

Procedimento Gerencial de Validação de Métodos

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 269

PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Maurício Antônio Lopes
Clarissa Silva Pires de Castro
José Manuel Cabral de Sousa Dias

Editores Técnicos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

L 864 Lopes, Maurício Antônio
 Procedimento gerencial de validação de métodos. / Maurício Antônio
 Lopes, Clarissa Silva Pires de Castro, José Manuel Cabral de Sousa Dias. -
 - Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
 19 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
 ISSN 0120-0110 ; 269).

1. Sistema da qualidade. 2. Procedimento gerencial. 3. Validação de
métodos. I. Lopes, Maurício Antônio. II. Título. III. Série.

630 - CDD 21.

Editores

Maurício Antônio Lopes

PhD, Agrônomo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail:

Clarissa Silva Pires de Castro

PhD, Química, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail:

clarissa@cenargen.embrapa.br

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Dr.; Eng. Químico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail:

Cabral@embrapa.br

Apresentação

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em seu IV Plano Diretor Estratégico¹, busca por meio da Diretriz 7, garantir a excelência dos resultados técnicos e manter-se competitiva e sustentável na geração de conhecimento e tecnologias, na prestação de serviços e na inovação, por meio da permanente evolução do seu corpo técnico e gerencial e do cumprimento dos requisitos das normas de qualidade.

A inovação tecnológica e a implantação de um Sistema de Qualidade (SQ) são mudanças comuns à maioria das Instituições que buscam a eficácia e a melhoria contínua de seus produtos e processos. A implantação do SQ da Embrapa Recursos Genéticos teve seu início em 11 de março de 2005 e segue um Plano de Ação composto por 12 metas. Uma das atividades que compõe este Plano é a elaboração, verificação, aprovação, distribuição e implantação de todos os documentos do Sistema da Qualidade, dentre os quais se destaca o **Procedimento Gerencial de Validação de Métodos**.

O *Procedimento Gerencial de Validação de Métodos* é composto por sete capítulos, os quais estabelecem critérios para o planejamento da validação e revalidação de métodos de ensaios realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A publicação deste procedimento gerencial fornece a todos que buscam acreditar seus laboratórios com base na NBR ISO/IEC 17.025 e nas Boas Práticas de Laboratório, as orientações necessárias para a elaboração de um POP que defina como validar e revalidar métodos quantitativos e semi-quantitativos com o objetivo de demonstrar que os métodos satisfazem os requisitos para os quais são propostos, com exatidão e precisão.

Mauro Carneiro
Chefe Geral

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – IV Plano diretor Estratégico 2008-2011, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

SUMÁRIO

1	OBJETIVO.....	7
2	CAMPO DE APLICAÇÃO	7
3	REFERÊNCIAS.....	7
	3.1 Complementares.....	7
	3.2 Cruzadas.....	8
4	DEFINIÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS	8
	4.1 Definições.....	8
	4.2 Siglas e abreviaturas	10
5	RESPONSABILIDADES	10
6	DESCRIÇÃO	10
	6.1 Seleção e Validação de Métodos	10
	6.2 Parâmetros de validação de métodos quantitativos ou semi-quantitativos.....	12
	6.3 Parâmetros de validação de métodos biológicos.....	17
7	ANEXOS	17



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Código
038.11.00.00.2.005

Revisão
000

Cópia
Não Controlada

Página
7/17

Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Maurício Antônio Lopes
Clarissa Silva Pires de Castro
José Manuel Cabral de Sousa Dias

1 OBJETIVO

É objetivo deste POP determinar os critérios para o planejamento da validação e revalidação de métodos de ensaios realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3 REFERÊNCIAS

3.1 Complementares

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para qualidade em química analítica:** uma assistência à habilitação. Brasília: Senai, 2005. 46p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ISO GUIA33:** utilização de materiais de referência certificados. Rio de Janeiro, 2002. 28p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14597:** precisão de métodos analíticos – determinação da repetibilidade e reprodutibilidade de métodos para ensaios de produtos químicos – estudo intralaboratorial. Rio de Janeiro, 2000. 31p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 10 de junho de 2003. Adota regulamento técnico Mercosul sobre critérios para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jun. 2003. Seção 1, p. 25.

