

Validação de Métodos Qualitativos: Uma abordagem para o ensaio de PCR e para a análise microbiológica



DOCUMENTOS 376

Validação de Métodos Qualitativos: Uma abordagem para
o ensaio de PCR e para a análise microbiológica

*Gabriella Magarelli
Vera Lúcia Perussi Polez
Marcelo Porto Bemquerer
Juaci Vitória Malaquias*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza

Membros
*Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza;
Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco
Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho
Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio
Eustáquio de Noronha*

Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto
Gabriella Magarelli

Normalização bibliográfica
Rosameres Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Claudio Bezerra

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

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

Validação de métodos qualitativos: uma abordagem para o ensaio de PCR e para a análise microbiológica / Gabriella Magarelli... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. 30 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 376).

ISSN 0102-0110

1. Validação 2. Polymerase Chain Reaction 3. Métodos analíticos 4. Micro-organismos I. Magarelli, G. II. Série

Autores

Gabriella Magarelli

Química, doutora em Ciências, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Vera Lúcia Perussi Polez

Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Marcelo Porto Bemquerer

Biólogo, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Juaci Vitória Malaquias

Estatístico, mestre em Ciência de materiais, analista da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

Apresentação

A validação de métodos analíticos é um procedimento de extrema importância, o qual determina as condições experimentais que garantem a confiabilidade dos resultados. Para tanto, o processo de validação deve demonstrar que o método apresenta especificidade, sensibilidade, eficiência, repetibilidade e reprodutibilidade. Embora a validação de métodos analíticos já seja bastante discutida, comparativamente aos métodos quantitativos, pouco ainda se tem discutido sobre validação de métodos qualitativos, como os moleculares e os microbiológicos.

As técnicas como as de PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) convencional (qualitativo) são bastante utilizadas na detecção de patógenos alimentares, em análises fitossanitárias, na caracterização de organismos modificados geneticamente entre outros. Entretanto, por ser uma técnica de etapas múltiplas é susceptível a um maior número de erros aleatórios e sistemáticos que podem comprometer seus resultados. Desta forma, a validação é um processo que auxilia na padronização da técnica e na determinação de seu desempenho por meio do cálculo dos parâmetros de validação, tais como valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falsos positivos e falsos negativos.

As análises microbiológicas referentes à determinação da viabilidade e pureza de micro-organismos por meio de técnicas como plaqueamento e análise visual também se enquadram em métodos qualitativos e podem passar por um processo de validação específica. A norma internacional de qualidade traduzida para o português ABNT NBR ISO IEC 17025 possui como requisito de processo (item 7.2.2) a validação de métodos, cuja aplicação é obrigatória para laboratórios que pretendem buscar para seus ensaios o selo de acreditação junto ao INMETRO.

O presente documento teve por objetivo revisar o conceito de validação e sua importância, e propor as bases teóricas e práticas para a validação individual do método de análise de DNA por PCR convencional e dos métodos de determinação da viabilidade e pureza de micro-organismos (fungos e bactérias) por plaqueamento e análise visual. O cálculo dos parâmetros de validação ou parâmetros de desempenho dos métodos qualitativos é descrito detalhadamente no documento e sua aplicação é demonstrada nas sessões que discutem o plano de validação para PCR e o protocolo de validação para análises microbiológicas.

Maria Cléria Valadares Inglis
Chefe-Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Apresentação

Conceito e importância da validação de métodos	nº 06
Planejamento geral de uma validação	nº 07
Execução do plano de validação.....	nº 08
Métodos analíticos qualitativos e sua validação	nº 09
Proposta de um plano de validação para métodos que utilizam a técnica de PCR convencional.....	nº 12
Proposta de um protocolo de validação para ensaios microbiológicos (viabilidade e pureza)	nº 21
Agradecimentos	nº 26
Referências bibliográficas	nº 26

Conceito e importância da validação de métodos

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ABNT, 2017), validação se equipara à verificação, o qual é definida como “fornecimento de evidência objetiva de que um dado item atende a requisitos especificados e adequados para um uso pretendido”, sendo um conceito aplicado internacionalmente em diversas áreas.

Órgãos internacionais, como a Organização das Nações Unidas (ONU) e a União Europeia (UE), continuamente publicam leis, diretrizes e códigos de boas práticas que utilizem métodos validados visando ao estabelecimento de limites aceitáveis, principalmente na área alimentar (GOWIK, 2009). A AOAC INTERNATIONAL, do inglês “Association of Official Analytical Chemists”, reúne governo, indústria e academia para estabelecer métodos padrão de análise validados que garantam a segurança e integridade de alimentos e outros produtos que impactam a saúde pública em todo o mundo. A ISO, do inglês “International Organization of Standardization”, aprova normas internacionais que focam em validação de métodos analíticos aplicados a um número elevado de áreas de interesse econômico e técnico.

O Brasil é membro desta organização desde a fundação em 1947. No Brasil, as agências responsáveis em regular os procedimentos a serem utilizados durante a validação do método analítico, são as seguintes: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo que o MAPA é o único órgão responsável por regulamentar procedimentos de validação a serem utilizados para medicamentos de uso veterinário. Estes órgãos nacionais baseiam suas diretrizes em validação de métodos nas normas internacionais criadas pela ISO e AOAC e também em outras criadas, por exemplo, pela EURACHEM, IUPAC (do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”) e FDA (do inglês “Food and Drug Administration”).

Um número significativo de testes, medições e exames são feitos diariamente em milhares de laboratórios de todo o mundo para apoiar diagnósticos clínicos e forenses, para verificar a qualidade da água e alimentos, para atestar a composição de bens industriais, para apoiar o comércio, etc. O custo destas análises é elevado e dispêndios adicionais podem surgir a partir de decisões tomadas com base nos resultados. Por exemplo, alimentos não adequados para consumo podem gerar indenizações, a presença de drogas pode trazer consequências criminais, a detecção de uma praga ou de uma doença pode causar prejuízos para a agricultura e pecuária. Diante disto, é importante fazer uma medição correta e ser capaz de mostrar que o resultado está válido (Magnusson; Örnemark, 2014).

A validação é um estudo experimental integralmente documentado. A validação de métodos é necessária para a garantia da confiabilidade, da precisão, da rastreabilidade e da comparabilidade dos resultados gerados por ensaios analíticos (MAPA, 2011). Um método deve ser validado quando é necessário ser atestado que seus parâmetros de controle estão adequados para serem utilizados em determinado problema analítico. Os parâmetros avaliados são associados às características de desempenho do método, juntamente com robustez, repetibilidade e reprodutibilidade (Thompson et al., 2002). É interessante salientar que a validação não torna o método melhor, ela apenas busca confirmar que o método foi adequadamente desenvolvido e que se encontra sob controle. Com isso, diminuem-se os riscos de não conformidades aos requisitos pré-estabelecidos e a quantidade de testes necessários para controle da qualidade dos resultados (FDA, 2019).

Como requisito da norma de qualidade ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, o laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório e métodos normalizados utilizados fora de seu escopo pretendido ou modificados de outra forma. Há também a necessidade de validação do método para demonstrar a equivalência entre dois métodos. Numa situação no qual o controle de qualidade atesta que o método não está oferecendo resultados satisfatórios, o método deverá ser revalidado (Huber, 2007). No caso de o laboratório utilizar métodos normalizados, como aqueles publicados pela AOAC, ISO, ASTM, não será necessário efetuar o processo de validação. No entanto, o laboratório precisa verificar o desempenho do método normalizado antes de colocá-lo em operação, uma vez que reproduzirá o método nas condições do laboratório (com seus equipamentos, reagentes, analistas e ambiente próprios). Quando forem feitas alterações em métodos validados, deve ser determinada a influência destas mudanças e, quando estas afetarem a validação original, deve ser realizada uma nova validação do método (Magnusson; Örnemark, 2014, ABNT, 2017).

A validação pode ser classificada como individual (do inglês “in house validation” ou completa (do inglês “full validation”) (Ribani et al., 2004). A validação individual é responsável por atestar a capacidade de um único laboratório em realizar determinado ensaio e pode ser considerada como uma etapa preliminar para a validação completa. Nesta validação, devem ser avaliados todos os parâmetros de desempenho de um método analítico, como sensibilidade, linearidade, faixa linear, limite de detecção e quantificação, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. No desenvolvimento de métodos analíticos, a validação individual prova que a metodologia desenvolvida é idêntica ou superior a outras metodologias vigentes (Thompson et al., 2002). A validação completa é utilizada para atestar o desempenho de um método em laboratórios diferentes, estabelecendo a reprodutibilidade e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. É um processo colaborativo que visa a fazer comparações interlaboratoriais para a determinação de desempenho do laboratório e, também, para estabelecer a eficácia e a comparabilidade de métodos novos de ensaio ou de medição (Thompson et al., 2002).

A validação envolve todas as etapas do método analítico, que incluem a amostragem, o preparo da amostra, o método de análise e a documentação. Na validação de métodos, para que as condições perfeitas de análise sejam verificadas e, também, para que muitos parâmetros de desempenho do método sejam determinados, o laboratório deve ter disponíveis os materiais de referência ou padrões de referência (MAPA, 2011). No processo de validação, os equipamentos devem passar por inspeção/calibração e suas incertezas de medição devem ser investigadas para

garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Além de todos estes fatores, o pessoal envolvido nas análises deve estar devidamente treinado e os insumos laboratoriais devem possuir o grau de pureza e a validade exigida. Por fim, a adoção de um procedimento de garantia da validade dos resultados e a realização rigorosa dos registros de todas as etapas é fundamental (ABNT, 2017).

