

Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite

Use of the total error approach for validating the potency assay for oral poliomyelitis vaccine

RIALA6/1420

Jarbas Emílio dos SANTOS¹, Michele Cardoso do NASCIMENTO¹, Patrícia Alves dos SANTOS¹, Ana Cristina de Almeida NOGUEIRA^{2,3}, Wlamir Corrêa de MOURA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ; Telefone: (21) 3865-5130, e-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br

²Coordenação de Pós-Graduação, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ- RJ.

³Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, FIOCRUZ- RJ.

Recebido: 16.08.2011 - Aceito para publicação: 11.11.2011

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se uma abordagem alternativa na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite para traçar o perfil deste ensaio, levando-se em conta a grande variabilidade de ensaios biológicos. Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica da "International Conference on Harmonization" aplicada aos ensaios biológicos e a abordagem do Conceito do Erro Total. As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a veracidade, a precisão e a exatidão. Foram ainda avaliadas: a adequação do ensaio aos critérios de aceitação preconizados pelo *Food and Drug Administration* (EUA) para validação, adotando-se a variação máxima aceita de 20%, a reprodutibilidade do ensaio em uma abordagem prática, com o uso das variâncias entre os resultados de potência de 39 lotes da vacina (do mesmo produtor) obtidos no INCQS e no laboratório produtor, por amostra, para calcular o Coeficiente de Variação geométrico geral. Foi também determinada a Incerteza de Medição do Teste. O ensaio apresentou veracidade e precisão satisfatórias, o que demonstrou sua Exatidão satisfatória para a intenção de uso nas duas abordagens de validação.

Palavras-chave. vacinas, poliomielite, validação, bioensaios, controle da qualidade, erro.

ABSTRACT

The present study was carried out using an alternative approach for validating the potency assay of Oral Polio Vaccine. Owing to the high variability of biological assays, two approaches were utilized to validate the test: the "International Conference on Harmonization" classical approach and the Total Error approach. The main parameters evaluated for the validation study were the trueness, precision and accuracy, seeing that it is a quantitative assay. Also, additional parameters were assessed: the assay adequacy to the acceptance criteria for validation described by the Food and Drug Administration (USA) by determining 20% as the maximum variability, the test reproducibility in a practical approach, using the variance among the potency results of 39 vaccine lots (from the same producer) obtained from the producer laboratory and from the National Control Laboratory, per sample, to calculate the overall geometric coefficient of variation. The Uncertainty of Measurement of Test was also determined. The potency assay has presented good trueness and precision what demonstrated suitable accuracy for the intended use in the two validation approaches.

Keywords. poliomyelitis, validation, bioassay, quality control, bias.

INTRODUÇÃO

Os bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas distinguem-se de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores-alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos oriundos da base biológica, eles tipicamente exibem maior variabilidade em relação aos testes baseados em química¹.

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da “*International Conference on Harmonization*” (ICH)². Entretanto, na introdução deste guia part II, é afirmado que “devido à sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos, em alguns casos, podem ser abordados diferentemente deste documento”³. Partindo desta premissa, uma comissão da “*Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*” (SFSTP)⁴ desenvolveu um guia prático específico para a validação de ensaios biológicos aplicando a abordagem clássica da ICH².

A ANVISA⁵ considera metodologias analíticas descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos por este órgão, como validadas, e para métodos não validados, determina que a validação garanta, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A ICH² recomenda que para estudos de validação de ensaio de natureza quantitativa, as duas características mais relevantes a serem avaliadas são a exatidão (grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando⁶) e a precisão (grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas⁶). No entanto, a interpretação deste guia é confusa, misturando a avaliação do Erro Sistemático, representada pelo critério de veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão³. A Norma ISO 5725⁷ provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definido como a soma da veracidade e da precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”, desde sua publicação inicial em 1997⁸, tem sido difundida pela comissão SFSTP⁹, e já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias como descrito por Hubert et al.⁹.

