemente, a diferença entre uma observação e  $X$ , o verdadeiro valor, é a soma dos erros sistemáticos e aleatórios, ou seja, o Erro Total ou o Erro de Medição (ROZET *et al.*, 2007a).

$$X = \mu_T + \text{bias} + \text{precisão}$$

⇔

$$X - \mu_T = \text{bias} + \text{precisão}$$

⇔

$$X - \mu_T = \text{erro total}$$

⇔

$$X - \mu_T = \text{erro de medição}$$

⇔

$$X - \mu_T = \text{exatidão}$$

Entretanto, quando se observa a seção correspondente à exatidão na parte 2 do documento ICH Q2R1 (assim como em ANVISA, 2003), os dados recomendados para exatidão são apresentados como: “exatidão deveria ser reportada como percentual de recuperação pelo ensaio de quantidades conhecidas adicionadas do analito na amostra ou como a diferença entre a média e o valor aceito como verdadeiro juntamente com os intervalos de confiança.” Isto não se refere mais à Exatidão, mas em verdade à Veracidade como definida no documento da ISO 5725 porque ela é o valor médio de vários resultados – como oposto a um único resultado para a Exatidão – que é comparada ao valor verdadeiro, como afirmado anteriormente. Esta seção refere-se aos erros sistemáticos enquanto Exatidão como definido no ICH Q2R1 parte 1 e ISO 5725 parte 1 corresponde à avaliação do erro de medida. No documento de Validação de Métodos Bioanalíticos (FDA), Exatidão é definida como “... a proximidade da média dos resultados de ensaios obtidos pelo método do valor verdadeiro (concentração) do analito. (...) O valor médio deveria estar dentre 15% do valor atual exceto na concentração do Limite Inferior de Quantificação, onde ela não deveria desviar mais do que 20%. Os desvios da média a partir dos valores verdadeiros servem como medida de exatidão.” Como já mencionado previamente, esta definição corresponde à veracidade do método analítico. Para ensaios bioanalíticos, revisões extensas anteriores já avaliaram o problema da diferença da definição de exatidão relativa e veracidade (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*; 1998; HARTMANN *et al.*, 1994).

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



#### 1.9.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de múltiplas medições de uma mesma amostra sob as condições prescritas. Precisão pode ser considerada em três níveis: Repetitividade; Precisão Intermediária e Reprodutibilidade. A precisão de um procedimento analítico, normalmente é expressa como a variância, o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medições (ICH, 2005). Podem ser determinados três níveis para precisão:

- Repetitividade ou precisão Intra-ensaios – Expressa a precisão sob as mesmas condições de operação em um curto período de tempo. Para ser avaliada, corridas do ensaio são feitas em condições de repetitividade, o que significa que “n” replicatas são testadas nas mesmas condições, na mesma amostra inicial, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento, em um curto período de tempo.
- Precisão Intermediária ou precisão inter-ensaios – Expressa variação dentro de um laboratório: entre dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes etc. (ICH, 2005). Para ser avaliada, “p” sessões de ensaios correspondem às condições para testar a precisão intermediária. Isto significa que os resultados de ensaio são obtidos usando uma amostra homogênea em diferentes dias e/ou por diferentes operadores e/ou com diferentes equipamentos no mesmo laboratório. O objetivo final do estudo é obter uma imagem do procedimento que represente o mais precisamente possível sua variabilidade sob circunstâncias normais de uso. Para obter sucesso em determinar a variabilidade do procedimento analítico o produto p x n não pode ser menor do que 18 resultados (SFSTP, 2005).

- Reprodutibilidade – Expressa a precisão entre diferentes laboratórios (estudos colaborativos normalmente aplicados à padronização de uma metodologia).

#### 1.9.5 Intervalo de doses e limites de quantificação

Para qualquer método, é necessário determinar o Intervalo de concentrações ou valores sobre os quais o método pode ser aplicado. O documento do ICH Q2R1 (2005), na parte 1, define Intervalo de um procedimento analítico como “o intervalo entre a maior e a menor concentração (quantidade) de analito na amostra (incluindo estas concentrações) para as quais tenha sido demonstrado que o procedimento analítico tem um nível de precisão, exatidão e linearidade apropriados”. O FDA (2001) define o Intervalo de quantificação como “o intervalo de concentrações, incluindo o LSQ (Limite superior de quantificação) e o LIQ (Limite inferior de quantificação), que pode ser quantificada com confiança, reprodutibilidade, exatidão e precisão através do uso da relação de resposta-concentração, onde o LIQ é o limite inferior de quantificação e o LSQ é o limite superior de quantificação.

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

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

Mesmo sabendo que cada área de trabalho tem suas próprias características e problemas, os critérios principais a serem preenchidos são similares ou deveriam ser similares uma vez que a validação de métodos analíticos independe do setor industrial, matriz de amostras ou tecnologia analítica empregada, Uma terminologia harmonizada de validação deveria ser adotada para permitir discussões e comparações de problemas de validação entre cientistas de diferentes campos. Este

consenso de terminologia não esta ainda disponível, mesmo existindo tentativas (ROZET *et al.*, 2007b).

Entretanto, se é desejável haver uma harmonização entre os campos interessados em validação analítica, seria interessante notar que, mesmo dentre o campo farmacêutico, os laboratórios não usam a mesma terminologia enquanto eles deveriam usar definições similares para descrever critérios de validação. A terminologia usada entre diferentes documentos oficiais como o Guia de validação do “Food and Drug Administration” (FDA) para métodos bioanalíticos (2001), ICHQ2R1 (2005) e ISO (1994, 2005) é diferente.

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

#### 1.10 O CONCEITO DO ERRO TOTAL (*TOTAL ERROR*) E O PERFIL DE EXATIDÃO (*ACURACY PROFILE*)

Como descrito acima, dentre as características descritas no guia da ICH (2005), duas são mais importantes para ensaios quantitativos: exatidão e precisão. Porém, a interpretação do guia ICH não é clara, uma vez que esta abordagem confunde a avaliação do erro sistemático, representada pelo critério de Veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão (GIBELIN *et al.*, 2009). Inclusive, o guia ISO (ISO 5725, parte 1, 1994) prove uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da Veracidade e da Precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”, tem sido difundida pela comissão SFSTP, desde sua publicação inicial em 1997 (CHAPUZET *et al.*, 1997), que já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2007a; HUBERT *et al.*, 2007b; HUBERT *et al.*, 2008).