A validação, em termos financeiros, possui um custo elevado, no entanto deve ser considerada como um investimento que trará grandes benefícios, pois evita o retrabalho, traz confiança junto ao cliente e diminui consideravelmente a taxa de falsos positivos e falsos negativos em análises diagnósticas. Com o passar do tempo, com a validação e o controle de qualidade implantados, o processo rotineiro assumirá custos mais reduzidos. A partir do momento em que a decisão de se fazer validação for tomada, a empresa deve iniciar a gestão da mudança, que inclui alguns pontos essenciais como visão, habilidades, incentivo, recursos, plano de ação; caso contrário, a mudança provavelmente não ocorrerá e poderá gerar conflitos (Leite, 2008). A figura 1 mostra o que pode ocorrer se algum destes pontos essenciais não for considerado em um processo de validação. Para garantir que o processo de validação seja um sucesso, evitando perda de tempo e dinheiro, o planejamento da validação torna-se essencial.

VISÃO	HABILIDADES	INCENTIVO	RECURSOS	PLANO DE AÇÃO	MUDANÇA
X	HABILIDADES	INCENTIVO	RECURSOS	PLANO DE AÇÃO	CONFUSÃO
VISÃO	X	INCENTIVO	RECURSOS	PLANO DE AÇÃO	ANSIEDADE
VISÃO	HABILIDADES	X	RECURSOS	PLANO DE AÇÃO	MUDANÇA LENTA
VISÃO	HABILIDADES	INCENTIVO	X	PLANO DE AÇÃO	FRUSTRAÇÃO
VISÃO	HABILIDADES	INCENTIVO	RECURSOS	X	INDECISÃO

Figura 1. Consequências da falha no planejamento da mudança em um sistema de validação (Leite, 2008).

Planejamento geral de uma validação

O planejamento amplo e minucioso de uma validação é o ponto chave para diminuir tempo e os gastos com a implantação de um processo ou ensaio em qualquer área. O planejamento, a preparação e a execução da validação devem seguir protocolos detalhados, devendo o laboratório manter os documentos e os registros da validação. Inicialmente, recomenda-se a formação de uma comissão de validação. Essa equipe ficará responsável por delinear os objetivos da validação, delimitar prazos e encarregar pessoas para tarefas do processo por meio de um plano de validação.

O plano de validação deve conter as seguintes informações (MAPA, 2011; Cárdenas; Valcárcel, 2005; Inmetro, 2016):

1- Propósito e escopo do plano de validação. Trata dos objetivos do plano, tais como definir os procedimentos de validação de métodos para garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade. O escopo refere-se à abrangência de aplicação do plano, como laboratórios que executam ensaios qualitativos, ensaios quantitativos, de prestação de serviços, ou de determinada área, como por exemplo: laboratórios de análise microbiológica ou laboratórios de biologia molecular.

2- Pessoal técnico envolvido e suas responsabilidades. Geralmente compreende o coordenador técnico do laboratório, o responsável pela qualidade, analistas, técnicos e colaboradores.

3- Os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação. A definição dos parâmetros de desempenho que deverão ser determinados varia de acordo com o tipo de ensaio, se qualitativo, quantitativo ou semiquantitativo. Os critérios de aceitação são determinados a partir dos parâmetros de desempenho exigidos por órgãos reguladores e pelos custos exigidos do laboratório em questão. No caso de o rigor não ser previsto por órgãos reguladores, o laboratório deverá estabelecer o rigor baseando-se em critérios que abrangem o impacto gerado por seus resultados. Por exemplo, para a área de quarentena de pragas em material vegetal, pode-se esperar uma especificidade diagnóstica próxima de 100%. Para um ensaio de determinação de pesticidas em alimentos, pode-se exigir um limite de quantificação menor que 0,1 mg.kg⁻¹ (Lima; Correa, 2012). Selecionando-se os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação, mantém-se o foco da validação diminuindo-se os custos e o tempo de validação. Para problemas emergentes, como os testes de diagnóstico para infecções (por exemplo, a Covid-19) é imprescindível que ensaios de validação sejam conduzidos preferencialmente com comparações interlaboratoriais antes do lançamento de um kit diagnóstico, que ocorrerá em escala global (Vandenberg et al., 2020).

4- Descrição do método. Para a seleção do método devem-se considerar as necessidades do cliente,

tempo de análise, custo, equipe necessária e restrições do local de realização dos ensaios (ex: falta de equipamento, espaço ou reagentes). Caso o método selecionado seja normalizado e/ou publicado, deve-se otimizar o protocolo do método normalizado no laboratório e determinar alguns parâmetros de desempenho como precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão. Todas as especificações do método devem ser seguidas, mantendo os parâmetros descritos e adaptando os equipamentos do local ao método. Ensaios comercializados prontos, como os kits diagnósticos, também devem ser verificados. Caso o método não seja normalizado ou publicado, o laboratório deve providenciar a validação individual (intralaboratorial) e a validação completa (interlaboratorial) se necessária;

5- Qualificação dos materiais e equipamentos. Os materiais utilizados devem ter procedência comprovada, com grau de pureza requisitado pelo método. Os equipamentos devem ser qualificados e calibrados, e seus registros de uso e manutenções devem estar devidamente documentados. De acordo com o manual de validação do LANAGRO-MAPA (2014), as informações importantes para a rastreabilidade de produtos químicos são: 1. Código de identificação (CAS); 2. Identificação da substância (nome comum ao menos); 3. Procedência; 4. Origem; 5. Prazo de validade; 6. Pureza; 7. Análises suplementares; 8. Quantidade adquirida; 9. Quantidade utilizada e destinação; 10. Quantidade restante; 11. Responsável pelas informações. O CAS identifica inequivocamente qualquer produto químico, possibilitando a aquisição e a utilização corretas de produtos com diversos nomes comuns.

6- Protocolo da validação. Os experimentos devem ser planejados para contemplar todos os requisitos de desempenho da validação. O laboratório, baseado em critérios estatísticos e técnicos, deve estipular o número de repetições, o número de amostras e os materiais ou padrões de referência que serão utilizados.

Execução do plano de validação

Após a etapa de planejamento, as próximas etapas estão relacionadas à execução do plano de validação, tais como:

1- Execução dos experimentos. O protocolo de validação deve ser seguido de modo que todos os parâmetros de desempenho sejam possíveis de ser determinados. Os dados devem ser organizados e tratados estatisticamente. Cada procedimento relativo à metodologia deve ter um Procedimento Operacional Padrão (POP). O preparo de reagentes, amostras e afins também precisa ser considerado.

2- Documentação da validação. A próxima etapa após a realização dos experimentos de validação e registro dos dados é a elaboração do relatório de validação contendo todas as informações, como: título do ensaio; os critérios de desempenho selecionados; os materiais (reagentes, materiais de referência e equipamentos) necessários e suas qualificações, as pessoas envolvidas na validação, os cálculos dos parâmetros de validação e as análises estatísticas pertinentes. Os dados brutos referentes às tabelas de dados obtidas em formulários e fotos de resultados experimentais devem ser anexados. As referências bibliográficas precisam ser inseridas e estar disponíveis no laboratório. No relatório de validação, uma declaração de validade do método pode ser inserida afirmando que, tomando como base os resultados da validação, o método atende ao objetivo proposto. A declaração precisa ser assinada pelo responsável pela validação e pelo responsável pela qualidade no laboratório ou pelo responsável pelo laboratório. Toda a documentação gerada durante a validação dos métodos deve ser armazenada no laboratório que a originou, garantindo sua rastreabilidade e recuperação fácil. Adicionalmente ao término da validação do método é preciso relacionar o relatório de validação nas referências complementares dos procedimentos operacionais padrão (POP) dos ensaios que utilizam o método validado.

3- Definição dos critérios de revalidação. Revalidações devem ser feitas para o mesmo método quando forem implantadas alterações significativas ou houver condições diferenciadas em relação à validação anterior (novos interferentes, troca de reagentes, alterações de condições ambientais) ou necessidade de exatidão maior em relação aos parâmetros e critérios de validação em função de definições de projetos ou solicitações de clientes. Parâmetros como especificidade, sensibilidade, repetibilidade e limite de detecção (do aparelho e do método) devem ser reavaliados após a troca de equipamentos ou reagentes. As validações de métodos precisam 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.

4- Definição dos critérios de controle de qualidade de rotina. Amostras positivas e enriquecidas devem ser analisadas periodicamente para o controle de qualidade do método. O controle de qualidade do método, que monitora o seu desempenho ao longo do tempo e garante a confiabilidade dos resultados, deve ser estabelecido e utilizado de forma a ser definida pelo laboratório levando-se em consideração a complexidade do método ou das condições técnicas do laboratório (o laboratório possui um sistema de qualidade implantado?). Os controles de qualidade são realizados por meio da utilização de amostras controle, padrões de referência ou materiais de referência certificados, os quais possuem propriedades químicas e biológicas conhecidas e que podem ser monitoradas. A utilização de

controles positivos e negativos em todas as análises é recomendada principalmente em métodos biológicos. De forma semelhante, o desempenho de determinados instrumentos de medição deve ser verificado periodicamente. Qualquer desvio no resultado do controle de qualidade acarreta a necessidade de adotar ações como repetição do ensaio ou análise crítica dos fatores que estejam impactando os resultados ou a mudança de método. Se o método for modificado, este deve ser revalidado. O procedimento adotado para o controle de qualidade deve ser descrito no procedimento de cada ensaio.

A figura 2 apresenta um fluxograma com as principais etapas contidas num plano de validação, as quais já foram discutidas anteriormente. Um planejamento de validação também pode ser encontrado no Documento Gerencial da Qualidade, denominado de “Procedimento Gerencial de Validação de Métodos, código 038.10.02.2.012 da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

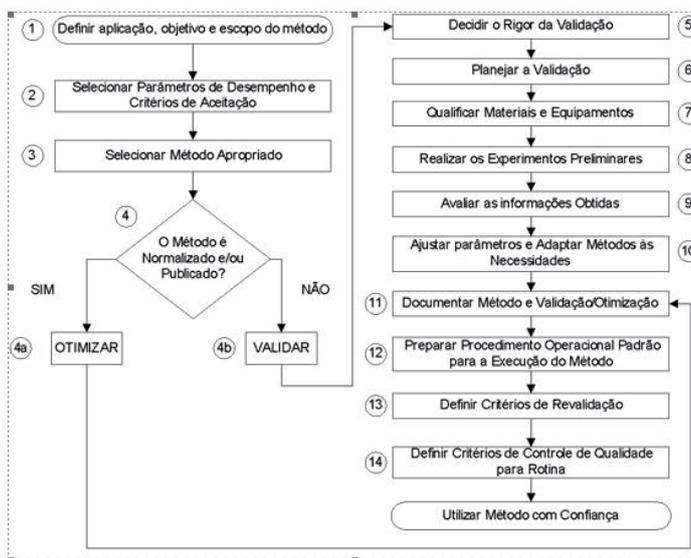


Figura 2. Fluxograma de Planejamento Geral de Validação de Metodologias. Adaptado de: Inmetro, 2016.