Este conceito se baseia na utilização de um intervalo de conteúdo- β de tolerância, inicialmente proposto por Mee¹⁰ que define um intervalo, combinando a veracidade e a precisão calculadas, contendo uma proporção esperada β de futuros resultados; seguindo a notação clássica em estatística, β representa a probabilidade de ocorrência do Erro tipo II – a probabilidade de aceitar-se a hipótese nula quando ela está errada, que neste contexto corresponderá ao erro de concluir que um resultado esteja satisfatório quando ele estiver insatisfatório¹¹. Esta abordagem global considera um procedimento satisfatório se a probabilidade de que a diferença entre cada medida de uma amostra e seu “valor verdadeiro” esteja dentro de limites de aceitação predefinidos pelo analista. O valor dos limites deve ser escolhido de acordo com o objetivo de uso dos resultados. O objetivo é ligado às normas utilizadas para o ensaio (e.g. 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc.)¹².

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do “*Food and Drug Administration*” (FDA)¹, preconizam que pelo menos 67% (4 em 6 resultados) das amostras de controle da qualidade devem estar entre 15% do seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério ficou conhecido como a regra 4-6-15¹³.

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 utilizadas⁶ e segundo a EURACHEM¹⁴, 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 medição¹⁵.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), no país, é o Laboratório Nacional de Controle (LNC) e realiza o controle da qualidade de todas as vacinas que compõem o calendário de rotina formulado pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), como por exemplo, a vacina tríplice viral contra sarampo, caxumba e rubéola (“*Measles, Mumps and Rubella*” – MMR), vacina contra febre amarela e a vacina Oral Contra Poliomielite (“*Oral Poliomyelitis Vaccine*” - OPV).

Sistemas de garantia da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação correntes (BPFc, criadas pelo FDA na década de 1960) e a Norma ISO/IEC 17.025¹⁶ requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Embora a ANVISA⁵ considere que métodos farmacopeicos não requeiram revalidação, 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.

A poliomielite (do grego *pólios*, cinzento, e *myelos*, medula espinhal) é uma doença infecto-contagiosa de origem viral aguda causada por poliovírus. Dois tipos de vacina contra a poliomielite estão disponíveis atualmente: uma em que o vírus está inativo que é a vacina contra a pólio inativada (IPV), originalmente desenvolvida em 1955 por Jonas Salk, e uma vacina oral de vírus vivo atenuado (OPV), desenvolvida por Albert Sabin, em 1961. Ambas as vacinas são muito eficazes contra os três sorotipos de poliovírus¹⁷.

No ensaio de potência da OPV, trivalente atenuada, o tipo utilizado no Brasil, tanto o conteúdo de vírus total, quanto os sorotipos, separadamente, são determinados em um ensaio *in vitro*, utilizando células da linhagem Hep2C, sendo o título viral expresso em \log_{10} CCID₅₀ (*Cell Culture Infectious Dose 50%* em logaritmo base 10) por dose. As titulações individuais dos sorotipos, utilizando misturas de soros tipo-específicos, devem ser realizadas pelo fabricante e pelo LNC para a liberação de lotes da vacina. Para cada ensaio de OPV deve-se incluir um frasco com uma preparação de referência de trabalho, cujo título tenha sido adequadamente estabelecido, para controlar a precisão e a reprodutibilidade do sistema de ensaios¹⁷. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde)¹⁸, as vacinas de referência e teste devem apresentar variação máxima de título de $\pm 0,5 \log_{10}$; e o título esperado será baseado na média geométrica dos títulos de todos ensaios válidos da vacina de referência realizados antes do estudo de validação e os títulos encontrados para esta vacina devem estar dentro dos limites de confiança pré-estabelecidos para o teste.

A proposta desta pesquisa é avaliar novas abordagens para validação de métodos analíticos no ensaio de potência da vacina oral contra Poliomielite, levando em conta a maior variabilidade de ensaios biológicos, com a finalidade de demonstrar que o ensaio apresenta exatidão e precisão satisfatórias para a quantificação da potência de vacinas na liberação de lotes.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão de dados

O presente estudo foi dividido em duas fases de análise retrospectiva de dados, utilizando os dados brutos de um total de 17 ensaios de potência para cada um dos componentes de poliovírus da vacina (sorotipo 1, 2 e 3 e trivalente) realizados no período de 2008 e 2009 que utilizaram a vacina de referência em uso, lote 24-A.