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

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do FDA (USDHHS-FDA, 2001) preconizam que pelo menos 67% (4 em 6 resultados) de amostras de controle da qualidade estejam entre 15% do seu valor nominal, 33% das amostras sob controle da qualidade (não todas as replicatas na mesma concentração) podem estar fora dos 15% de seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Esta regra ficou conhecida como a regra 4-6-15 (HOFFMAN & KRINGLE, 2007).

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

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

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, nesta amostra. É impossível separar os Erros Sistemático e Aleatório. Uma vantagem desta abordagem é que reflete mais diretamente o comportamento de ensaios individuais e irá resultar em menor rejeição de corridas em-estudo do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da bias e precisão observadas (ROZET *et al.*, 2007b).

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

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

#### 1.10.1 Perfil de exatidão

Uma significativa fonte do bias e imprecisão em métodos analíticos pode ser causada pela escolha de modelos estatísticos inadequados para a curva de calibração. Os critérios estatísticos como  $R^2$ , falta de adequação a modelos ou quaisquer outros testes estatísticos para demonstrar qualidade de adequação a modelos são apenas informativos e meramente relevantes para os objetivos do ensaio. Para este objetivo, vários autores (HUBERT *et al.*, 2004; HUBERT *et al.*, 2003; HOFFMAN e KRINGLE, 2005) introduziram o uso do Perfil de Exatidão baseado em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade. Os modelos deverão ser retidos ou rejeitados baseado na exatidão de resultados calculados independentemente das propriedades estatísticas. Esta abordagem já foi usada por vários autores como Streef *et al.* (2005) para a validação de um ensaio de cromatografia líquida para determinação quantitativa de loperamida em plasma.

O Perfil de Exatidão é uma ferramenta para tomada de decisão para acessar a validade de um método analítico, i.e. sua habilidade para quantificar o mais exatamente quanto possível e é obtido simplesmente através da ligação dos limites inferiores e da ligação dos limites superiores. A inclusão do Perfil de medição de erro, dentro dos limites de aceitação  $[-\lambda, \lambda]$  nos níveis-chave deve ser examinado antes de declarar que o procedimento é válido sobre um intervalo específico de

valores.  $\beta$  geralmente será escolhido acima de 80% e, como demonstrado por Boulanger *et al.* (2007), escolhendo 80% para  $\beta$  durante o pré-estudo de validação garante que 90% das corridas serão aceitas mais tarde na rotina quando a regra 4-6-I (por exemplo, 4-6-15) é utilizada na rotina (ROZET *et al.*; 2007b).

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

### 1.11 ÍNDICES GLOBAIS DE CONVENIÊNCIA

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

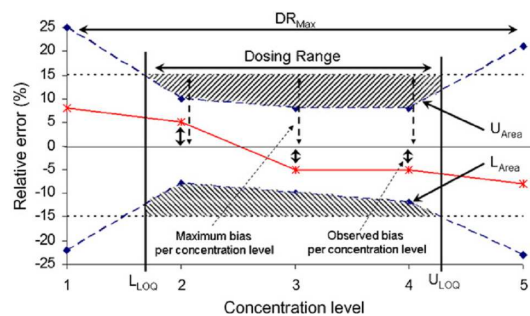


Figura 4 – Representação esquemática de um perfil de exatidão. Ilustração dos índices computados: Intervalo de doses, Veracidade e precisão. As linhas pontilhadas são os limites de aceitação superior e inferior, as linhas tracejadas são os limites de expectativa de tolerância- $\beta$  e a linha contínua é o bias relativo.  
Fonte: Rozet *et al.*, 2007.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Pré-validar o ensaio imunoenzimático de quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela.

### **2.2 ESPECÍFICO**

- Selecionar quais os parâmetros de validação se aplicam ao ensaio;
- Realizar a pré-validação do ensaio.

### 3 METODOLOGIA

O estudo consistiu de uma pré-validação do ensaio de determinação do teor de ovoalbumina residual para vacinas contra Febre Amarela, classificado como um ensaio de detecção quantitativa para uma impureza. O estudo avaliou a Função de Resposta, a Linearidade, o Intervalo de Quantificação, o Limite de Quantificação, a Veracidade, a Exatidão e a Precisão (intra-ensaios e precisão intermediária) do ensaio utilizando o Conceito do Erro Total para construir um Perfil de Exatidão dos resultados, obtidos pela curva 4PL, que foi avaliado pelo Índice de Exatidão.

#### 3.1 AMOSTRAS ANALISADAS

A presente fase de pré-validação testou apenas amostras do padrão diluídas, ora como padrão de calibração (1 µg/ml), ora como padrão de validação (demais concentrações). Foi utilizado um lote de padrão de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512) preparado no próprio laboratório na concentração de 100 µg/ml e diluído como descrito no quadro 1.

Quadro 1 – Esquema de diluições para preparação das concentrações do padrão utilizadas no estudo de pré-validação do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina residual.

% de 5µg/ml	Padrão Calibração	Padrões de Validação							
		0,31%	1,25%	5%	25%	36,4%	100%	137%	200%
Concentração µg/ml	1,00	0,0156	0,0625	0,25	1,25	1,82	5,00	6,86	10,00
Pré-diluição	1/100	1/6400	1/1600	1/400	1/80	1/55	1/20	1/14,5	1/10

#### 3.2 ELISA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE OVOALBUMINA (EDTO)

Os padrões de ovoalbumina de calibração e de validação foram submetidas ao método imunoenzimático (ELISA). A curva padrão de ovoalbumina foi feita com oito diluições contendo de 1,0 µg a 0,008 µg/ml. A cada ensaio, o padrão de calibração e os padrões de validação foram pré-diluídos em salina tamponada com fosfatos com tween 20 e leite em pó desnatado (PBS/T20 0,05%/NFDM) como descrito no quadro 3.1 e foram aplicados puros 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 anti-ovoalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 e bloqueada com albumina sérica bovina a 3% (p/v). A incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas com salina tamponada com tween 20 (PBS/T20 0,05%) e o anticorpo de coelho anti-ovoalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) conjugado a peroxidase em PBS/T20 0,05%/NFDM foi adicionado. Foi feita nova incubação por 30 minutos a 37 °C e nova lavagem. A reação foi revelada com o substrato para a peroxidase em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e foi interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A leitura foi feita em leitor de microplacas a um comprimento de onda bicromático de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando a curva logística de quatro parâmetros (4PL) no software estatístico CombiStats do EDQM (2004).