Métodos analíticos qualitativos e sua validação

De acordo com a Association of Official Analytical Chemist (AOAC), um método qualitativo é um método de análise, cuja resposta é a presença ou ausência do composto alvo de análise, detectado direta ou indiretamente a partir de certa quantidade de uma amostra (Feldsine et al., 2002). Os métodos qualitativos são utilizados em ensaios químicos (por exemplo, exames antidoping) e biológicos (por exemplo, investigação da contaminação de alimentos por patógenos utilizando-se PCR), apresentando maior prevalência em ensaios biológicos. Na área da saúde são importantes, principalmente na triagem de patógenos e detecção de drogas de abuso em bancos de sangue (Knecher et al., 1994).

Os métodos analíticos qualitativos quando comparados com os quantitativos podem ser mais rápidos, de fácil execução e um pouco menos onerosos. Entretanto, não é possível afirmar que esses métodos apresentem um resultado analítico exato devido à presença dos falsos-positivos e falsos-negativos, que se encontram numa região de concentração de não confiabilidade do método (Figura 3). Caso a amostra não tenha o composto analisado em uma concentração diferente da região de não confiabilidade, este não será detectado de forma correta pelo método (Cárdenas; Valcárcel, 2005).



Figura 3. Esquema de região de não confiabilidade de métodos analíticos qualitativos. Adaptada de Trullols et al., 2004. Imagem:

banco de imagens gratuitas (www.pngegg.com)

Os métodos analíticos qualitativos passaram a ser largamente utilizados com o advento dos métodos moleculares, principalmente na detecção de material genético (DNA, RNA), proteínas e anticorpos. Os métodos qualitativos podem ter diferentes classificações. Um importante exemplo é a classificação por detecção (Unger-Heumann, 1996), na qual os métodos são assim divididos:

Métodos por detecção sensorial: engloba a utilização dos sentidos humanos para a detecção, sendo a visão a mais utilizada. Nesses métodos ocorre a modificação da cor em uma análise, a formação de precipitado, a emissão de fluorescência ou a mudança de turvação de um meio.

Métodos por detecção instrumental: engloba a utilização de uma resposta instrumental que tornará possível a comparação de uma amostra contendo o composto alvo analisado em questão com uma amostra de referência, mas sem a utilização de curva de calibração.

Seguindo o mesmo raciocínio das metodologias analíticas quantitativas, a validação de métodos qualitativos deve ser conduzida de modo a que se obtenham os parâmetros de desempenho, que são diferentes dos parâmetros determinados em métodos quantitativos. (Trullols et al., 2004).

Para validar um método qualitativo, uma estratégia eficiente é a comparação dos resultados obtidos do método em teste com os obtidos por meio de um método de referência normalizado. A comparação estatística pode ser conduzida utilizando um teste de hipótese, como por exemplo, o teste qui-quadrado (χ^2) (Trullols et al., 2004). Caso não seja possível, o cálculo de parâmetros de desempenho deve ser utilizado, atestando assim o desempenho do método.

Os principais parâmetros de desempenho que podem ser utilizados para a validação qualitativa são os seguintes (Figura 4):

Valor Preditivo Positivo (Altman; Bland, 1994): é a proporção de amostras verdadeiramente positivas diagnosticadas corretamente (Fórmula 1).

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{Vp}{Vp + Fp} \quad (\text{Formula 1})$$

Onde:

Vp = nº de amostras verdadeiramente positivas;

Fp = nº de amostras dadas como positivas pelo teste, mas na realidade negativas (falsos positivos).

Valor Preditivo Negativo (Altman; Bland, 1994): é a proporção de amostras verdadeiramente negativas diagnosticadas corretamente (Fórmula 2).

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{Vn}{Fn + Vn} \quad (\text{Formula 2})$$

Onde:

Vn = nº de amostras verdadeiramente negativas;

Fn = nº de amostras dadas como negativas pelo teste, mas na realidade positivas (falsos negativos).

Razão de falsos-positivos (Ellison; Fearn, 2005): é a probabilidade de uma amostra negativa ser classificada como positiva pelo método (Fórmula 3).

$$\text{Razão de falsos positivos} = \frac{Fp}{Vn + Fp} \quad (\text{Formula 3})$$

Onde:

Fp = nº de amostras dadas como positivas pelo teste, mas na realidade negativas (falsos positivos);

Vn = nº de amostras verdadeiramente negativas.

Razão de falsos-negativos (Ellison; Fearn, 2005): é a probabilidade de uma amostra positiva ser classificada como negativa pelo método (Fórmula 4).

$$\text{Razão de falsos negativos} = \frac{Fn}{Vp + Fn} \quad (\text{Formula 4})$$

Onde:

Fn = nº de amostras dadas como negativas pelo teste, mas na realidade positivas (falsos negativos);

Vp = nº de amostras verdadeiramente positivas.

Sensibilidade (Ellison; Fearn, 2005): é a probabilidade que um método tem de detectar amostras verdadeiramente positivas como tais (Fórmula 5).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{Vp}{Vp + Fn} \quad (\text{Formula 5})$$

Onde:

Vp = nº de amostras verdadeiramente positivas;

Fn = nº de amostras dadas como negativas pelo teste, mas na realidade positivas (falsos negativos).

Especificidade (Ellison; Fearn, 2005): é dada como a probabilidade que um método tem de detectar amostras verdadeiramente negativas como tais (Fórmula 6):

$$\text{Especificidade} = \frac{Vn}{Vn + Fp} \quad (\text{Formula 6})$$

Onde:

Vn = nº de amostras verdadeiramente negativas;

Fp = nº de amostras dadas como positivas pelo teste, mas na realidade negativas (falsos positivos).

Eficiência (Ellison; Fearn, 2005): é a capacidade do método em detectar o maior número de verdadeiros positivos e negativos (Fórmula 7).

$$\text{Eficiência} = \frac{Vp + Vn}{Vp + Vn + Fp + Fn} \quad (\text{Formula 7})$$

Onde:

Vp = nº de amostras verdadeiramente positivas;

Vn = nº de amostras verdadeiramente negativas;

Fp = nº de amostras dadas como positivas pelo teste, mas na realidade negativas (falsos positivos);

Fn = nº de amostras dadas como negativas pelo teste, mas na realidade positivas (falsos negativos).

Limite de detecção do método (Ellison; Fearn, 2005): é dado pela menor concentração de um composto analisado que é detectável acima do ruído do sistema, com 95% ou 99% de confiança.

Limite de detecção do instrumento (Unger-Heumann, 1996): corresponde a três a cinco vezes a razão ruído/sinal do aparelho.

Valor de corte (Langton et al., 2002; Freitas et al., 2006): é o intervalo no qual a sensibilidade do método é 95% (quando ligado a métodos qualitativos).

Concordância (Langton et al., 2002; Freitas et al., 2006): é a chance (porcentagem) de dois materiais idênticos analisados pelo mesmo laboratório, sob as mesmas condições chegarem ao mesmo resultado (Fórmula 8).

$$\text{Concordância} = \frac{k(k-1) + (n-k) - (n-k-1)}{n(n-1)} \quad (\text{Formula 8})$$

Onde:

k = nº de resultados positivos;

n = nº de resultados.

Concordância estimada (Langton et al., 2002; Freitas et al., 2006): é a chance (porcentagem) de dois materiais idênticos analisados por métodos qualitativos ou laboratórios distintos fornecerem o mesmo resultado (Fórmula 9).

$$\text{Concordância estimada} = \frac{2r(r-nL) + nL(nL-1) - CnL(n-1)}{2nL(L-1)} \quad (\text{Formula 9})$$

Onde:

r = nº de amostras positivas;

n = repetições por laboratório;

C = concordância, expressa em proporção;
 L = nº de laboratórios.

Razão da Concordância (R.C.) (Langton et al., 2002; Freitas et al., 2006): é a razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo (Fórmula. 10). O ideal é que o valor encontrado seja próximo a 1,0, indicando que a dependência entre os termos existe e que os resultados são imparciais tanto para os mesmos laboratórios quanto para laboratórios diferentes.

$$RC = \frac{\text{Concordância (100 - concordância estimada)}}{\text{Concordância estimanda (100 - concordância)}} \text{ (Formula 10)}$$

Teste de McNemar corrigido para continuidade ($\chi^2_{McNemar}$) (McNemar 1947; Freitas et al., 2006; Sheskin, 2007): teste estatístico não paramétrico que compara dois métodos de análise ou um método de análise com um grupo controle (Figura 4). Esse teste visa a atestar se os falsos-positivos e os falsos-negativos gerados por análises binomiais interferem na capacidade do teste analisado (Fórmula 11). A hipótese nula (H0) assume que os valores das somas das linhas de uma tabela de contingência 2 x 2 são iguais aos valores das somas das colunas e as médias dos valores pareados são iguais. A hipótese alternativa (H1) assume que os valores das somas das linhas de uma tabela de contingência 2 x 2 não são iguais aos valores das somas das colunas e as médias dos valores pareados não são iguais. Se o valor gerado for maior ou igual a 3,84, as proporções positivas confirmadas pelos métodos alternativos e de referência diferem significativamente para um nível de significância (α) igual a 0,05.

$$\chi^2_{McNemar} \alpha = \frac{(|fp - fn| - 1)^2}{fp + fn} \text{ (Formula 11)}$$

Onde:

F_n = nº de amostras dadas como negativas pelo teste, mas na realidade positivas (falsos negativos);

F_p = nº de amostras dadas como positivas pelo teste, mas na realidade negativas (falsos positivos);

α = Probabilidade de significância requerida no teste (probabilidade máxima de rejeitar acidentalmente uma hipótese nula verdadeira).