A Fase 1 consistiu um pré-estudo, que utilizou os resultados de quatro ensaios e visou padronizar os títulos da vacina de referência de trabalho de OPV lote 24-A que, posteriormente, foram utilizados para avaliação da veracidade do ensaio na Fase 2, que consistiu no estudo de validação do ensaio de potência da OPV utilizando os resultados dos demais 13 ensaios de potência de rotina, visando à avaliação da veracidade, da precisão e da exatidão do ensaio utilizando as abordagens, tradicional e do Conceito do Erro Total. Os títulos originalmente calculados manualmente pelo método de Spearman e Karber^{19,20}, foram recalculados pelo método de probitos utilizando o *software* CombiStats²¹ para obtenção da CCID₅₀/dose em logaritmo base 10 (\log_{10} CCID₅₀), visando reproduzir uma estimativa de Spearman e Karber uma vez que a OMS recomenda este método estatístico para os cálculos da potência de OPV¹⁷, a utilização do CombiStats, produzido e validado pelo “*European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*” (EDQM) para análise de dados estatísticos de ensaios biológicos de diluição ou de potência, de acordo com os métodos de cálculos descritos no capítulo 5.3 da Farmacopeia Europeia²², permitiu obter critérios de validade dos ensaios como inclinação e linearidade da curva dose resposta e intervalos de confiança de 95% das determinações de potência.

Os ensaios utilizados no estudo foram realizados seguindo os critérios da Norma ABNT ISO/IEC 17.025¹⁶, como qualificação de equipamentos e treinamento dos analistas e atenderam aos critérios para ensaios válidos descritos na Farmacopeia Brasileira²³.

Fase 1 - Padronização do título da vacina de referência lote 24-A

Para que fosse possível o cálculo da veracidade (bias) foi realizada a padronização do título da vacina de referência lote 24-A em \log_{10} CCID₅₀/dose, avaliada frente ao padrão internacional do NIBSC, para cada sorotipo viral, em 5 replicatas (n=5) em 4 sessões (k=4), obtendo-se um total de 20 resultados para cada tipo viral, os resultados em \log_{10} CCID₅₀ obtidos para cada tipo viral

nos diferentes ensaios foram combinados para obtenção de uma média ponderada²⁰ considerada o título padronizado, após a avaliação da homogeneidade dos resultados pelo teste C de Cochran^{24, 25} para possível existência de valores aberrantes. Os valores aberrantes seriam excluídos dos cálculos finais de título, caso ocorressem.

Fase 2 - Validação do Ensaio de Potência

Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica ICH², aplicada aos ensaios biológicos de acordo com as recomendações descritas pela comissão da SFSTP⁴; e a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações também da SFSTP⁸, aplicadas como descrito por Hoffman e Kringle¹³ e Boulanger et al.¹².

Veracidade

Para avaliar a veracidade, inicialmente foi estabelecido o título em \log_{10} CCID₅₀/dose do lote de vacina de referência 24-A para cada componente viral. As médias ponderadas obtidas para cada componente viral, no estudo de estabelecimento da referência 24-A, foram utilizadas como valores esperados para o ensaio. O *bias*% (diferença percentual entre a média dos títulos observados expressa em \log_{10} CCID₅₀/dose e o título esperado expresso em \log_{10} CCID₅₀/dose) foi calculado para cada componente viral da vacina e o teste-t de Student foi usado para comparar as médias.

Os Critérios de aceitação da veracidade foram: a) na abordagem clássica ICH² o *bias* não poderia ser estatisticamente significativo no teste-t de Student ($\alpha = 0,05$)⁴; e b) na abordagem do conceito do Erro Total o *bias* não poderia ser maior que $\pm 20\%$.

Precisão

A precisão foi avaliada com os resultados de potência em \log_{10} CCID₅₀/dose, obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina ($k = 13$) com duas replicatas por ensaio ($n = 2$) utilizando a vacina de referência lote 24-A. Os resultados foram submetidos ao teste C de Cochran, para avaliar se havia diferença significativa entre as variâncias e, posteriormente, à análise de variância de delineamento inteiramente casualizado (“one-way” ANOVA), sendo que os quadrados médios intra e entre-ensaios foram usados para obter estimativas das variâncias intra-ensaios, entre-ensaios e total (variância intra-ensaios + variância entre-ensaios), para determinar a repetitividade, a precisão enter-ensaios e a precisão intermediária, respectivamente. A ANOVA

serviu ainda para verificar se houve diferença significativa entre os resultados obtidos entre as replicatas (n) e as sessões de ensaio (k) e o Intervalo de confiança de 95% da precisão intermediária foi calculado, como recomendado pela SFSTP⁴, com duas replicatas ($n=2$) em uma repetição de ensaio ($k=1$), as mesmas condições de uso em rotina.