CIENFUEGOS, F. **Estatística aplicada ao laboratório.** Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 214p.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Council Directive 96/23/EC:** performance of analytical methods and the interpretation of results. Brussels, 2002. 28p.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods.** A laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: LGC, 1998. 67p.



Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

FAO / WHO. **Consideration of the methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology**. General approach and criteria for the methods. Budapest: Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, 2006. 40p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ – CGCRE – 008 Revisão 02**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007. 24p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Senai, 2007. 72p.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 62p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. 296p.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. Campinas: Átomo, 2006. 112p.

3.2 Cruzadas

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Lista Mestra de Documentos do Sistema da Qualidade (038.10.02.00.6.001)**. Revisão 000. Brasília, 2006. 42 p.

4 DEFINIÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS

4.1 Definições

Para efeito deste procedimento, são adotadas as seguintes definições:

Acurácia - grau de concordância entre um resultado de ensaio e o valor de referência aceito.

Analito - constituinte a ser detectado e / ou determinado.

Branco da amostra - matriz da amostra sem o analito de interesse.

Branco do ensaio - todos os reagentes utilizados no ensaio sem a amostra.

Comparação interlaboratorial - organização, desempenho e avaliação de ensaios nos mesmos itens ou em itens de ensaio similares, por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-determinadas.

Curva de calibração, Curva analítica - sucessão crescente ou decrescente de pontos obtidos da relação entre a concentração da espécie padrão (eixo X) pela sua intensidade de sinal (eixo Y) proveniente do sistema de detecção.

Ensaio de proficiência - determinação do desempenho de ensaios de laboratórios por meio de comparação interlaboratorial.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Código
038.11.00.00.2.005

Revisão
000

Cópia
Não Controlada

Página
9/17

Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Estabilidade - tempo durante o qual as soluções-padrão e da amostra contendo o analito podem ser usadas sem que ocorra decomposição apreciável dentro de condições estabelecidas.

Exatidão - grau de concordância entre o valor médio obtido de uma grande série de resultados de ensaio e um valor de referência aceito.

Faixa de trabalho - faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado.

Incerteza de medição – parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando.

Limite de detecção - menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais específicas.

Limite de detecção do equipamento - concentração do analito que produz um sinal de 3 a 5 vezes a razão ruído / sinal do equipamento.

Limite de quantificação - menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais específicas.

Linearidade - característica de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração.

Métodos normalizados - desenvolvidos por organizações de normalização cujos métodos são aceitos pelo setor técnico.

Métodos não normalizados - desenvolvidos pelo próprio laboratório ou adaptados a partir de métodos normalizados e validados.

Precisão - dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Precisão intermediária - precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, utilizando-se o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos.

Recuperação - medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.

Repetitividade - grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Reprodutibilidade - grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

Robustez - medida da capacidade do método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Código
038.11.00.00.2.005

Revisão
000

Cópia
Não Controlada

Página
10/17

Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Seletividade/ Especificidade - medida da capacidade do método em determinar o analito com exatidão e precisão na presença de interferentes.

Sensibilidade - medida da capacidade do método em discriminar, com precisão estabelecida, concentrações próximas de um analito.

Validação de método analítico - processo pelo qual é estabelecido, por estudos laboratoriais, que determinado método satisfaz os requisitos para o qual é proposto, com exatidão e precisão.

4.2 Siglas e abreviaturas

CTI Comitê Técnico Interno

SQ Sistema da Qualidade

NGQ Núcleo de Gestão da Qualidade

CQ Comitê de Qualidade

5 RESPONSABILIDADES

Líderes de projetos, responsáveis por planos de ação e atividades, demais pesquisadores, analistas e assistentes e NGQ.

6 DESCRIÇÃO

6.1 Seleção e Validação de Métodos

Os pesquisadores, analistas e/ou assistentes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia devem utilizar, sempre que possível, métodos oficiais, métodos normalizados ou métodos validados por fabricantes.

Em caso de validação feita por fabricantes, estes devem apresentar à Unidade os documentos que comprovem a eficácia e eficiência dos resultados da validação do método, devendo esta exigência constar do termo de referência para sua contratação para o fornecimento dos kits e reagentes envolvidos.