### 3.3 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Foram verificadas as normas RDC Anvisa; ICH Q5A (R1) (1999); ICH Q2 (R1) (2005); FDA (2001); USP (2010) e SFSTP (HUBERT et al., 1999; HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; HUBERT et al., 2008), visando definir os parâmetros a serem abordados e a metodologia para o cálculo destes parâmetros, partindo da premissa que o ensaio de detecção de ovoalbumina é classificado como um ensaio para a detecção quantitativa de uma impureza.

Adotamos a abordagem do Erro Total como descrita pela SFSTP (HUBERT et al. 1999; HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; HUBERT et al., 2008) para a construção do Perfil de Exatidão do Ensaio utilizando os resultados obtidos na curva 4PL, os resultados foram então avaliados pela determinação dos Índices Globais de Conveniência visando obter o Índice de Exatidão (ROZET et al., 2007b). Para tanto, os seguintes parâmetros foram determinados no estudo:

- Função de resposta
- Linearidade,
- Veracidade
- Exatidão

- Limite de Quantificação
- Precisão

### 3.4 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, sendo definido que seriam realizadas no mínimo seis corridas válidas ( $p=6$ ) com cinco concentrações do padrão ( $m=5$ ) em duas replicatas ( $n=2$ ). As concentrações foram proporcionalmente espaçadas em escala logarítmica, como recomendado em USP (2010) visando abranger a faixa de 33 a 167% da concentração alvo de 5,0  $\mu\text{g/ml}$ , 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  $\mu\text{g/ml}$ ), 36,4% (1,82  $\mu\text{g/ml}$ ), 100% (5,0  $\mu\text{g/ml}$ ), 137% (6,86  $\mu\text{g/ml}$ ) e 200% (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente, quatro ensaios adicionais ( $p=4$ ), com três replicatas com três diluições cada ( $n=3$ ), foram realizados utilizando três concentrações mais baixas ( $m=3$ ), 0,31% (0,0156  $\mu\text{g/ml}$ ), 1,25% (0,0625  $\mu\text{g/ml}$ ) e 5% (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ), para estender a avaliação do Intervalo de doses até o esgotamento da resposta.

Desta forma, foram realizados dez ensaios válidos no estudo e dois inválidos, totalizando 12 ensaios independentes.

### 3.5 ESTUDO DE PRÉ-VALIDAÇÃO

#### 3.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para cada replicata de cada concentração do padrão para cada um dos ensaios pelo método de curva logística de quatro parâmetros (4PL) utilizando o software CombiStats.

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP (HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b HUBERT at al., 2008) e o perfil de Exatidão dos resultados obtidos na curva de 4PL nas diferentes concentrações estudadas foi construído como descrito por Rozet et al. (2007). Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foram empregados os Índices de Conveniência Globais - Índice de Exatidão que utiliza o Índice de Intervalo, o Índice de Veracidade e o Índice de Precisão para o

seu cálculo, como descrito em Rozet et al. (2007), para tanto, uma planilha do Microsoft Excel® foi elaborada e validada frente aos dados do referido artigo.

### 3.5.2 Análise de Variância

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

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

### 3.5.3 Veracidade

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

### 3.5.4 Precisão

A precisão do método, expressada como Coeficiente de Variação percentual (%CV), foi obtida através da divisão do desvio padrão calculado pela média da concentração nominal.

A precisão do método foi estimada pela determinação da Repetitividade e da Precisão Intermediária nos oito níveis de concentrações. A variância da Repetitividade e da Precisão Intermediária assim como os Coeficientes de Variação % (CV%) foram calculados a partir das concentrações estimadas (ISO, 1994; FDA, 2001; HUBERT et al., 2004; ROZET et al., 2007b).

### 3.5.5 Exatidão

A Exatidão é a combinação do Erro sistemático e do Erro Aleatório, i.e. o Erro Total e foi demonstrada pelo Perfil de Exatidão construído e avaliada pelos Índices de Exatidão como descrito a seguir.

### 3.5.6 Índices globais de conveniência

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

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

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

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

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

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

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

Onde:

$SSB_{Max}$  é a soma do quadrado do Bias máximo em cada nível de concentração investigado pelos padrões de validação incluídos no Intervalo de doses, i.e.

$\sum_{j=1}^m \lambda = m\lambda^2$ , com  $\lambda$  sendo o limite em % e  $m$  o número de níveis de concentrações incluídos no Intervalo de doses.

$SSB_{Obs}$  é a soma do quadrado do bias observado em cada nível de concentração também incluído no Intervalo de doses.

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

c) Índice de Precisão  $I_P$  (Fig. X)

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

Onde:

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

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

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

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

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

### 3.6 CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

Para que um método de imunoenensaio seja aceito, é recomendado que a precisão intermediária (%CV) e a Veracidade (%ER) sejam ambas  $\leq 20\%$  (25% no LIQ (DeSilva *et al.*, 2003).

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 na curva 4PL foram plotados em gráficos para construir o Perfil de Exatidão. Assim, o IT- $\beta$  é o intervalo onde 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 (ROZET *et al.*, 2007).

### 3.7 CÁLCULO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Foi realizada uma avaliação do Tipo A da Incerteza Padrão Combinada ( $u_c$ ) e da Incerteza Expandida (U) para o ensaio como descrito pela EURACHEM (2000). A Incerteza Expandida prove um intervalo que, se acredita, deve incluir o valor do mensurando com um alto nível de confiança sendo obtida através da multiplicação da  $u_c$  pelo fator de abrangência (k). Foi utilizado  $k = 2$  para amostras ( $gl = 15$ ) garantindo 95% de nível de segurança.

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo utilizando a curva 4PL por replicata, por dia e por concentração, podem ser observados na tabela 1 para o intervalo de concentrações de 1,25 a 10,0 µg/ml e na tabela 2 para o intervalo de concentrações de 0,0156 a 0,25 µg/ml. Os resultados de cada grupo foram submetidos a uma análise de variância para verificar sua homogeneidade. Não houve valores aberrantes em nenhum dos grupos.

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

Tabela 1 – Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 1,25 a 10 µg/ml.