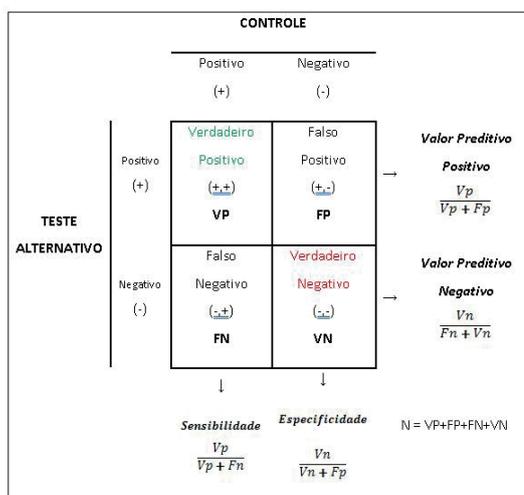


Figura 4. Tabela de contingência 2x2 e fórmulas para cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos em análise qualitativa. Adaptado de: Cárdenas; Valcárcel, 2005.

Proposta de um plano de validação para métodos que utilizam a técnica de PCR convencional

Com o objetivo de demonstrar como pode ser realizado um plano de validação, o texto a seguir dividido em vários tópicos, exemplifica de forma extensa e detalhada um plano de validação para ser aplicado no caso de ensaios que envolvem PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) convencional. O plano foi baseado em artigos da literatura que tratam da padronização de ensaios de PCR, cujas citações estão descritas ao longo do texto a seguir. Deve-se ressaltar que este plano não está fechado e pode sofrer modificações e atualizações pelas pessoas interessada, sempre observando as necessidades do cliente e os requisitos necessários do método para uma dada aplicação ou campo de aplicação.

1. Propósito e o escopo do plano de validação

Definir os procedimentos de validação de métodos que envolvem o uso de PCR convencional para garantir a qualidade metrológica dos resultados conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade. O escopo abrange laboratórios de biologia molecular, prestadores de serviço ou de pesquisa.

2. Pessoal técnico envolvido e suas responsabilidades

Definir, dentre pesquisadores, analistas, técnicos, assistentes e colaboradores, a equipe responsável para elaboração do plano de validação, acompanhamento e execução de experimentos, registro de dados da validação, realização de tratamento estatístico dos dados, estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade e revalidação, correção e redação final do relatório de validação e emissão da declaração de validade do método.

3. Os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação

Neste plano, os parâmetros de desempenho determinados para os ensaios que utilizam PCR convencional são estes: razão de falsos positivos, razão de falsos negativos, sensibilidade, especificidade e eficiência. Esses parâmetros foram definidos após revisão bibliográfica referentes à qualidade metrológica e padronização de ensaios de PCR (Lisbby, 1998; Malorny et al., 2003; Hoorfar et al., 2004; Santos et al., 2009; Ruths et al., 2017). Os critérios de aceitação do método de PCR são definidos de acordo com a exigência do cliente e o rigor necessários. O rigor pode ser estabelecido pela porcentagem máxima permitida de falsos positivos e falsos negativos e/ou pela porcentagem mínima do desempenho dos parâmetros do método como sensibilidade, especificidade e eficiência. Deve-se deixar claro, no entanto, que o estabelecimento do rigor não é padronizado na literatura e suas indicações seguem as especificidades do próprio campo de aplicação do método de PCR. Além do rigor do resultado, devem-se levar em consideração dois fatores: 1. O método de PCR é realizado em diversas etapas e a probabilidade de erros e de contaminação é factível, mesmo com controles rígidos de qualidade (Figura 5); 2. Os laboratórios podem utilizar outros métodos diagnósticos complementares ao PCR convencional.

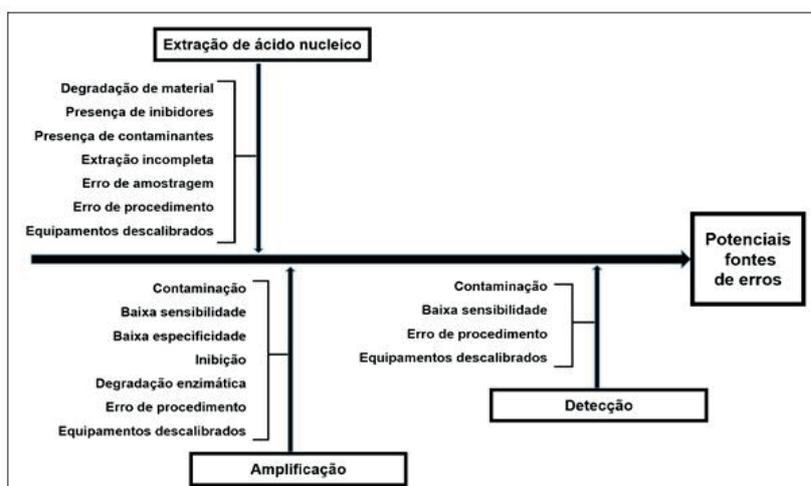


Figura 5. Potenciais fontes de erro dos métodos baseados em PCR.

4. Descrição do método

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma replicação (semiconservativa) in vitro de sequências específicas de DNA. A reação sempre ocorre a partir de um DNA molde, que pode ser proveniente de um DNA extraído convencionalmente da amostra, ou de uma amostra de RNA, convertida para cDNA (DNA complementar). A técnica foi desenvolvida por Kary Mullis (Saiki et al., 1985), ganhador do prêmio Nobel de Química de 1993, sendo amplamente utilizada em diferentes áreas. A metodologia original e muitas técnicas procedentes do PCR são atualmente empregadas para clonagem, estudo de genes, detecção de espécies, diagnóstico de doenças infecciosas e hereditárias, análise forense, entre outros (Alarcón et al., 2006; Santos et al., 2009; Cornut et al., 2014; Ruths et al., 2017; Liu et al., 2018; Mursalin et al., 2020).

Os reagentes necessários à reação são os seguintes:

1. DNA polimerase: enzima termoestável (exemplo, Taq DNA polimerase) utilizada na amplificação de DNA;
2. Tampão: usado para manter o pH ótimo e constante do meio reacional visando a assegurar a atividade da enzima;
3. Íons metálicos (exemplo Mg^{2+} , na forma de $MgCl_2$ ou $MgSO_4$): utilizado como cofator enzimático (outras polimerases podem usar outros cofatores metálicos);
4. Oligonucleotídeos (do inglês, primers): são os iniciadores da PCR e a especificidade dos primers é responsável

- por identificar os locais de amplificação do DNA para a enzima polimerizadora;
5. Desoxirribonucleotídeos sintéticos [adenina (dATP), citosina (dCTP), guanina (dGTP) e timina (dTTP)]: usados durante o processo de replicação da sequência-alvo, eles são incorporados pela DNA polimerase na nova fita sintetizada (os desoxirribonucleotídeos são usados como substratos da reação em conjunto com o DNA molde);
 6. Água: utilizada para diluir e ajustar o volume da reação;
 7. DNA molde: contém a sequência-alvo de interesse, sendo utilizado como molde para o pareamento dos primers.

A reação de PCR é cíclica sendo dividida em três principais passos:

1. Desnaturação da molécula de DNA: as fitas duplas de DNA têm suas ligações intermoleculares desfeitas pela energia doada ao sistema devido ao aumento da temperatura (92- 96°C), transformando o DNA em duas fitas simples;
2. Anelamento dos oligonucleotídeos: os oligonucleotídeos ligam-se às fitas simples de DNA a uma determinada temperatura, denominada de temperatura de anelamento (T_m);
3. Elongação da fita complementar do DNA: a enzima polimerizadora utiliza os desoxirribonucleotídeos sintéticos para formar a fita complementar.

A robustez da PCR deve ser monitorada por controles de amplificação (Tabela 1). A presença de inibidores da reação de PCR deve ser monitorada com utilização de controle interno apropriado para cada reação. Os parâmetros de desempenho do método serão calculados pela resposta analítica obtida com os controles positivos e negativos.

Tabela 1. Controles recomendados para teste de desempenho de ensaios baseados em PCR. Adaptado de Malorny, 2003.

Tipo de Controle	Descrição
Controle interno de amplificação	DNA quimérico não relevante adicionado ao <i>mix</i> e amplificável pelo mesmo par de oligonucleotídeos do DNA alvo, mas que resulta em um amplicon (segmento curto de DNA gerado pelo processo da PCR) visualmente distinguível do DNA alvo.
Controle positivo de processamento	Reação contendo amostra positiva (idêntica ao material genético alvo) contendo quantidade suficiente de material genéticos do organismo alvo e passando por todas as etapas do processamento como os demais.
Controle negativo de reação	Reação contendo amostra negativa (diferente do material genético alvo, como por exemplo o DNA de uma espécie próxima) contendo quantidade suficiente de material genético do organismo alvo e passando por todas as etapas do processamento como as demais.
Controle de reagentes	Reação contendo todos os reagentes exceto o DNA.
Controle de ambiente	Reação contendo uma mistura mestre (<i>mix</i>), mas sem DNA, na qual o microtubo é deixado aberto na sala de preparação da PCR para detectar possível contaminação de DNA no ambiente (a ser realizado em intervalos regulares como parte da garantia do programa de qualidade).

A reação ocorre em um aparelho denominado de termociclador que apresenta a capacidade de monitorar e modificar a temperatura conforme o ciclo. A reação de PCR gera concentrações exponenciais de DNA (amplicons), pois são disponibilizados a cada ciclo mais moldes para a PCR. A amplificação efetiva do DNA requer de vinte a trinta ciclos de reação, com os produtos de cada ciclo servindo como DNA-molde para o próximo (origem do termo “reação em cadeia” da polimerase).