Os critérios de aceitação para a precisão foram definidos como: a) na abordagem clássica ICH, o limite de 95% de confiança para Precisão Intermediária não poderia ser maior que $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, como preconizado para titulação de suspensões virais²⁶; e b) na abordagem do conceito do Erro Total o gCV% da Precisão Intermediária não poderia ser maior do que 20%.

Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total, segundo Hoffman e Kringle¹³, foi construído um Intervalo de conteúdo- β (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) de 95%, com nível de confiança γ de 95%. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o *bias* e a precisão intermediária e demonstra a exatidão do método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de $\pm 20\%$ (A, B), quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como exato; quando não, o método não foi aceito.

Critério de aceitação 4-6-20%

Foi avaliada a proporção de resultados de potência obtidos no estudo de validação pela vacina de referência 24-A, para cada componente viral que apresentou dentro do intervalo esperado para exatidão de $\pm 20\%$ para (A, B) visando determinar se o ensaio obedece ao critério de aceitação 4-6-15%, como descrito pelo FDA¹, adotando a variação máxima aceita de 20% (4-6-20). Este critério preconiza que pelo menos 4 (66,7%) em 6 ensaios apresentem resultados dentro da faixa de $\pm 20\%$.

Determinação da reprodutibilidade do ensaio

Uma vez que não foi realizado um estudo colaborativo convencional onde as mesmas amostras seriam analisadas em uma matriz de ensaios, nos dois laboratórios, como uma etapa adicional na validação do método, foi adotada uma abordagem prática na avaliação da reprodutibilidade (precisão entre laboratórios²), quando os resultados de potência de 39 lotes obtidos por um mesmo Laboratório Produtor e pelo INCQS foram comparados por meio da determinação da variação média entre os resultados dos dois laboratórios e para diferentes amostras

testadas. Isto foi realizado calculando a média das variâncias entre os resultados obtidos no INCQS e pelo produtor para determinação do Coeficiente de Variação geométrico²⁷. O mesmo critério de aceitação de 20% de variação máxima entre os resultados dos dois laboratórios foi usado, como na avaliação da precisão no Conceito do Erro Total.

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 EURACHEM¹⁵. A Incerteza Expandida provê um intervalo que deve incluir o valor mensurando com um alto nível de confiança, sendo obtida por meio da multiplicação da u_c pelo fator de abrangência (K). Foi utilizado $K = 2$ para 26 amostras ($gl = 25$) garantindo 95% de nível de segurança.

RESULTADOS

Os resultados finais obtidos na padronização dos títulos dos componentes da vacina de referência lote 24-A podem ser observados na tabela 1. Não ocorreram valores aberrantes.

Abordagem clássica ICH

Veracidade

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação da veracidade do método para os quatro componentes virais. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em \log_{10} CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de referência 24-A com o título esperado para cada componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência (tabela 1). O teste-t de Student foi aplicado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($\alpha=0,05$, $gl=25$).

Tabela 1. Resultados obtidos nos ensaios de padronização do título da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para os quatro Componentes Virais

Componente Viral	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média Ponderada*	6,91	6,93	5,96	6,66
DP geral	0,053	0,581	0,064	0,059
gCV% intra (3 gl)	11,26	11,44	11,67	11,43
gCV% entre (16 gl)	10,29	10,19	10,56	10,31
P.I. (19 gl)	11,30%	11,46%	11,78%	11,47%

DP = desvio padrão; gl = graus de liberdade; gCV = coeficiente de variação geométrico; * \log_{10} CCID₅₀ = Cell Culture Infectious Dose 50%; P.I. = Precisão Intermediária

Tabela 2. Avaliação da Veracidade – Bias percentual e Teste-t de Student bi-caudal

	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média obtida	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
dp	0,069	0,053	0,050	0,054
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
T _{calc}	0,01	1,35	0,41	1,43
N	26	26	26	26
gl	25	25	25	25
Conclusão	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.