A documentação de validação a ser aceita para os métodos normalizados deve demonstrar que são aplicadas para o mesmo escopo e para os mesmos propósitos pretendidos nos estudos realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Nos casos de métodos não normalizados, estes devem ser validados pelo pesquisador, analista e/ou assistente antes de sua aplicação nas amostras ou estudos, em alinhamento com o líder do projeto ou responsável por plano de ação e atividade, sendo os mesmos classificados como:



Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

- a)** métodos modificados – utilização de métodos normalizados e que foram adaptados quanto ao tipo de reagente ou equipamento utilizado, realização de mudanças na sequência do método, realização do método em condições ambientais diferentes das originais ou qualquer outra alteração ao padrão estabelecido;
- b)** métodos aplicáveis a um novo escopo – aplicação de método normalizado a um novo tipo de amostra (matriz), a um novo preparo de amostra ou a um novo tipo de experimento antes não testado pelo método;
- c)** métodos desenvolvidos pelo laboratório.

Os parâmetros de validação podem variar em função da classificação do método: qualitativo, quantitativo ou semi-quantitativo. A metodologia utilizada pelo pesquisador, analista e/ou assistente para a validação deve ser descrita em formato de POP, detalhando, entre outros, os parâmetros de validação selecionados, as fórmulas para cálculos, os critérios estatísticos, as referências utilizadas. O POP é arquivado junto com a documentação do projeto ou do laboratório que o originou. Caso a metodologia de validação possa ser utilizada para mais de um tipo de método, o POP pode indicá-los no capítulo Campo de Aplicação.

Os líderes de projetos devem indicar nas propostas a serem encaminhadas ao CTI que métodos não normalizados serão utilizados e que metodologia de validação pretende aplicar, assumindo o compromisso, junto com sua equipe, de só utilizar esse método em caráter definitivo no estudo após realizar sua validação e dispor dos registros correspondentes.

Em caso de projetos cujo resultado final pretendido é o desenvolvimento de um novo método, o líder do projeto deve planejar a etapa e a metodologia de validação no próprio conteúdo do projeto antes de submetê-lo ao CTI, documentando sua realização nos registros, relatórios parciais e relatório final do projeto.

As pesquisas que envolveram métodos não normalizados ou que desenvolverem novos métodos devem ser publicadas com a documentação de sua validação.

O pesquisador, analista e/ou assistente deve registrar todos os dados e cálculos gerados a partir da aplicação da metodologia de validação, de forma contínua, identificada e datada, e manter os registros no acervo do projeto ou do ensaio, garantindo sua rastreabilidade e fácil recuperação, desde a fase de execução até o arquivamento final do projeto.

Os pesquisadores, analistas e/ou assistentes devem planejar a validação dos respectivos métodos, quando aplicável, observando a sequência indicada neste procedimento:

- a)** definir o objetivo e o escopo de aplicação do método, de forma detalhada, no projeto de pesquisa;
- b)** selecionar o método analítico a ser utilizado como referência, a partir de documentos como normas nacionais ou internacionais, livros, revistas científicas, publicações da Embrapa, textos técnicos ou guias publicados por organização de renome;
- c)** definir os parâmetros de validação a serem considerados;



Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

- d) qualificar e identificar os materiais utilizados como: padrões, reagentes, material de referência;
- e) identificar e viabilizar os registros dos possíveis elementos interferentes, inclusive das condições ambientais e mantê-los sob monitoração e controle;
- f) selecionar e realizar o preparo adequado das amostras a serem utilizadas para validação;
- g) elaborar o POP de validação desse método;
- h) executar os ensaios preliminares (teste) com o método não normalizado, conforme o POP;
- i) registrar os dados e cálculos da validação, consultando critérios estatísticos, sempre que necessário;
- j) registrar adequadamente e analisar os resultados apurados, tomando a decisão da viabilidade de aplicação do método;
- k) verificar os resultados a partir do uso de controles intra e/ou interlaboratoriais, sempre que possível.