O resultado da PCR convencional é interpretado após uma etapa denominada de detecção pós-PCR. Neste caso, o DNA amplificado precisa ser visualizado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Os resultados são expressos de forma qualitativa: presença ou ausência de bandas (fragmentos de DNA amplificado) seguidas por sua interpretação pelo uso de controles e marcadores moleculares.

5. Qualificação do ambiente, dos reagentes, dos equipamentos e do pessoal

A qualificação do ambiente, dos reagentes, dos equipamentos e da equipe envolvida é de extrema importância no processo de validação e deverá constar no plano. Nessa seção, devem ser descritas as melhores condições técnicas possíveis de cada item para levar à excelência dos resultados da validação, expressos por meio dos cálculos dos parâmetros de desempenho. Para a execução de ensaios que utilizam o método de PCR convencional, alguns critérios importantes foram selecionados e estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2. Qualificação do ambiente, dos reagentes dos equipamentos e da equipe.

Qualificação do ambiente
<p>Realizar a subdivisão do local a ser realizado a PCR em três áreas: pré-PCR, amplificação e detecção pós-PCR. Cada área deverá ter equipamento/material próprio (exemplo micropipetas, jalecos, caderno de anotação entre outros), não sendo permitidas quaisquer trocas.</p> <p>Realizar o preparo dos reagentes e as reações de PCR, preferencialmente, em cabine de PCR ou em uma câmara de fluxo laminar, se possível equipada com a luz UV.</p> <p>Manter uma rotina de limpeza no local de trabalho. Os equipamentos, os instrumentos e as bancadas precisam ser limpos (por exemplo, com o uso de uma solução de etanol 70%) antes e depois dos ensaios.</p> <p>Ter local adequado para armazenamento dos kits e demais reagentes. Armário com ventilação, livre de umidade; geladeira; freezer -20°C e freezer -80°C.</p>
Qualificação dos reagentes e de outros materiais de consumo
<p>Utilizar reagentes que estejam dentro do prazo de validade, com a embalagem íntegra e com grau de pureza adequado [reagentes com grau de pureza >99% ou grau de biologia molecular (exemplo, agarose)]. Utilizar preferencialmente reagentes de fornecedores com certificado de qualidade;</p> <p>Armazenar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante;</p> <p>No caso de reagentes em alíquotas ou soluções preparadas, etiquetar os frascos com informações mínimas de conteúdo (verificar a seção de Execução do plano de validação, item 3) Evitar a troca de reagentes entre os kits (exemplo a enzima de um kit com tampão de outro kit); os componentes de um kit não devem ser utilizados com um kit de lote diferente, a não ser quando especificado pelo fabricante;</p> <p>Utilizar água ultrapura estéril (grau biologia molecular, livre de DNase e RNase).</p> <p>Manter os reagentes em alíquotas em condições perfeitas de armazenamento e congelamento para evitar contaminação e manter a qualidade dos materiais;</p> <p>Utilizar materiais de consumo (ex. microtubos e ponteiros com filtros) com grau Biologia Molecular, descartáveis e autoclavados, livres de DNase e RNase;</p> <p>Esterilizar os materiais (ex. microtubos, frascos, ponteiros entre outros) em uma autoclave para materiais limpos que não seja usada para descontaminação de amostras biológicas. Adicionalmente, usar fita para autoclavagem e indicador biológico nos materiais e na autoclave, respectivamente, para verificação da qualidade do processo.</p> <p>Preparar, armazenar, preservar, utilizar os reagentes ou afins e executar as atividades laboratoriais em conformidade com as normas de biossegurança estabelecidas.</p> <p>Aplicar as normas de biossegurança, de descontaminação e descarte para o uso dos reagentes e soluções; com especial atenção a materiais tóxicos como o fenol e o brometo de etídeo.</p>

DNA de referência	<p>Utilizar um DNA de referência após a verificação de sua qualidade por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida e determinação de concentração por espectrofotometria (descrição em protocolo de validação).</p> <p>Armazenar o DNA de referência a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (exceto em nitrogênio líquido) em tampão apropriado</p>
Tampões de reação e os cofatores	<p>Utilizar os tampões de reação e os cofatores que são fornecidos com as polimerases, mantendo assim as condições adequadas para as enzimas;</p> <p>Utilizar os cofatores (geralmente Mg^{2+}, na forma de MgCl_2 ou MgSO_4) numa concentração entre 0,5 a 2,5 mM. sendo importante observar que concentrações altas podem resultar no aparecimento de produtos inespecíficos.</p>
TAQ DNA polimerase	<p>Utilizar a enzima DNA polimerase preferencialmente com concentrações um pouco mais elevadas (5 ou 10 U/μL) proporcionando uma maior eficácia. Realizar a diluição no momento da reação;</p> <p>Retirar a enzima do congelador imediatamente antes de ser adicionada sendo a última a ser colocada na reação.</p>
Desoxirribonucleotídeos sintéticos (dNTPs)	<p>Utilizar uma solução estoque (10 mM ou 20 mM) em água ultrapura estéril dos desoxirribonucleotídeos sintéticos (dNTPs). Preparar todos os dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) em concentrações iguais (existem exceções). Adicionar à reação uma quantidade suficiente para obter-se uma concentração final entre 20 e 200 μM, sendo importante observar concentrações elevadas podem interferir na especificidade dos olionucleotídeos.</p>
Oligonucleotídeos (do inglês, Primers)	<p>Utilizar iniciadores após planejamento metuculoso da sequência e do ponto de fusão médio (T_m, do inglês temperature of melting). O uso de programas de bioinformática de acesso gratuito caracteriza-se como uma importante ferramenta para uma seleção mais criteriosa e segura tanto para a busca de sequências quanto para o desenho dos iniciadores;</p> <p>O design, a pureza e a validação dos iniciadores de cada novo lote deverá ser testado para especificidade, eficiência de amplificação e ausência de inibidores antes de serem utilizados na rotina.</p>

Qualificação dos equipamentos

Os equipamentos e instrumentos devem estar em perfeitas condições de uso, com o plano de manutenção e calibração em dia. Devem estar limpos e conter próximos a eles um caderno ou ficha de registro para anotar informações referentes ao tempo de uso do equipamento e o operador, bem como informações como uso, limpeza, conservação e desinfecção, quando necessário.

Balanças	A balança analítica deve estar limpa e sua calibração em dia. A balança também poderá ser usada após verificação da precisão e exatidão pelo pessoal do laboratório com o uso de pesos padrão.
Centrífugas	As centrífugas devem ser monitoradas em relação às rotações e o tempo de rotação, periodicamente, com os respectivos registros desses controles.
pHmetros	O pHmetro deve passar pela aferição do pH usando as soluções padrões de pH e a limpeza dos eletrodos devem seguir o manual do fabricante.
Extratores de ácidos nucleicos	Os extratores automatizados de ácidos nucleicos devem ser mantidos de acordo com as recomendações dos fabricantes.
Espectrofotômetro	<p>Os espectrofotômetros monocromáticos devem possuir comprimento de onda com uma boa exatidão e resolução bem como um baixo ruído. Os que utilizam filtros devem conter filtros com uma boa condição de limpeza, livres de arranhões entre outros;</p> <p>A calibração dos comprimentos de onda deve ser realizada regularmente, de acordo com as instruções do fabricante.</p>

Cabine de PCR	As cabines de PCR devem estar limpas, com a manutenção em dia e descontaminadas.
Termociclador	Os equipamentos devem passar por testes de temperatura, no mínimo anualmente, atendendo as instruções do fabricante.
Equipamentos para eletroforese (cubas entre outros)	Os equipamentos utilizados para eletroforese devem estar limpos e descontaminados. Se utilizar o brometo de etídio para a coloração do gel é necessário usar periodicamente protocolos de descontaminação e desativação do corante tanto no local de trabalho quanto nos equipamentos.
Fotodocumentador	O equipamento deve estar limpo, descontaminado e com a manutenção em dia.
Freezers e geladeiras	Devem estar limpos e conter reagentes, amostras e soluções devidamente identificadas; A temperatura dos freezers e geladeiras deve ter monitoramento contínuo por meio de termômetros de máximos e mínimos; Devem estar inseridos no plano de manutenção de equipamentos do laboratório e estar em dia no cronograma de manutenção preventiva.
Autoclaves	As autoclaves devem passar, periodicamente, por monitoramento de sua temperatura e pressão com os respectivos registros. A calibração/ manutenção/qualificação das autoclaves deve estar de acordo com o plano de calibração e manutenção definido para os equipamentos críticos do laboratório.
Pipetas automáticas	As pipetas automáticas devem ser limpas sempre antes do uso com solução de álcool 70%. A calibração/ manutenção das pipetas deve estar de acordo com o plano de calibração e manutenção definido para os equipamentos críticos do laboratório.
Qualificação da equipe envolvida	
<p>A equipe técnica envolvida nos procedimentos de PCR convencional deve estar devidamente treinada: 1. Todas as etapas experimentais do PCR (pré-PCR, PCR e pós PCR), abrangendo: i. o conhecimento do uso correto dos equipamentos e instrumentos necessários em cada etapa; ii. manuseio correto dos reagentes; 2. Pipetagem, que compreende uma etapa onde muitos erros sistemáticos podem ocorrer devido à própria operação inadequada e quando se utilizam pipetas com capacidades não apropriadas aos volumes necessários; 3. Procedimentos de segurança laboratorial e de qualidade, abrangendo: i. o uso de EPIs adequados e conhecimento de normas de segurança, como as BPLs e a ISO 17025 (2017); ii. higienização correta das mãos (o uso de luvas de proteção para manipulação de materiais biológicos e químicos não substitui a lavagem correta das mãos); iii. manuseio e o descarte correto de materiais biológicos, reagentes, organismos geneticamente modificados e resíduos; iv. trabalhar em condições estéreis e protegidas do operador (prevenir a contaminação das amostras pelo operador) durante o preparo da reação;</p> <p>Realizar e renovar treinamento para a manutenção e atualização de habilidades e cuidados necessários.</p>	

6. Protocolo da validação

O estabelecimento de todos os critérios para a qualificação do ambiente, dos reagentes, dos equipamentos e da equipe possibilita o estabelecimento do protocolo de validação, que descreve todos os procedimentos experimentais necessários para a execução do método e para o cálculo dos parâmetros de desempenho. A PCR é caracterizada como uma reação enzimática e necessita de condições ótimas para ter um excelente desempenho. Os fatores que influenciam uma reação enzimática são o tempo de reação, o pH, a temperatura, a presença de cofatores (algumas enzimas dependem de cofatores para funcionarem adequadamente) e a concentração do substrato. Nesse caso, para que as reações sejam mais específicas e com total reprodutibilidade é necessário o estabelecimento de um protocolo padronizado para as condições ótimas da reação.