CI µg/ml	1,0	1,25		1,82		5,00		6,86		10,00	
	(Curva)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Replicatas	n1	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	1,194	1,270	1,344	1,929	1,941	5,040	5,225	6,746	6,694	9,741	x
2	1,270	1,312	1,294	1,692	1,771	4,645	4,792	6,786	6,589	9,840	9,287
3	1,312	1,254	1,309	1,854	1,856	5,226	5,017	7,200	6,856	10,070	10,517
4	1,254	1,222	1,236	1,676	1,744	4,806	4,686	6,623	6,202	10,316	10,686
5	1,222	1,160	1,156	1,559	1,716	4,372	4,491	6,282	5,479	9,085	8,970
6	1,160	1,194	1,182	1,748	1,787	4,854	5,024	6,711	6,108	9,578	10,053

CI – concentração Introduzida; x – resultado Inválido

Tabela 2 – Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,0156 a 0,25 µg/ml.

CI µg/ml	0,0156			0,0625			0,25		
	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3
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
2	0,022	0,021	0,022	0,072	0,084	0,090	0,346	0,335	0,299
3	0,027	0,026	0,030	0,098	0,088	0,061	0,337	0,303	0,458
4	0,024	0,024	0,024	0,086	0,089	0,088	0,283	0,290	0,284

CI – concentração Introduzida

### 4.1 FUNÇÃO DE RESPOSTA

A tabela 3 apresenta os resultados da curva 4PL obtidos na avaliação da Função de Resposta, com os valores de melhor ajuste. A tabela 4 analisa a função de resposta do ensaio apresentando os resultados utilizados para elaborar o gráfico 1, onde foram plotadas o logaritmo de [ 1 + média da Densidade Ótica] por

concentração, contra o logaritmo da concentração. O gráfico se restringe ao intervalo onde foi possível detectar a ovoalbumina com veracidade e precisão.

Tabela 3 – Resultados das curvas de calibração dos dez ensaios obtidas com o ajuste de curva logística de quatro parâmetros das absorbâncias (Y) em função do logaritmo da concentração (diluições) do padrão de calibração (X).

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bottom	0,0280	0,0191	~ -2,378	0,0079	0,0109	0,0043	-0,0113	-0,0758	0,0985	0,0274
Top	1,142	1,287	1,157	0,926	1,172	1,079	1,270	1,372	0,9362	1,466
HillSlope	1,007	1,077	~0,442	1,059	1,036	0,938	0,970	0,788	1,903	1,093
EC50	0,047	0,041	~1,84e <sup>-008</sup>	0,085	0,077	0,065	0,096	0,151	0,1533	0,103
R square	0,9990	0,9999	0,9706	0,9991	0,9999	0,9995	0,9997	0,9997	0,9960	0,9996

Bottom = valor de Y na base da curva; Top = valor de Y no alto da curva, Inclinação: EC50 = concentração efetiva 50%; Hill slope = descreve a inclinação da curva.

Equação:  $F(x) = ((A-D)/(1+(x/C)^B)) + D$

Tabela 4 – Média das absorbâncias em opacidades densimétricas para cada concentração introduzida.

CI µg/ml	log CI	Média DO	Média DO + 1	log (Média DO+1)
1,25	0,097	0,6627	1,6627	0,221
1,82	0,260	0,7275	1,7275	0,237
5,00	0,699	0,8818	1,8818	0,275
6,86	0,836	0,9245	1,9245	0,284
10,00	1,000	0,9535	1,9535	0,291

CI – concentração Introduzida

DO – Densidade Ótica

log – logaritmo

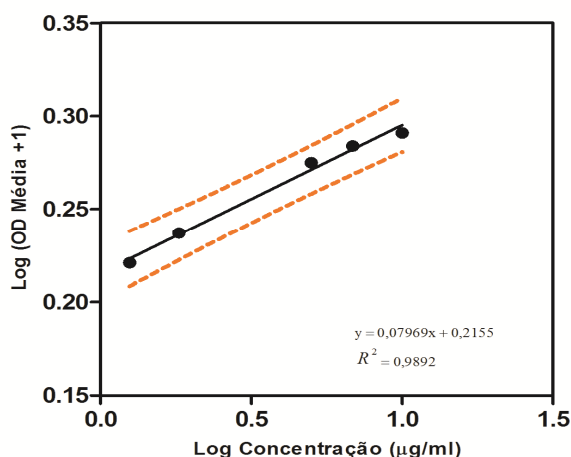


Gráfico 1 - Função de Resposta do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina Residual quando o logaritmo da (média+1) das opacidades densimétricas é plotado contra o Logaritmo da concentração em µg/ml.  $R^2 = 0,9892$ , a inclinação foi 0,07969 e a interceptação = 0,2155. As linhas pontilhadas mostram o intervalo de confiança de 95%, area que contém 95% de chance de conter a verdadeira linha de regressão.



## 4.2 PERFIL DE EXATIDÃO

A tabela 5 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção do Perfil de Exatidão do EDTO quando os resultados foram calculados com a curva de 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 DeSilva *et al.* (2003) para ensaios de ligação. A tabela 6 apresenta

Tabela 5 – Resultados obtidos para construção do Perfil de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina.

Introduzido*	0,0156	0,0625	0,25	1,25	1,82	5,00	6,86	10,00
Média <sub>Calc</sub>	0,0236	0,0812	0,3116	1,2444	1,7728	4,8482	6,5230	9,8402
LIT $\beta$ $\mu\text{g/ml}$	0,031	0,106	0,45	1,39	2,02	5,46	7,56	11,25
LST $\beta$ $\mu\text{g/ml}$	0,015	0,056	0,18	1,10	1,52	4,23	5,49	8,43
Bias (ER%)	51,16	29,90	24,65	-0,45	-2,59	-3,04	-4,91	-1,60
LIT $\beta$ %	97,38	70,30	79,08	11,03	11,20	9,27	10,18	12,48
LST $\beta$ %	4,95	-10,49	-29,79	-11,92	-16,39	-15,34	-20,01	-15,67
CV% PI	20,25	17,39	22,42	5,25	6,26	5,64	6,65	6,24
<b>Aceitação</b>	<b><math>\pm 20\%</math></b>							

\*  $\mu\text{g/ml}$ ; LIT, LST – Limite Inferior e superior de Tolerância; ER% - Erro Relativo %; CV – Coeficiente de variação; PI – Precisão Intermediária. Calc – Calculada.

O gráfico 2 apresenta o Perfil de Exatidão construído com esses dados. Foram incluídas as concentrações do Intervalo de doses onde a Exatidão foi satisfatória (1,25, 1,82, 5,0, 6,86 e 10,00  $\mu\text{g/ml}$ ) e apenas a primeira concentração onde não foi mais possível quantificar a Ovoalbumina com Veracidade e Precisão (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ).