T_{crítico} = -2,06 a 2,06; $\alpha = 0,05$; $t = 0,975$; Título esp. =

Título esperado; dp = desvio padrão; gl = graus de liberdade;

T_{calc} = T calculado; N = número de ensaios; Satisf. = Satisfatória

Precisão

Os resultados obtidos nos ensaios para cada componente viral foram avaliados e considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$, o que permitiu a realização da análise de variância, que demonstrou que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentro as sessões (k) de ensaios. Assim, usando os dados da precisão, foram calculadas a repetitividade (gCV% intra) e precisão entre ensaios (gCV% entre), para os quatro componentes virais, que puderam ser combinadas para obtenção da precisão intermediária e um intervalo de confiança de 95% foi construído, com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (k) e duas replicatas (n) e comparado com o intervalo esperado de $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose como recomendado em ICH Q5A R1²⁴. A tabela 3 apresenta as médias gerais, a precisão intra e entre-ensaios, a precisão intermediária e os intervalos de confiança, calculados para $n=2$ e $k=1$, para cada componente viral da vacina.

Conceito do Erro Total

Veracidade

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da veracidade do método para os quatro componentes virais utilizando a abordagem do Erro Total. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em \log_{10} CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de referência 24-A com o título esperado para cada componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência. Os resultados obtidos não poderiam ser menores do que o limite de aceitação de $\pm 20\%$ para o bias.

Tabela 3. Análise estatística dos resultados do ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais na avaliação da Precisão

Componente Viral	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média Geral (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,91	6,94	5,96	6,67
DP geral	0,07	0,05	0,05	0,05
gCV% intra (12 gl)	11,97	11,27	11,02	11,19
gCV% entre (13 gl)	11,82	10,47	11,36	11,09
P.I. (25 gl)	12,78	11,36	11,74	11,65
IC 95% P.I. (n=2 e k = 1) log ₁₀ CCID ₅₀	±0,19	±0,09	±0,13	±0,12
Limite de aceitação log₁₀ CCID₅₀	±0,5			

CCID₅₀ = Cell culture infectious dose 50%; n = n° de replicatas por ensaio; k = n° de sessões (corridas) de ensaios; DP = desvio padrão; gl = graus de liberdade; gCV = coeficiente de variação geométrico; P.I. = precisão intermediária; IC95% = intervalo de confiança de 95%

Tabela 4. Avaliação da veracidade (bias%), da precisão e da exatidão para o ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total com nível de conteúdo β de 95% e Nível de confiança γ de 95% para 26 resultados

	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
dp	0,0695	0,0527	0,0501	0,0536
Intervalo β abs	6,72 - 7,10	6,79 - 7,09	5,81 - 6,12	6,52 - 6,83
Intervalo β %	-2,8 a 2,8	-2,0 a 2,4	-2,5 a 2,6	-2,2 a 2,6
GL	25	25	25	25
Lim. Aceit. (A, B)	±20%	±20%	±20%	±20%
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
gCV% P.I.	18,88	14,60	14,29	15,22
Conclusão	Exato	Exato	Exato	Exato

Título Esp. = Título Esperado; dp = desvio padrão; gCV% = Coeficiente de Variação geométrico %; Intervalo β = intervalo de conteúdo β; abs = valores absolutos; GL = graus de liberdade; Lim. Aceit. = Limites de aceitação; P.I. = Precisão Intermediária

Tabela 5. Análise estatística das diferenças entre os resultados de potência do Laboratório Produtor e do INCQS para 39 lotes de OPV

Componente	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Diferença média	0,170	0,044	0,061	0,339
LSC_{95%}	0,302	0,106	0,168	0,548
LIC_{95%}	0,038	-0,019	-0,047	0,130
KS	0,367	0,619	0,347	0,100
N	39	39	39	39
DP	0,0726	0,0413	0,0581	0,1391
gCV%	13,62	11,13	11,44	17,89

gCV% = Coeficiente de Variação geométrico; KS = Teste de Kolmogorov Smirnov para distribuição normal (α>0,05); DP = Desvio padrão; LIC, LSC = limites inferior e superior de confiança 95%; N = número de ensaios

Precisão

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da precisão do método para os quatro componentes virais. Os resultados foram obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina (k = 13), com duas replicatas por ensaio (n = 2) e utilizando a vacina de referência lote 24-A. O Coeficiente de Variação geométrico da Precisão Intermediária não poderia ser maior do que 20%.

Exatidão

O intervalo de conteúdo-β calculado foi comparado com os limites esperados (A, B) de ±20%, devendo situar-se dentro destes limites.