As amostras, os reagentes e a condições para a realização da PCR devem seguir as recomendações descritas na tabela 2. Recomenda-se o uso de um procedimento operacional padrão (POP) para ser seguido rigorosamente durante os experimentos que ocorrem no processo pré-analítico, analítico e pós-analítico da PCR. Algumas recomendações importantes para o processo de validação serão descritas aqui.

Processo pré-analítico do método de PCR:

1. Ter disponíveis amostras de um DNA de referência, que serão empregadas como controle positivo das reações. Uma estratégia para ter disponível um DNA de referência, que pode ser empregado na rotina é a obtenção de sequências clonadas, contendo a região alvo, por exemplo, um marcador molecular utilizando-se a região ITS (Internal Transcribed Spacer) clonada em um vetor, que pode ser sempre usado como um controle positivo para as PCR. Outra estratégia é adquirir comercialmente um DNA de referência de um provedor confiável com sistema de qualidade implantado;
2. Verificar o grau de pureza e quantificação do DNA (referência ou alvo) por meio de análise: a. eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida contendo o padrão de peso molecular (ladder) adequado (ponto de referência e monitoramento para a eletroforese). Verificar o tamanho, a nitidez das bandas, a presença de rastros ou distorções destas, a separação entre as bandas e a qualidade do contraste; b. método espectrofotométrico, no qual se utiliza a leitura da absorbância em 260 nm (A260) e realiza-se o cálculo da concentração pelo uso do coeficiente e extinção molar ($\epsilon=20 \text{ mL}/(\text{mg} \times \text{cm})$). Fazer as medidas espectrofotométricas em triplicatas para obtenção de média e desvio padrão das concentrações das amostras diferentes. A presença de contaminantes potenciais pode ser evidenciada pelas leituras de absorbância a 260 (A260) e a 280 nm (A280), onde a razão A260/A280 deve estar entre 1,75-2,0 que se refere à ausência de agentes contaminantes como proteínas e moléculas aromáticas que apresentam absorbância a 280 nm.

Processo analítico do método de PCR

1. Homogeneizar bem os reagentes e mantê-los em temperatura baixa (por exemplo, no gelo ou suporte tipo PCR-Cooler). Preparar o mix da reação de acordo com os protocolos otimizados pelo laboratório. Após o término do procedimento, os microtubos contendo as reações devem ser corretamente acondicionadas para as análises posteriores.
2. Utilizar diferentes pares de oligonucleotídeos: i. Oligonucleotídeo universal para a detecção geral do DNA alvo ou de referência e o não alvo; ii. Oligonucleotídeo específico para a detecção do DNA alvo ou de referência; iii. Oligonucleotídeo específico para a detecção de DNA de espécies próximas geneticamente.
3. Realizar a reação em cinco repetições: a. 5 reações contendo o DNA de referência ou DNA alvo (controle positivo); b. 5 reações contendo um DNA não-alvo (controle negativo); c. 2 reações contendo o controle de reagente; d. 2 reações contendo o controle ambiental. Usar os oligonucleotídeos de acordo com a reação (Figura 6). Repetir o processo, no mínimo mais duas vezes, preferencialmente, por dois analistas e em dias diferentes. Cada dia representa uma rodada. Neste plano de validação, foram considerados dois analistas e três dias diferentes.

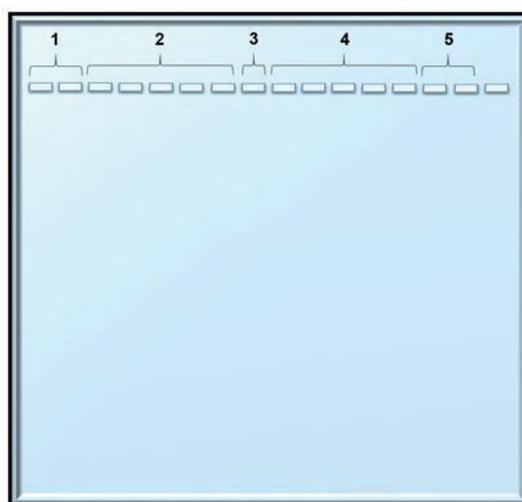


Figura 6. Exemplo de aplicação das reações no gel de agarose, realizadas pelo analista1, mostrando as repetições para cada controle (positivo e negativo): 1. Controle de reagente; 2. DNA de referência ou alvo (controle positivo); 3. Marcador molecular; 4. DNA não alvo (controle negativo); 5) Controle ambiental.

Processo pós-analítico do método de PCR e determinação dos parâmetros de desempenho

Ao realizar a PCR da amostra contendo o DNA alvo ou o DNA de referência com os oligonucleotídeos específicos para sua amplificação, os resultados esperados para as amostras são o aparecimento de bandas características no gel de agarose ou poliacrilamida, comparando-se com as bandas do marcador de peso molecular, indicando a correta amplificação do DNA. Para os controles negativos, o que se espera é ausência de bandas no gel. Desta forma, no processo de validação, o que se busca é testar o método quanto à sua capacidade de gerar resultados previamente

conhecidos. No entanto, como todo método analítico é passível de erros sistemáticos e aleatórios, há a possibilidade de ocorrerem resultados não desejados, como os falsos positivos e os falsos negativos. O objetivo da validação é mostrar o quanto exatos e precisos são os resultados gerados pelo método, dentro de uma faixa de erro conhecida.

Os resultados derivados da PCR e interpretados a partir das imagens dos géis de agarose ou poliacrilamida serão usados para a construção de tabelas de dados (Tabela 3), cujo preenchimento tornará possível os cálculos dos parâmetros de desempenho do método de PCR convencional (Tabela 4). Para que haja excelência na análise dos resultados, é importante o acompanhamento dos dados brutos pelo responsável do laboratório, que deverá observar a exatidão do registro dos resultados, a legibilidade, a correção das unidades e a interpretação dos resultados. Por parte dos analistas, para a excelência da análise dos dados é necessário que os registros sejam feitos de forma legível e detalhada em caderno tipo Ata. Um aspecto operacional importante a ser executado é o registro dos números dos lotes dos reagentes, das informações das soluções do laboratório, das pipetas usadas para possibilitar a rastreabilidade e a resolução de problemas. No caso de dados eletrônicos ou daqueles obtidos pelos equipamentos, é imprescindível ter procedimentos padronizados de transmissão, guarda e segurança de dados.

Para o plano de validação, o registro dos dados e o cálculo dos parâmetros da validação estão mostrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Registro dos dados obtidos da análise de PCR.

Primeira rodada – oligonucleotídeo universal		
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Número de verdadeiros positivos (NVP). <i>Número de reações com o DNA alvo ou de referência (controle positivo) e que apresentaram bandas características no gel.</i>	X	X'
Número de verdadeiros negativos (NVN) <i>Número de reações com o DNA não alvo (controle negativo) e que não apresentaram bandas no gel (ou apresentaram bandas em alturas diferentes do DNA alvo ou de referência).</i>	X1	X'1
Número de falsos-positivos (NFP) <i>Número de reações com o DNA não alvo (controle negativo), mas que apresentaram bandas características no gel de reações contendo DNA alvo ou de referência.</i>	X2	X'2
Número de falsos-negativos (NFN) <i>Número de reações com o DNA de referência (controle positivo), mas que não apresentaram bandas características no gel.</i>	X3	X'3
Número total de reações (N) por analista (oligonucleotídeo específico)	30	30

Repete-se o registro dos dados para as outras duas rodadas (em dias diferentes). O total de reações considerando os dois analistas e o oligonucleotídeo específico é de 60. O cálculo dos parâmetros de desempenho não foi efetuado considerando-se os dados do oligonucleotídeo universal, uma vez que este também amplifica o DNA não alvo, o que impossibilitaria o cálculo da especificidade, valor preditivo negativo e razão de falsos positivos. Apesar disso, o uso do oligonucleotídeo universal é importante para verificar a integridade do DNA e a presença de inibidores de reação. Com os dados registrados na tabela 3, é possível realizar o cálculo dos parâmetros de desempenho do método, como exposto na tabela 4. Deve-se ressaltar que as reações referentes aos controles de reagentes e ao controle ambiental não devem apresentar bandas no gel para que o cálculo dos parâmetros possa ser realizado. Se esses controles apresentarem bandas, devem-se repetir as reações.

Tabela 4. Cálculo dos parâmetros de desempenho.