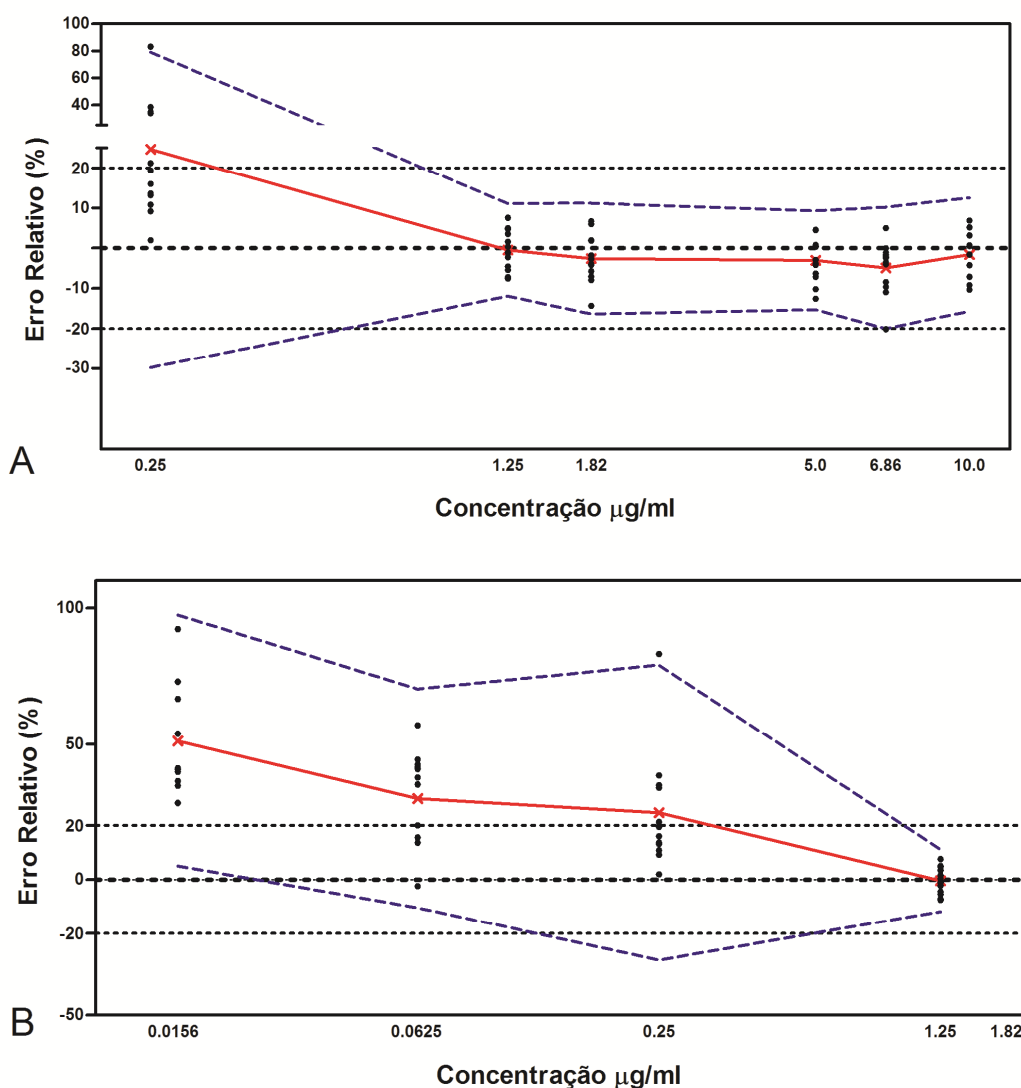


Gráfico 2. Perfil de Exatidão obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL no intervalo de doses de 0,25 a 10,0 µg/ml (A) e de 0,0156 a 1,25 µg/ml (B). Com a finalidade de facilitar a visualização dos perfis, foram incluídos a primeira concentração fora da faixa no gráfico A (0,25 µg) e a primeira concentração dentro da faixa no gráfico B (1,25 µg). 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.

A tabela 6 resume os resultados obtidos no estudo de pré-validação do EDTO. São apresentados o Intervalo de Quantificação, a Função de resposta, a Veracidade, a Precisão, a Exatidão, a Linearidade e o Limite Inferior de Quantificação. O Intervalo de Quantificação foi definido como 1,25 a 10,00 µg/ml e o Limite Inferior de Quantificação foi a concentração 1,25 µg/ml.

Tabela 6 - Resumo dos resultados da pré-validação do Ensaio de Determinação do Teor de Ovalbumina, são apresentadas a Veracidade, a Precisão, a Exatidão a Linearidade e o Limite Inferior de Quantificação.

<i>Função de resposta</i> (p= 6; n = 2) (p=4; n=3)*	Curva Logística de 4 parâmetros									
	Intervalo de calibração (m=6) 1,25 a 10 µg/ml									
Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8*	9*	10*
R <sup>2</sup>	0,9990	0,9999	0,9262	0,9991	0,9999	0,9995	0,9997	0,9997	0,9853	0,9996
HS*	1,007	1,077	0,998	1,059	1,036	0,938	0,970	0,788	0,993	1,093

Veracidade (p=6; n =2)	Bias (Erro Relativo %)
0,25 µg/ml (p=4; n =3)	24,65
1,25 µg/ml	-0,45
1,82 µg/ml	-2,59
5,0 µg/ml	-3,04
6,86 µg/ml	-4,91
10,0 µg/ml	-1,60

Precisão (p=6; n =2)	Repetitividade (CV%)	Precisão Intermediária (CV%)
0,25 µg/ml (p=4; n =3)	17,21	22,42
1,25 µg/ml	2,21	5,25
1,82 µg/ml	3,06	6,26
5,0 µg/ml	2,29	5,64
6,86 µg/ml	4,88	6,65
10,0 µg/ml	2,97	6,24

Exatidão (p=6; n =2)	Limites de Tolerância de Expectativa-β
0,25 µg/ml (p=4; n =3)	[79,08; -29,79]
1,25 µg/ml	[11,03; -11,92]
1,82 µg/ml	[11,20; -16,39]
5,00 µg/ml	[09,27; -15,34]
6,86 µg/ml	[10,18; -20,01]
10,0 µg/ml	[12,48; -15,67]

Linearidade (p=6; n =2)	
Intervalo	0,25 – 10,0 µg/ml
Inclinação	0,9701 - Significativamente diferente de zero (P =0,0001) Não houve desvio significativo de linearidade (P=0,26)
R <sup>2</sup> = 0,9996	Correlação significativa (P<0,0001)
Intersecção	-0,01350
Desvio de linearidade	Não significativo (P=0,26)