Critério de aceitação 4-6-20%

Foi avaliada a porcentagem de resultados dentro do intervalo esperado (A, B) para exatidão de ±20% para cada um dos componentes virais. A proporção foi superior aos 66,7% preconizados em todos os resultados (100% Trivalente, 100% Tipo I, 100% Tipo II e 95,83% Tipo III).

Reprodutibilidade

Foi calculada utilizando a média das variâncias entre os resultados de potência obtidos pelo INCQS e pelo Laboratório Produtor. A tabela 5 demonstra a análise estatística das diferenças absolutas entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor para a potência em log₁₀ CCID₅₀/dose de 39 lotes da OPV de todos os quatro componentes virais. O Coeficiente Geométrico de variação entre os resultados destes dois laboratórios, para o componente trivalente, foi 13,62%, a diferença média 0,170 (IC95% 0,038 a 0,302) e o desvio padrão 0,0726.

Incerteza de Medição

A Incerteza Padrão Combinada (u_c) e a Incerteza Expandida (U) para os diferentes componentes virais foram: Trivalente ($u_c = 0,0113$; $U = \pm 2,26\%$); Tipo I ($u_c = 0,0074$; $U = \pm 1,49\%$); Tipo II ($u_c = 0,0070$; $U = \pm 1,41\%$); e Tipo III ($u_c = 0,0073$; $U = \pm 1,47\%$).

DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para a validação do ensaio de potência de OPV. As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a veracidade, precisão e a exatidão, avaliadas pela abordagem clássica ICH² e pela aplicação do conceito do Erro Total⁸; foram ainda avaliadas a adequação ao critério de aceitação da exatidão 4-6-15 descrito pelo FDA¹, adotando a variação máxima aceita como 20% (4-6-20) e em uma abordagem prática, a média das variâncias entre os resultados obtidos no INCQS e no laboratório produtor (por amostra), foi utilizada para calcular o gCV% geral para determinar a reprodutibilidade do ensaio.

A interpretação do guia ICH² é confusa, misturando a avaliação do erro sistemático, representada pelo critério de veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão³. A Norma ISO 5725⁷ provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definido como a soma da veracidade e da precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos é chamada de “Conceito do Erro Total”.

A avaliação da veracidade com a abordagem do conceito tradicional ICH² demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias dos títulos obtidos no ensaio de validação e o valor esperado em nenhum dos quatro componentes virais (bias apresentada: Trivalente = 0,002%; Tipo I = 0,201%; Tipo II = 0,068%; Tipo III = 0,225%) quando testados com o teste t de Student como recomendado pela SFSTP⁴. Desse modo, nosso estudo demonstrou que o ensaio de potencia para OPV apresentou veracidade satisfatória. Embora os ensaios para todos os componentes tenham apresentado bias satisfatório, a faixa de aceitação deste parâmetro pelo teste t de Student é muito estreita e aceitou diferenças apenas da ordem de $\pm 0,02 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, nas condições obtidas no estudo, corresponderam a um bias% de 0,34%. Gibelin et al.³ adotaram como critério de aceitação $\pm 0,2 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para avaliação da

exatidão, seguindo a abordagem clássica da ICH. Embora os autores não tenham escalarecido no trabalho publicado o porquê da adoção deste valor, ele correspondeu a um bias de $\pm 2x$ desvio padrão da Precisão Intermediária, que é uma abordagem alternativa, mais coerente resultando em menor reprovação de ensaios satisfatórios. Também com esta finalidade, a OMS¹⁸ estabelece que uma variação de $\pm 0,5 \log_{10}$ é satisfatória entre titulações de vacinas contra pólio oral.

Apesar de na abordagem convencional ICH² os critérios de aceitação pré-estudo para métodos bioanalíticos requererem, dentro da avaliação da exatidão, que a média observada esteja entre $\pm 15\%$ do valor nominal⁸.

Nossos resultados mostram que, quando aplicado o conceito do Erro Total para o cálculo da Exatidão, os ensaios de potencia para os quatro componentes virais foram considerados exatos por apresentarem intervalos de confiança (Trivalente, -2,8 a 2,8%; Tipo I, -2,0 a 2,4%; Tipo II, -2,5 a 2,6%; Tipo III, -2,2 a 2,6%) menores que os limites esperados (A, B) de $\pm 20\%$.