As validações de métodos devem ser refeitas quando persistirem resultados insatisfatórios, depois de realizadas as ações corretivas ou correções necessárias, sempre registrando os novos resultados obtidos e mantendo-os no acervo de registros do projeto ou na documentação dos ensaios.

Revalidações devem ser feitas para o mesmo método quando forem implementadas alterações significativas ou houver condições diferenciadas em relação à validação anterior, incluindo mudanças quanto aos interferentes (mudança de reagente, mudança de condições ambientais, mudança de amostra etc) ou necessidade de maior acurácia em relação aos parâmetros e critérios de validação em função de definições de projetos ou solicitações de clientes.

A Unidade deve formar um grupo de profissionais habilitados que atue no NGQ ou Comitê da Qualidade, para dar orientação e discutir com os pesquisadores, analistas e/ou assistentes as metodologias de validação de métodos, podendo contar com consultores *ad hoc*.

6.2 Parâmetros de validação de métodos quantitativos ou semi-quantitativos

Os parâmetros de validação de métodos quantitativos recomendados para o uso dos pesquisadores, analistas e/ou assistentes são os seguintes, devendo-se utilizar as referências técnicas complementares necessárias para sua correta aplicação.

6.2.1 Seletividade / especificidade

Um método que produz respostas para vários analitos, distinguindo-os uns dos outros, é seletivo; já um método que produz resposta para apenas um analito é dito específico. Antes da realização do método, deve-se efetuar uma análise teórica dos componentes da matriz em relação ao seu comportamento durante o ensaio; deve-se garantir a especificidade pela análise de brancos da amostra e do ensaio.



Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Estudos de seletividade incluem a investigação de interferentes, usualmente pela adição do interferente potencial, tanto no branco quanto nas amostras com adição de padrão.

6.2.1.1 Teste de seletividade / especificidade

Os resultados dos estudos de seletividade / especificidade são utilizados para demonstrar que os efeitos não são significativos. Entretanto, uma vez que o estudo mede mudanças diretas das respostas, é possível usar dados para estimar a incerteza associada com interferentes potenciais e suas faixas de concentração.

- a) Testes com disponibilidade da matriz da amostra sem analito ou amostras de referência: partindo da hipótese de que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa, analisa-se dois grupos de amostras, um com a matriz e o outro sem. Nos dois grupos, adiciona-se concentrações do analito idênticas, na faixa de interesse, a partir do zero.
- b) Testes sem disponibilidade da matriz da amostra sem o analito: compara-se as inclinações das curvas de adição de padrão em dois grupos de amostras que contenham as mesmas adições de analito, para cada nível de concentração. Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz da amostra. Os resultados destas amostras são representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analito adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão lineares forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

6.2.2 Linearidade

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A quantificação de um analito fora da região de linearidade deve ser evitada.

6.2.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. Na faixa de trabalho, os fatores limitantes no limite inferior da faixa de concentração são os valores dos limites de detecção e de quantificação, sendo que no limite superior os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. A concentração mais esperada da amostra deve, preferencialmente, estar situada no centro da faixa de trabalho.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear que é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, nas condições especificadas para o ensaio. A faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra (interferências provenientes da matriz).



Título: PROCEDIMENTO GERENCIAL DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

6.2.4 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

6.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção é uma característica de ensaios limites, com análises de traços e medidas de baixos níveis do analito ou de uma propriedade. Deve ser expresso em concentração do analito na amostra, ou seja, em porcentagem, partes por milhão ou partes por bilhão.

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado.

No caso de métodos não instrumentais (cromatografia em camada delgada, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir efeito esperado. No caso de métodos instrumentais (cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Outra forma de estimativa do limite de detecção é com base na relação de três vezes o desvio padrão do ruído empregando-se um branco.

6.2.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação é uma característica de ensaios quantitativos, usados para baixos níveis de analito nas matrizes, como por exemplo, contaminantes diversos, impurezas em matérias-primas e produtos de degradação no produto final. O limite de quantificação é determinado pela análise de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, estabelecendo-se um nível mínimo no qual o analito possa ser quantificado. A estimativa do limite de quantificação pode ser feita com base na relação de dez vezes o desvio padrão do ruído empregando-se um branco.