Operador	Razão de Falsos-positivos (% Fp)	Razão de Falsos-negativos (% Fn)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Eficiência (%)
Fórmula	$\frac{Fp}{Vn+Vp} (.100\%)$	$\frac{Fn}{Vp+Fn} (.100\%)$	$\frac{Vp}{Vp+Fn} (.100\%)$	$\frac{Vn}{Vn+Fp} (.100\%)$	$\frac{Vp+Vn}{Vp+Vn+Fp+Fn} (.100\%)$
Analista 1	$\frac{X2}{15} (.100\%)$	$\frac{X3}{15} (.100\%)$	$\frac{X}{15} (.100\%)$	$\frac{X1}{15} (.100\%)$	$\frac{X+X1}{30} (.100\%)$
Analista 2	$\frac{X2}{15} (.100\%)$	$\frac{X3}{15} (.100\%)$	$\frac{X}{15} (.100\%)$	$\frac{X1}{15} (.100\%)$	$\frac{X+X1}{30} (.100\%)$

A realização dos experimentos de validação por dois analistas é importante para averiguar a precisão do método e para comparação entre analistas. O cálculo dos parâmetros também poderá ser feito considerando todo o conjunto de dados obtido pelos analistas. Neste caso, deve-se considerar:

$$Vp = X + X'$$

$$Vn = X1 + X'1$$

$$Fp = X2 + X'2$$

$$Fn = X3 + X'3$$

$$Vp + Fn = 30$$

$$Fp + Vn = 30$$

$$Vp + Vn + Fp + Fn = 60$$

Na interpretação dos dados espera-se que os critérios de aceitação anteriormente determinados pelo laboratório em relação aos parâmetros de desempenho sejam atendidos. Se algum dos parâmetros apresentar um resultado que não atende ao critério de aceitação, será preciso analisar criticamente os resultados e julgar se o protocolo e o método atendem aos objetivos a que ele se propõe junto aos clientes. Caso não atenda, terão que ser realizadas alterações no protocolo ou mesmo substituir o método a ser empregado.

A análise crítica do resultado requer a identificação de possíveis causas do resultado em não conformidade. Em seguida, deverão ser propostas ações de correção ou melhoria, como demonstradas na tabela 5:

Tabela 5. Tipos de erros na PCR, suas causas e possíveis ações de correção

Resultado	Causa	Ação
falsos positivos e falsos negativos	Contaminação geral do laboratório; problemas de qualidade dos materiais biológicos, materiais de consumo (reagentes, enzimas, água, microtubos, ponteiras, entre outros) utilizados; falta de especificidade do oligonucleotídeo (primer); problemas de manipulação (problemas com a habilidade do operador).	Realizar a limpeza do local de trabalho e de outros materiais consumíveis; verificar se todos os parâmetros que qualificam os reagentes, equipamentos, ambiente e pessoal foram atendidos; refazer as soluções; verificar a qualidade da água; monitorar a presença de inibidores da reação de PCR com utilização de controle interno apropriado para cada reação; repetir a reação; verificar o desenho dos oligonucleotídeos do DNA alvo ou de referência; verificar a qualidade do DNA e se necessário refazer a extração do DNA alvo; renovar o treinamento da equipe nas etapas, procedimentos e cuidados da PCR; estabelecer protocolos acessíveis e de fácil entendimento para sua utilização e interpretação.

Proposta de um protocolo de validação para ensaios microbiológicos (viabilidade e pureza)

Os ensaios microbiológicos frequentemente possuem protocolos de análises de viabilidade e pureza de microorganismos. Essas análises possuem caráter qualitativo e possuem como parâmetros de desempenho a porcentagem de falsos positivos e de falsos negativos, sensibilidade, especificidade e eficiência. Além destes parâmetros, a precisão dos métodos de análise também pode ser testada no que se refere a sua repetibilidade e reprodutibilidade. Neste trabalho, foi proposto um protocolo de validação que representa uma parte do plano de validação para ser aplicado aos ensaios microbiológicos. Não foi intenção apresentar neste trabalho o plano de validação completo, que é de grande importância, mas que poderá ser apresentado em uma futura publicação. A construção do protocolo foi baseado em artigos e referências nacionais e internacionais, cujas citações se encontram no item 4 do texto que se segue. Como já foi dito no plano de validação de PCR, este protocolo não está fechado e pode sofrer modificações e atualizações pelas pessoas interessada, sempre observando as necessidades do cliente e os requisitos necessários do método para uma dada aplicação ou campo de aplicação.

1. **Escopo:** Viabilidade e pureza de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) pelos métodos de plaqueamento e análise visual.

2. **Classe de ensaio:** ensaio biológico

3. **Produtos ensaiados:** isolados de fungos ou bactérias devidamente identificados por especialistas.

4. **Parâmetros de validação que serão determinados:** repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e eficiência (Feldsine et al., 2002; ISO 2016; Albano; Raya-Rodriguez, 2008; FDA, 2019; EPA, 2020).

(Parte 1) Procedimento para determinação da repetibilidade e reprodutibilidade do método de determinação da viabilidade (recuperação) de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) por plaqueamento e análise visual.

CONCEITOS:

REPETIBILIDADE: Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo método, mesmo equipamento e mesmo operador).

REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL: Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob condições variadas de medição interna (equipamentos diferentes ou operadores diferentes).

PROCEDIMENTO:

1. Inocular os micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) padrão (controle positivo) em placas de Petri, contendo meio de cultura apropriado. Confeccionar 30 placas, totalizando três rodadas com dez placas. Em cada rodada, deve-se modificar a variável tempo (plaqueamento em dias diferentes) ou operador (analistas diferentes) (PASSO 1). No caso deste protocolo, adotou-se analistas diferentes.

2. Preparar 30 placas com o micro-organismo inativo (ausente, controle negativo), totalizando três rodadas com dez placas (PASSO 2);

3. Estabelecer critérios que mensurem a viabilidade (recuperação) do micro-organismo, tais como: cor, formato, tamanho, etc. Estes critérios devem ser estabelecidos por especialistas de acordo com o micro-organismo escolhido como padrão (controle positivo);

4. Realizar a análise da viabilidade por dois analistas, que deverão registrar em ata o resultado da análise de cada placa como viável (recuperado) ou não viável (PASSO 3).

Ao analisar a viabilidade (recuperação) dos controles positivos, cada analista deve realizar os registros como descrito nas tabelas 7, 8 e 9, de acordo com a tabela 6 e calcular e registrar a reprodutibilidade e a repetibilidade. Os dados nas tabelas 7, 8 e 9 são fictícios.

Tabela 6. Registros das análises das placas (controle positivo) quanto à viabilidade dos micro-organismos:

Viável	1
Não Viável	0
Resultados Iguais	Amplitude Zero
Resultados Diferentes	Amplitude 1
Resultado Esperado	10 Amplitudes 0 (Todas Viáveis) = 100% Concordância

Cálculo da Reprodutibilidade:

a) Registro dos dados de viabilidade (recuperação) dos controles positivos dos dois analistas nas tabelas 7 (primeira rodada), 8 (segunda rodada) e 9 (terceira rodada), usando como base a tabela 6.

Tabela 7. Primeira rodada – inoculado 1 – controle positivo

AMOSTRAS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	AMPLITUDE
1	1	1	0
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	1	1	0
6	0	1	1
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	1	1	0
Total de discordâncias			1
Porcentagem de resultados em conformidade			90%

Tabela 8. Segunda rodada – inoculado 2 – controle positivo

AMOSTRAS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	AMPLITUDE
1	1	1	0
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	1	1	0
6	1	1	0
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	1	1	0
Total de discordâncias			0
Porcentagem de resultados em conformidade			100%

Tabela 9. Terceira rodada – inoculado 3 – controle positivo

AMOSTRAS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	AMPLITUDE
1	1	1	0
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	1	0	1
6	1	0	1
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	1	1	0
Total de discordâncias			2
Porcentagem de resultados em conformidade			80%

b) Cálculo da reprodutibilidade (média do resultado das três rodadas).
 $(90\% + 100\% + 80\%) / 3 = 85,3\%$

Cálculo da Repetibilidade:

a) Registro dos dados de viabilidade (recuperação), dos dois analistas, na tabela 10, para o cálculo da repetibilidade.

Tabela 10. Registro de dados para cálculo da repetibilidade.

Rodadas	Analistas	Número de Isolados Viáveis	Número de Isolados Não Viáveis	%Acerto
1	1	9	1	90
	2	10	0	100
2	1	10	0	100
	2	10	0	100
3	1	10	0	100
	2	10	2	80

b) Cálculo da repetibilidade (média do resultado das três rodadas).

REPETIBILIDADE ANALISTA 1: $90 + 100 + 100 / 3 = 96,7\%$

REPETIBILIDADE ANALISTA 2: $100 + 100 + 80 / 3 = 93,3\%$

Ao analisar a viabilidade (recuperação) dos controles negativos, cada analista deve realizar os registros como exemplificado nas tabelas 7 a 9, usando como base a tabela 11.

Tabela 11. Registros das análises das placas (controle negativo) quanto à viabilidade dos micro-organismos:

Viável	1
Não Viável	0
Resultados Iguais	Amplitude Zero
Resultados Diferentes	Amplitude 1
Resultado Esperado	10 Amplitudes 0 (Todas não viáveis) = 100% Concordância

Os cálculos da reprodutibilidade e repetibilidade quanto à viabilidade dos controles negativos devem ser realizados da mesma forma como foi demonstrado para o ensaio da viabilidade dos controles positivos.

(Parte 2) Procedimento para determinação da repetibilidade e reprodutibilidade do método de determinação da pureza de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) por plaqueamento e análise visual.

PROCEDIMENTO:

1). Inocular microrganismos padrão (fungos ou bactérias preservados) puros (controle positivo) em placas de Petri, contendo meio de cultura apropriado. Confeccionar 30 placas, totalizando três rodadas com dez placas. Em cada rodada, deve-se modificar a variável tempo (plaqueamento em dias diferentes) ou operador (analistas diferentes. No caso deste protocolo, adotou-se analistas diferentes. (PASSO 1);

2). Preparar 30 placas com o micro-organismo padrão contaminado (controle negativo), totalizando três rodadas com dez placas (PASSO 2);

3). Estabelecer critérios que mensurem a pureza do micro-organismo, tais como: cor, formato, tamanho, etc. Estes critérios devem ser estabelecidos pelos especialistas de acordo com o micro-organismo escolhido como padrão (controle positivo)

4). Realizar a análise da pureza por dois analistas, que deverão registrar em ata o resultado de pura ou contaminada (PASSO 3).

Ao analisar a pureza, dos controles positivos, cada analista deve realizar os registros como exemplificado nas tabelas 7 a 9, de acordo com a tabela 12 e calcular e registrar a reprodutibilidade e a repetibilidade.