Boulanger et al.⁹, descrevem que estes limites esperados devem ser ligados às normas utilizadas para o ensaio e descrevem os valores utilizados na rotina de 1% ou 2% no granel, 5% em especialidades farmacêuticas, 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc. No entanto, a OMS²⁸ descreveu que ensaios de ligação têm, em geral, uma variabilidade de 5 a 20%, enquanto ensaios em animais ou células podem ter uma variabilidade maior do que 50%.

Aplicando o conceito do Erro Total Gibelin et al.³, adotaram os limites de aceitação de $\pm 30\%$ do valor de referência para os valores de concentração das amostras expressos em \log_{10} CCID₅₀/ml para um ensaio de titulação viral em cultivo celular, porém do tipo ensaio de ligação.

O ICH Q5A R1²⁴, para avaliação de segurança de produtos biotecnológicos que utilizam vírus, estabelece que para a aceitação da precisão de métodos, o limite de 95% de confiança para precisão intermediária deve ser menor ou igual a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose. Com o intuito de avaliar a Precisão Intermediária foram calculados, para cada componente viral, os intervalos de confiança para uma sessão de ensaio ($k=1$) com duas replicatas ($n=2$) e com o desenho usado na rotina. Os resultados obtidos foram $\pm 0,19 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Trivalente, $\pm 0,09 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo I, $\pm 0,13 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo II e $\pm 0,12 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo III. É possível

notar, por meio da análise de variância, que não houve diferença significativa entre os resultados de replicatas (n) e de sessões (k) para o ensaio de potência de nenhum dos componentes virais. Em caso de necessidade de repetições para obtenção de maior precisão, tanto poderia ser aumentado o número de replicatas por ensaio, quanto o número de repetições de ensaios.

Os resultados demonstraram que todos os intervalos de confiança de 95%, calculados para a Precisão Intermediária dos quatro componentes virais, foram inferiores a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, critério recomendado pela ICH Q5A R1²⁴ como satisfatória para titulações *in vitro* de vírus. Portanto, a precisão do ensaio pode ser considerada satisfatória para a intenção de uso (determinação da potência de vacinas contra Poliomielite por meio da determinação do título viral em \log_{10} CCID₅₀/dose).

A utilização da abordagem do Erro Total, para validação, requer que se escolham os níveis apropriados de conteúdo (β), nível de confiança (γ) e os limites de aceitação; normalmente são usados para ensaios bioanalíticos, 66,7% de conteúdo, 90% de confiança e $\pm 15\%$ de limites de aceitação, que se baseiam nas recomendações do FDA¹. Porém, Boulanger et al.¹² consideram a utilização de níveis de conteúdo de 66,7% inapropriados e para garantir que 90% das corridas sejam aceitas, quando o processo de medida continua válido, os níveis de conteúdo devem ser de no mínimo 80%, tornando as normas de decisão mais consistentes.

No presente estudo, foram adotados os níveis de conteúdo e de confiança de 95%, mais comumente utilizados em estudos biológicos e os mesmos usados por Gibelin et al.³ para a validação de um ensaio de detecção de atividade viral em células, porém com um limite de aceitação A e B de 20%, enquanto os autores escolheram 30%, como sugerido para o sistema de detecção de ensaios de ligação de antígenos, ensaio utilizado no referido estudo. Os resultados demonstraram uma variabilidade menor no ensaio de potência para OPV quando comparados aos encontrados por Gibelin et al.³ para a detecção do Vírus da Leucose Aviária durante o processo de produção de vacina contra este vírus.

Os coeficientes de variação calculados para a Precisão Intermediária de 18,88% (Trivalente), 14,60% (Sorotipo I), 14,29% (Sorotipo II) e 15,22% (Sorotipo III) foram menores que os limites de aceitação de $\pm 20\%$. Desse modo, os ensaios para os quatro componentes virais podem ser considerados com precisão satisfatória

para a intenção de uso, determinação da Potência de Vacina Oral contra Póliomielite.

A Incerteza Expandida (U) dos resultados foi calculada utilizando um fator $K = 2^{15}$, que representa um intervalo que envolve os resultados no qual o valor verdadeiro desconhecido deve estar compreendido com uma confiança de 95%. A maior Incerteza encontrada nos ensaios foi a determinação do título Trivalente, $\pm 2,26\%$. Então, quando o ensaio for realizado na rotina para este componente, a Incerteza dos resultados será, de no máximo, $\pm 2,26\%$.