6.2.7 Exatidão

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são:

- a)** o uso de material de referência certificado, sempre que possível, devido à sua estabilidade, homogeneidade e incerteza conhecidas;
- b)** o uso de material de referência rastreável;
- c)** o uso de material estável e com concentração do analito determinado por duas ou mais técnicas analíticas;
- d)** o uso de adição de padrão no branco da amostra ou na amostra contendo o analito;



- e) a comparação com um método de referência ou método padrão;
- f) a participação em programa de ensaio de proficiência.

A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo.

6.2.8 Recuperação

A recuperação do analito pode ser determinada por meio da análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

6.2.9 Precisão

A precisão é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas mais comuns de representá-la são: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo expressas pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo.

A repetitividade pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. As condições de repetitividade incluem mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num mesmo laboratório quando pelo menos um dos fatores for modificado. Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração.

A reprodutibilidade é obtida quando os resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos, ou seja, na comparação interlaboratorial.



6.2.10 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. Aplica-se a métodos quantitativos.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então, calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A quantificação de um analito fora da região de linearidade deve ser evitada.

6.2.11 Sensibilidade e especificidade do diagnóstico

A validade de um teste laboratorial é estabelecida comparando-se seus resultados a um método (padrão-ouro) que normalmente é aceito como indicador da presença ou ausência da doença (condição). As possíveis relações entre o resultado de um teste e o diagnóstico verdadeiro são apresentadas no quadro 1. Existem duas possibilidades para o resultado estar correto (verdadeiro positivo e verdadeiro negativo) e duas possibilidades para o resultado estar incorreto (falso positivo e falso negativo).

A validade é medida pela sensibilidade e especificidade. Sensibilidade é definida como a proporção dos indivíduos com a doença (condição) que tem um teste positivo para a mesma, enquanto a especificidade é a proporção de indivíduos sem a doença (condição) que tem um teste negativo. Um teste sensível raramente deixa de encontrar pessoas com a doença, já um teste específico raramente cometerá o erro de indicar que pessoas saudáveis têm a doença.

A sensibilidade e a especificidade determinam o valor preditivo do teste, ou seja, a probabilidade da doença dado o resultado de um teste. Quanto maior a especificidade do teste, maior será seu valor preditivo positivo, ou seja, maior a segurança de que um paciente com resultado positivo esteja de fato doente. Em contraposição, quanto mais sensível, melhor será o valor preditivo negativo do teste. O valor preditivo também é influenciado pela prevalência da doença na população em que o teste está sendo aplicado.

Quadro 1 – Tabela 2x2 para cálculo da sensibilidade, especificidade e valor preditivo.

	Condição	
	presente	ausente
Teste (+)	a	b
Teste (-)	c	d

Sensibilidade do diagnóstico: $a/a + c$

Especificidade do diagnóstico: $d/b + d$

Valor preditivo positivo: $a/a + b$

Valor preditivo negativo: $d/c + d$



6.2.12 Robustez

Pode-se considerar robusto um método cujos resultados não são comprometidos por pequenas variações que possam ocorrer durante a sua execução. A robustez pode ser medida variando-se as condições do equipamento ou da análise, por exemplo: temperatura, comprimento de onda, pH, tempo de agitação, tempo de extração.

6.2.13 Estabilidade

As condições de avaliação da estabilidade dos analitos são ajustadas de acordo com o objetivo do estudo e do analito da matriz. A estabilidade do sistema é considerada apropriada se o desvio-padrão relativo, calculado a partir dos resultados do ensaio obtidos nos diferentes intervalos de tempo, não exceder mais que 20% do valor da precisão do sistema. Se o valor for maior, o tempo máximo de uso da solução da amostra pode ser determinado graficamente por meio dos resultados obtidos para o ensaio em função do tempo.

6.3 Parâmetros de validação de métodos biológicos

Os parâmetros de validação de métodos biológicos não estão disponíveis no Brasil de forma normatizada pelas organizações responsáveis pelas acreditações de qualidade, devendo ser discutidos caso a caso os critérios que se adaptam a cada método. Contudo, a obrigatoriedade de documentar e dispor dos registros de validação segue as mesmas orientações deste procedimento gerencial.

7 ANEXOS

Este item não se aplica ao documento.