Limite Inferior de Quantificação	1,25 µg/ml
----------------------------------	------------

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

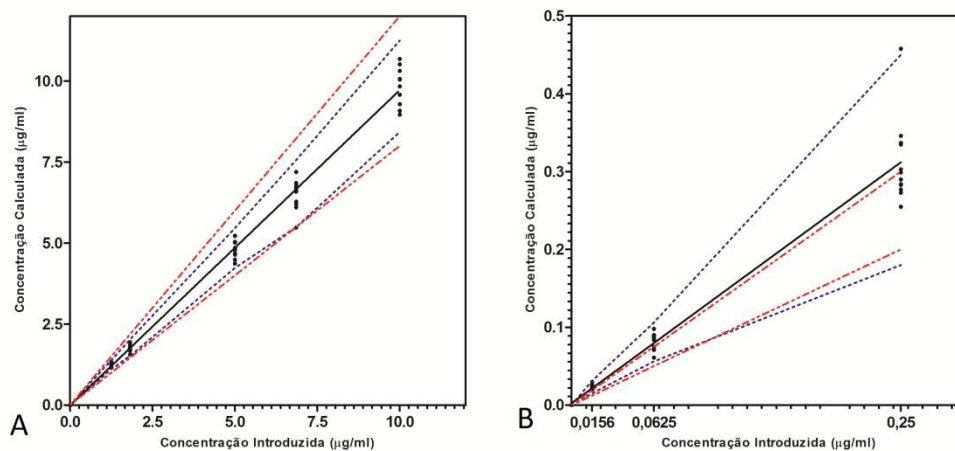


Gráfico 3 - Perfil de Linearidade obtido para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL no intervalo de doses de 1,25 a 10,0 µg/ml (A) e de 0,0156 a 0,25 10,0 µg/ml (B). A linha contínua representa a linha de identidade (resultados=concentração), as linhas pontilhadas os limites 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.  $R^2 = 0,9939$ ; inclinação = 0,9701 e Intercepção do eixo x = -0,01350.

### 4.3 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 (HUBERT et al., 2004). Para tanto um modelo linear foi ajustado para todas as concentrações calculadas com a curva de 4PL para os padrões de validação de todas as séries como uma função da concentração introduzida. A equação da regressão foi  $y = -0,01350x + 0,9701$  e  $R^2$  foi 0,9939. Visando demonstrar a Linearidade, o intervalo de tolerância de Expectativa- $\beta$  absoluto foi aplicado. O gráfico 4.3 demonstra o perfil de linearidade obtido no estudo separando o Intervalo onde o método apresentou linearidade satisfatória (A) que compreende as concentrações de 1,25 a 10 µg/ml da faixa onde não foi possível demonstrar resposta linear (B), que corresponde às concentrações de 0,00156 a 0,25 µg/ml.

#### 4.4 ÍNDICES GLOBAIS DE CONVENIÊNCIA

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os Índices Globais de Conveniência.

Tabela 7 - Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão: O Índice de Exatidão é um resumo dos três primeiros índices, demonstrando a qualidade geral do método sendo validado sobre o Intervalo estudado.

Intervalo	0,25 a 10 µg/ml	1,25 a 10 µg/ml
Índice de Intervalo	0,90	0,88
Índice de Veracidade	0,80	0,99
Índice de Precisão	0,37	0,37
Índice de Exatidão	0,62	0,70

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Foram calculadas as Incertezas Padrões Combinadas (uc) e as Incertezas Expandidas (U), para cada diferente nível de concentração. Os resultados podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados das Incertezas de Medição relativas à Determinação do Teor de Ovalbumina Residual para cada nível de concentração investigado na pré-validação.

Concentração µg/ml	0,0156	0,625	0,25	1,25	1,82	5,0	6,82	10,0
uc	0,0178	0,0863	0,2565	0,0837	0,0659	0,0146	0,0298	0,0130
U	± 3,56	± 17,27	±51,31	±16,75	±13,17	±2,92	±5,97	±2,62

uc – Incerteza Padrão Combinada; U – Incerteza Expandida;

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo pré-validar o ELISA para Detecção do Teor de Ovoalbumina (EDTO) residual em vacinas contra febre amarela. O ensaio é classificado como um ensaio do tipo II, ou seja, um teste quantitativo para determinação de impurezas (ANVISA, 2003) sendo preconizado para este tipo de ensaios a determinação da Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Limite de Quantificação, Exatidão e Robustez (para ensaios em desenvolvimento).

No entanto, alguns destes parâmetros geram dúvidas em sua interpretação, devido a forma como são descritos nas publicações oficiais e guias dos principais organismos internacionais (ICH, ISO, FDA, EURACHEM etc). Buscamos revisões apresentadas em artigos recentes que analisam criticamente as definições e fazem sugestões de como abordá-los corretamente em estudos de validações. Desta forma, adotamos a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir o perfil de Exatidão do EDTO, como sugerido pela comissão da SFSTP (HUBERT et al., 2004; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b HUBERT at al., 2008). Para esta finalidade foram determinados o Intervalo, Limite Inferior de Detecção, a Veracidade, a Função de Resposta, a Linearidade e a Exatidão do método.

Com a experiência adquirida no Laboratório de Vacinas Virais na utilização do Conceito do Erro Total em validações (Dos Santos et al., 2012), aplicamos também este conceito na validação do EDTO, para a construção do Perfil de Exatidão estudando um intervalo que abrangeu de 33 a 167% da concentração alvo (5 µg/ml) como recomendado pelo FDA (2001). O perfil foi construído com as Concentrações de Estudo, de 25% (1,25 µg/ml) a 200% (10,00 µg/ml) com doses proporcionalmente espaçadas na escala logarítmica e um Intervalo Controle, deliberadamente muito abaixo do Intervalo recomendado em USP (2010), testando as concentrações de 0,31% (0,00156 µg/ml) a 5% (2,5 µg/ml) visando à depleção completa da resposta. Isto foi feito com a finalidade de demonstrar a sensibilidade do método do Perfil de Exatidão.