A avaliação da reprodutibilidade, utilizando a variância entre os resultados obtidos por um mesmo laboratório produtor e pelo INCQS para a potência dos quatro componentes virais em \log_{10} CCID₅₀/dose para 39 lotes de OPV, apresentou Coeficiente de Variação geométrico inferior ao limite de aceitação de 20% para os quatro componentes virais, assim como a média das diferenças entre os títulos, que também se apresentou sempre inferior à $\pm 0,5 \log_{10}$, o que constitui uma variação entre resultados de ensaios aceita pela OMS¹⁸.

CONCLUSÃO

Os critérios de aceitação da *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (SFSTP)⁴ para o conceito do Erro Total para validação de métodos apresentam vantagens sobre os critérios baseados na estimação de pontos para avaliar a veracidade e precisão e demonstrar a exatidão, principalmente na validação de ensaios biológicos. A abordagem do intervalo de confiança provê maior controle dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método satisfatório.

O ensaio de potência para OPV apresentou os critérios de veracidade, repetitividade, precisão entre-ensaios, precisão intermediária e reprodutibilidade satisfatórios, ou seja, é um método exato, confiável e conveniente para avaliar a potência destas vacinas.

REFERÊNCIAS

1. US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration - FDA. Center for Biologics Evaluation and Research - CBER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville; 2001.
2. 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.

3. Gibelin N, Dupont D, Imbert S, Rozet E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J Chromatogr B*. 2009;877:2407-11.
4. Societé Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques – SFSTP. Commission report. Raymond B, Gaillandre A, Gibelin N, Maignan N, Michalski C, Nabet P, et al. Guideline for the validation of biological assay methods. *STP Pharma Pratiques*. 2005;15(5):364-83.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2 jun. 2003.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil). Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008), Tradução autorizada - JCGM 200:2008. Rio de Janeiro; 2008.
7. ISO 5725, Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement-Part 4, Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method, International Organization for Standardization (ISO). Geneva; 1994.
8. Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Boulanger B, Chevalier P, Chiap P, et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma Pratiques*. 1997;7:169-94.
9. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal: part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36:579-86.
10. Mee RW. β -Expectation and β -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics*. 1984;26(3):251-4.
11. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem*. 2004;380:502-14.
12. Boulanger B, Dewé W, Gilbert A, Govaerts B, Maumy M. Risk management for analytical methods: conciliating objectives of validation phase and routine decision rules. *Chem Intell Lab Sys*. 2007;86:198-207.
13. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
14. Eurachem. CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, English edition, 2^a ed. Prague; 2000.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil). A estimativa da incerteza de medição pelos métodos do ISO GUM 95 e de simulação de Monte Carlo, DIMEC, nt-02/2008. Rio de Janeiro; 2008.
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (Rio de Janeiro - Brasil) NBR ISO/IEC 17.025:2005: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
17. World Health Organization - WHO. Polio Laboratory Manual, 4^a ed. Geneva; 2004.
18. World Health Organization - WHO. Manual of Laboratory Methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization, Live Oral Polio Vaccine. Geneva; 1997. p.59-64. (WHO/VSQ/97.04).
19. Spearman C. The method of “right and wrong” cases (Constant Stimuli) without Gauss's Formulae. *Br J Psychol*. 1908;2:227-42.
20. Karber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1931;162:480-7.
21. CombiStats v4.0 [homepage na internet], EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare – Council of Europe. Disponível em: www.combistats.eu
22. Council of Europe. Chapter 5.3 - Statistical analysis of results of biological assays and tests. In: *The European Pharmacopoeia*. 6^a ed. Strasbourg; 2008. p.571-600.
23. Farmacopéia Brasileira, 4^a ed. fasc. 5, São Paulo: Atheneu, 2003.
24. Cochran WG. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Eugen (London)*. 1941;11:47-52.
25. Cochran WG. Testing a linear relation among variances. *Biometrics* 1951;7:17-32.
26. 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.
27. Kirkwood TBL. Geometric mean and measures of dispersion. *Biometrics*. 1975;35:908-9.
28. World Health Organization - WHO. Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. In: *WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements*. Part 2. Geneva; 1997.p.65-73.