Os resultados absolutos (concentração) de cada replicata, para cada concentração, de ambos Intervalos de concentrações incluídos na pré-validação (0,0156 a 0,25 µg/ml e 1,25 a 10,00 µg/ml) foram considerados homogêneos quando testados pela ANOVA, não ocorrendo valores aberrantes (que teriam sido removidos

do estudo caso acontecessem). Estes resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

Ao ser avaliada a Função de Resposta, através da curva de calibração obtida para o padrão de calibração nos 10 ensaios realizados para as curvas de 4PL das concentrações (diluições) em função da resposta (absorbâncias) obtidas, esta foi satisfatória em todas as curvas obtidas, o que pode ser avaliado pelo  $R^2$  maior que 0,99 em nove das 10 curvas. As 10 curvas foram capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta, como recomendado em FDA (2001). Com a mesma finalidade foi elaborado um gráfico onde a média das opacidades densimétricas (Y) foi plotada em função da concentração (X) em cada grupo de concentração do Intervalo de Estudo e foi obtido um  $R^2 = 0,9892$ , que também descreve satisfatoriamente a relação concentração-resposta. Rozet et al., (2007) apresentaram resultados de ensaios imunoenzimáticos onde foram consideradas satisfatórias apresentando Função de Resposta com  $R^2 = 0,9896$  e  $0,925$ . Estes autores adotaram limites de aceitação de  $\pm 30\%$  para o Perfil de Exatidão de ensaios desta natureza.

Nossos resultados para a Função de Resposta no Intervalo de Estudo confirmam a escolha da curva de 4PL para a calibração da curva, uma vez que o modelo permitiu a exata quantificação de Ovalbumina no intervalo de Estudo (25 a 200%) estando de acordo com o intervalo preconizado pelo FDA (2001) para quantificação (33 a 167%).

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 onde os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração. Tentativas de prover uma Resposta de Função são, entretanto sem uso e impraticáveis se não houver um sinal ou resposta, no entanto a linearidade dos resultados poderá ser avaliada (ROZET ET AL., 2007a).

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 foram conectados, de modo semelhante ao empregado na avaliação de Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada satisfatória 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 pelo FDA (2001) 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 satisfatória no Intervalo de Estudo de 1,25 a 10,00 µg/ml, com um máximo de 6,65% (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 (17,39 a 22,42%). Da mesma forma, a Veracidade foi satisfatória apenas no Intervalo de Estudo, sendo o Bias máximo -4,91% (-0,45 a -4,91%). No Intervalo Controle, os bias encontrados foram mais elevados sendo o máximo 51,16% (24,65 a 51,16%). Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes bias e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas esta abordagem é inconveniente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente (BOULANGER et al., 2007). 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 (DeSILVA et al., 2004), a concentração 0,25 µg/ml teria sido aceita como satisfatória, pois apresentou ER% = 24,65% e Precisão Intermediária = 22,42%, no entanto os Perfis de Linearidade e de Exatidão demonstraram que somente a análise conjunta do bias (Veracidade) e Precisão foi capaz de identificar a inadequação destas 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 (HUBERT et al., 2004; ROZET et al., 2007a; HOFFMAN and KRINGLE, 2007; HUBERT et al., 2007a; HUBERT et al., 2007b; ROZET et al., 2007b, ROZET et al., 2007c; VISWANATHAN et al., 2007). O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto aleatórios. O conceito do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por



analistas. Além disto, é uma medida compreensiva simples do desempenho do método, ao invés de uma avaliação do bias do método e da variabilidade individual.

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

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

O Limite Inferior de Quantificação foi 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , 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 nesta concentração, 95 vezes em 100 o resultado obtido estará entre 1,10 e 1,39  $\mu\text{g/ml}$  de ovoalbumina.

Finalmente a Exatidão do método pode ser demonstrada com a utilização dos perfis de Exatidão em todo Intervalo de Estudo

Usamos os índices descritos por Rozet et al., (2007b), 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 ( $I_D$ ), Índice de Veracidade ( $I_V$ ) e Índice de Precisão ( $I_P$ ). No presente estudo, para testar a sensibilidade dos Índices, incluímos os resultados da concentração 0,25 $\mu\text{g/ml}$  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 (2009) de 0,64 ao empregar estes 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 comparados em diferentes Perfis de Exatidão.

A curva de calibração, realizada seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira (concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ ), não foi incluída no Perfil de Exatidão por não ter sido possível, por limitações de espaço das microplacas, correr esta concentração

em duplicata o que impede sua comparação com as demais concentrações devido ao modelo estatístico empregado que necessita calcular a variância intra-ensaios.

## **6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

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, principalmente na validação de ensaios biológicos. A abordagem do intervalo de confiança prove um controle maior dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método satisfatório.

A curva de calibração do ensaio deveria ser realizada com a concentração de padrão em 5µg/ml, garantindo melhor exatidão e precisão na detecção de ovoalbumina uma vez que a concentração recomendada não inclui esta concentração, o limite máximo admitido nas vacinas.

A pré-validação do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina demonstrou que o ensaio apresenta satisfatórias - exatidão, repetitividade, precisão intermediária e veracidade, é um método confiável e conveniente para avaliar o teor de ovalbumina.

Pretendemos publicar os resultados do presente trabalho em uma revista indexada e estender a validação a próxima fase que consistirá da validação do método em uso e deve ser realizada no Laboratório de Vacinais Virais do Departamento de Imunologia do INCQS no ano corrente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpha Diagnostic International; Mouse Anti-Ovalbumin Ig ELISA Kit Cat. No. 600-100-OGG; For Semi-Quantitative Determination of Anti-Ovalbumin Total Ig (IgG+IgA+IgM) in Biological Fluids; Instruction Manual No. M-600-100-OGG. Disponível em: <http://www.4adi.com/objects/catalog/product/extras/600-100-OGG.pdf>; em 10/01/2012.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- CATT, K., TREGGAR, G.W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. *Science*, v. 158, 1570–2. 1967.
- DeSILVA, B; Smith, W; Weiner, R; Kelley, M; Smolec, J; Lee, B; Khan, M; Tacey, R; Hill, H; and Celniker, A. Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceutical Research*, v. 20, No. 11, 1885-1900. 2003.
- DOS SANTOS, J.E.; NASCIMENTO, M.C.; DOS SANTOS, P.A.; NOGUEIRA, A.C.A.; MOURA, W.C. Aplicação do Conceito do Erro Total na validação do ensaio de potência da Vacina Oral contra a Poliomielite. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. In press, 2012.
- DUDLEY RA , EDWARDS P , EKINS RP , et al. Guidelines for immunoassay data processing. *Clin Chem* . 1985 ; 31 : 1264 – 1271.
- CROWTHER, J. F. ELISA theory and practice. *Methods in Molecular Immunology*; v. 42. Humana Press, Totowa. 1995.
- DERRINGER, G. & SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219, 1980.
- DERRINGER, G. C. "A balancing act: optimizing a product's properties". *Quality Progress*, June 1994, 51-58. 1994.
- EDQM – Council of Europe. CombiStats v4.0, [www.combistats.eu](http://www.combistats.eu)
- ENGVALL E, PERLMAN P. "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry*. v. 8 (9), 871–4.1971.
- EURACHEM. CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, English edition, 2ª ed. Prague, 2000.
- FARMACOPÉIA Brasileira, 5a Edição, volume 2 – Vacina Contra Febre Amarela. Atheneu Ed. São Paulo, SP, 2010.
- FAN, X.; SUBRAMANIAM, R.; WEISS, M. F.; MONNIER, V. M. Methylglyoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion in RAW 264.7

cells through activation of mitogen-activating protein kinase, nuclear factor kappaB and intracellular reactive oxygen species formation. Arch.Biochem.Biophys. 2003, 409, 274 - 286.

FINDLAY, J. W. A. and DILLARD, R.F.. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. The AAPS Journal; 9 (2) Article 29. E260-E267. 2007. (<http://www.aapsj.org>).

GAUDIN, V.; LAURENTIE, M. Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs. Journal of Chromatography B, 877. 2358–62. 2009.

HARTMANN, C.; J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. Pharm. Biomed. Anal. 12, 1337. 1994.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 193.

HE, X.; TSANG, T. C.; LUO, P.; ZHANG, T.; HARRIS, D. T. Enhanced tumor immunogenicity through coupling cytokine expression with antigen presentation. Cancer Gene Ther. 2003, 10, 669-677.

HAVEN MC , ORSULAK PJ , ARNOLD LL , et al . Data-reduction methods for immunoradiometric assays of thyrotropin compared. Clin Chem . 1987 ; 33 : 1207 - 1210.

HOFFMAN D. and KRINGLE R. Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models. J. Biopharm. Stat. 15:283–293. 2005.

HOFFMAN D, KRINGLE R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. Pharm Res. 24(6):1157-63. 2007.

HUBERT, Ph.; CHIAP, P.; CROMMEN, J. et al., The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. Anal. Chim. Acta. v. 391, 135–148. 1999.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. *Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches.* STP Pharma Pratiques 13(3) (2003) 101.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. J. Pharm. Biomed. Anal. v. 36, 579-86. 2004.

HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical

- procedures A SFSTP proposal—part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 45, 70-78, 2007a.
- HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 45, 82-96. 2007b.
- HUBERT, Ph.; NGUYEN-HUU, JJ.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal Part IV. Examples of application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 48, 760–71. 2008.
- INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil), Vocabulário Internacional de Metrologia, Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008) 1ª Ed. Brasileira do VIM, Tradução autorizada - JCGM 200:2008. 2008.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q5A (R1): viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, Geneva, 1999.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, 2005.
- ISO 5725, Application of the Statistics-Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement — Part 1: General principles and definitions. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 1994.
- ISO 3534-1: Statistics—Vocabulary and Symbols. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 2006.
- ISO/IEC. 17025. Competência Técnica de laboratórios de ensaio e/ou calibração. 2005.
- LEQUIN R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 (12): 2415–8.
- LI-CHAN, E. C. Y.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science and Technology*, 4th ed.; Stadelman, W. J., Cotterill, O. J., Eds.; Haworth Press: New York, 1995; 105-175.
- MEE, RW.  $\beta$ -Expectation and  $\beta$ -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics.* 1984; 26(3):251-4.
- METZ, B.; HENDRIKSEN, C.F.M.; JISKOOT, W.; KERNSTEN, G.F.A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* v. 20, 2411-2430, 2002.

- NETTO, E. J. R.. Avaliação do controle da qualidade das vacinas contra febre amarela analisadas no instituto nacional de controle de qualidade em saúde no período de 2000 a 2008. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- SAVIGE JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikoloutsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendle M. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol.* v.51, 568-75. 1998.
- SFSTP, Commission report, B. RAYMOND, A. GAILLANDRE, N. GIBELIN, N. et al. Guideline for the validation of biological assay methods; STP Pharma Pratiques, v15, n5. 364-83; 2005.
- TEZUKA, H.; YOSHIKAWA, M. Presented at the Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Tokyo, Japan, 1995; 163.
- RODBARD D , FRAZIER GR . Statistical analysis of radioligand assay data. *Methods Enzymol .* 1975 ; 37 : 3 - 22 .
- ROZET, E; CECCATO, A; HUBERT, C; ZIEMONS E, OPREAN, R; RUDAZ, S; BOULANGER B, HUBERT P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, 1158. 111–125. 2007a.
- ROZET E; WASCOTTE V; LECOUTURIER N; PRÉAT V; DEWÉ W; BOULANGER B; HUBERT Ph. 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* 591. 239-47. 2007b.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, E.; RUDAZ, S. BOULANGER, B.; HUBERT, P.; *J. Chromatogr. A*; Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. 1158, 126-37. 2007c.
- STREEL B, CECCATO A, KLINKENBERG, R, HUBERT Ph. Validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of loperamide in human plasma. *J. Chromatogr. B* 814, 263-273. 2005.
- USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA) - Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, 2001. Disponível em: [www.fda.gov/.../GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf](http://www.fda.gov/.../GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf)
- USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA). Process Analytical Technology (PAT) Initiative, FDA,

Rockville, MD, 2004. Disponível em:  
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070305.pdf>)

USDHHS - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - Food and Drug Administration (FDA), International Conference on Harmonization (ICH): Quality Risk Management (Q9), Fed. Regist., v. 71. 32105–32106. 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073511.pdf>

USP-UNITED STATES PHARMACOPOEIA, mon. <1033>; Biological Assay Validation. 2010.

VAN WEEMEN BK, SCHUURS AH. "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.". FEBS Letters 15 (3): 232–6, 1971.

VIDOVIC, D.; GRADDIS, T.; CHEN, F.; SLAGLE, P.; DIEGEL, M.; STEPAN, L.; LAUS, R. Antitumor vaccination with HER-2-derived recombinant antigens. Int. J. Cancer. 2002, 102, 660–664.

WIDE, L; and PORATH, J. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. Biochem Biophys Acta; 30: 257–60; 1966.

YALOW R, BERSON S (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". J. Clin. Invest. 39: 1157–75.