Tabela 12. Registros das análises das placas (controle positivo) quanto a pureza dos micro-organismos:

Pura	1
Contaminada	0
Resultados Iguais	Amplitude Zero
Resultados Diferentes	Amplitude 1
Resultado Esperado	10 Amplitudes 0 (Todas puras) = 100% Concordância

Tabela 13. Registros das análises das placas (controle negativo) quanto à pureza dos micro-organismos:

Pura	1
Contaminada	0
Resultados Iguais	Amplitude Zero
Resultados Diferentes	Amplitude 1
Resultado Esperado	10 Amplitudes 0 (Todas contaminadas) = 100% Concordância

Os cálculos da reprodutibilidade e repetibilidade quanto à pureza dos controles negativos devem ser realizados da mesma forma como foi demonstrado para o ensaio da viabilidade.

(Parte 3) Procedimento para determinação da Sensibilidade, Especificidade e Eficiência dos métodos de determinação da viabilidade e pureza de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) por plaqueamento e análise visual.

PROCEDIMENTO:

1). Para o cálculo da Sensibilidade, Especificidade e Eficiência do método de determinação da viabilidade de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) por plaqueamento e análise visual, considerar para cada analista:

Verdadeiros positivos (VP) = número de amostras/placas com micro-organismos viáveis (recuperados) na análise dos controlos positivos. Valor esperado = 30

Falsos negativos (FN) = número de amostras/placas não viáveis na análise dos controlos positivos. Este número representa o número de placas que o analista reconheceu como não viável sendo verdadeiramente viável. Espera-se teoricamente um valor = 0.

Verdadeiros negativos (VN) = número de amostras/placas com micro-organismos não viáveis na análise dos controlos negativos. Valor esperado = 30

Falsos positivos (FP) = número de amostras viáveis na análise dos controlos negativos. Este número representa o número de placas que o analista reconheceu como viável sendo verdadeiramente não-viável (micro-organismo inativo). Espera-se teoricamente um valor = 0

2). Com os resultados obtidos para VP, FN, VN e FP, proceder os cálculos dos parâmetros de desempenho do ensaio da determinação da viabilidade de micro-organismos por plaqueamento e análise visual, como demonstrado na tabela 14.

Tabela 14. Cálculo dos parâmetros de desempenho do método de determinação da viabilidade de micro-organismos (fungos ou bactérias) pelo método de plaqueamento e análise visual.

Operador	Razão de Falsos-positivos (% Fp)	Razão de Falsos-negativos (% Fn)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Eficiência (%)
Fórmula	$\frac{Fp}{Vn+Vp} (.100\%)$	$\frac{Fn}{Vp+Fn} (.100\%)$	$\frac{Vp}{Vp+Fn} (.100\%)$	$\frac{Vn}{Vn+Vp} (.100\%)$	$\frac{Vp+Vn}{Vp+Vn+Vp+Fn} (.100\%)$
Analista 1	$\frac{Fp}{30} (.100\%)$	$\frac{Fn}{30} (.100\%)$	$\frac{Vp}{30} (.100\%)$	$\frac{Vn}{30} (.100\%)$	$\frac{Vn+Vn}{60} (.100\%)$
Analista 2	$\frac{Fp}{30} (.100\%)$	$\frac{Fn}{30} (.100\%)$	$\frac{Vp}{30} (.100\%)$	$\frac{Vn}{30} (.100\%)$	$\frac{Vn+Vn}{60} (.100\%)$

3). Para o cálculo da Sensibilidade, Especificidade e Eficiência do método de determinação da pureza de micro-organismos (fungos ou bactérias preservados) por plaqueamento e análise visual, considerar para cada analista:

Verdadeiros positivos (VP) = número de amostras/ placas puras na análise dos controlos positivos. No caso deste protocolo, o valor esperado = 30.

Falsos negativos (FN) = número de amostras/placas contaminadas na análise dos controlos positivos. Este número representa o número de amostras/placas que o analista reconheceu como contaminada estando pura. Espera-se teoricamente um valor = 0.

Verdadeiros negativos (VN) = número de amostras/placas contaminadas na análise dos controlos negativos. No caso deste protocolo, o valor esperado = 30.

Falsos positivos (FP) = número de amostras/placas puras na análise dos controlos negativos. Este número representa o número de amostras/placas que o analista reconheceu como pura estando contaminada. Espera-se teoricamente um valor = 0.

4). Com os resultados obtidos para VP, FN, VN e FP, proceder os cálculos dos parâmetros de desempenho do ensaio da determinação da pureza de micro-organismos por plaqueamento e análise visual, como demonstrado na tabela 14.

Agradecimentos

Agradecemos à Lílian Botelho Praça pela revisão do texto, principalmente da parte sobre “proposta de um protocolo de validação para ensaios microbiológicos (viabilidade e pureza)”.

Agradecemos também à Juciê Roniery Costa Vasconcelos Silva por trazer contribuições relativas à revisão bibliográfica sobre validação de PCR até 2008 durante seu estágio obrigatório na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação de Vera Lúcia Perussi Polez.

Referências bibliográficas

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:2017**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2017. 32 p.

ALARCÓN, B.; VICEDO, B.; AZNAR, R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p.352–364, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02768.x>>. Acesso em: 24 de jun., 2021.

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**: guia prático. Rede Metrológica RS, Porto Alegre, 2009. 139p.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Diagnostic tests 2: predictive values. **BMJ**, v. 309, n. 6947, p. 102, Jul 9, 1994.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477-487, 2005.

CORNUT, P. L.; BOISSET, S.; ROMANET, J. P.; MAURIN, M.; CARRICAJÓ, A.; BENITO, Y.; VANDENESCH, F.; CHIQUET, C. Principles and applications of molecular biology techniques for the microbiological diagnosis of acute post-operative endophthalmitis. **Survey of Ophthalmology**, v. 59, n.3, p. 286–303, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.08.002>>. Acesso em 24/06/2021.

ELLISON, S. L. R.; FEARN, T. Characterizing the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 468-476, 2005.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Environmental protection agency microbiological methods of analysis**. Disponível em: <http://www.epa.gov/fem/pdfs/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf> . Acesso em: 29 dez. 2020.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for the validation of chemical methods in food, feed, cosmetics, and veterinary products**. 3.ed. 2019. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM273418.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1187-1200, Sep-Oct. 2002.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Plano de validação-guia**: parte 1 - conceitos. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/plano-mestre-de-validacao-guia-parte-i-conceitos/>>. Acesso em: 27 out., 2020.

FREITAS, E. I. D.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p.1073-1083, 2006.

GOWIK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 8051-8, 2009.

HOORFAR, J.; WOLFFS, P.; RÅDSTRÖM, P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. **APMIS**, v. 112, n. 11-12, p. 808-14, Nov-Dez, 2004.

HUBER, L. **Validation and qualification in analytical laboratories**. 2nd. ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

INMETRO. **DOQ-CGECRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 5, 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em: 29 jun. de 2020.

ISO. International Organization for Standardization. 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. Geneva: ISO, 2016.

KNECHER, L. M.; ROJKÍN, L. F.; CAPRIOTTI, G. A.; LORENZO, L. E. Chagas disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 207-11, Abril, 1994.

LANAGRO-MAPA. Rede de laboratórios nacionais agropecuários - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Divisão de Ensaio Químicos, Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial, DEQ/CGAL, Brasília, 2014. Disponível em: [manual-de-validacao-iqa-e-iqi-nov2014.pdf](http://www.gov.br/manual-de-validacao-iqa-e-iqi-nov2014.pdf) (www.gov.br) Acesso em: 25 de jun., 2021.

LANGTON, S. D.; LANGTON, S. D.; CHEVENNEMENT, R.; NAGELKERKE, N.; LOMBARD, B. Analyzing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 175-81, Dez. 15 2002.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008.

LIMA, M. A.; CORRÊA, I. M. **Entendendo os limites de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. 2012. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2012_2/entendendoalimentos/index.htm>. Acesso em: 15 de jun. de 2021.

LISBBY, G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. In: MELTZER, S. J. (Ed.). **PCR in Bioanalysis**. Nova Jersey: Humana Press, 1998. (Methods In Molecular Medicine, 92) Disponível em: <<https://doi.org/10.1385/0-89603-497-6:1>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

LIU, H.; WHITEHOUSE, C. A.; LI, B. Presence and persistence of Salmonella in water: the impact on microbial quality of water and food safety. **Frontiers in Public Health**, n.6, 159, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159>> acesso em: 29 de dez., 2020.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (Eds.) **Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. 2.ed. [s.l.]: Eurachem, 2014. 70 p.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília: Mapa/ACS, 2011. 72 p. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>>. Acesso em 29 de dez., 2020.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. **Psychometrika**, v. 12, n. 2, p. 153-7, Jun. 1947.

MURSALIN, M. H.; LIVINGSTON, E. T.; CALLEGAN, M. C. The cereus matter of Bacillus endophthalmitis. **Experimental Eye Research**, v. 193, n. 107959, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107959> acessado em 29/12/20.

EMBRAPA. **Procedimento Gerencial de Validação de Métodos**. (038.10.02.2.012.). Rev. 01, 14p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/2339293/9374849/Procedimento+gerencial+de+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos/36494e95-1f6a-4107-90e2-7a1379c94bb0?version=1.1>>. Acesso em: 29 dez. 2020.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

RUTHS, L. A.; MACEDO, L. M.; NASCIMENTO, M. M. F. Reação de polimerase (PCR) em cadeia. In: ARAUJO, A. L. DE; MARINHO, R. L. S.; BITTENCOURT, J. V. M. **Gestão da inovação agroindustrial: diagnóstico molecular**. Curitiba: EDUTFPR, 2017. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/>>. Acesso em: 29 de dez. 2020.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p.1350–1354, 1985. Disponível em < <https://doi.org/10.1126/science.2999980>>. Acesso em 29 de dez. 2020.

SANTOS, A. P.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; OLIVEIRA, S. T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C. S.; LACERDA, L. A.; ESTEVES, V. S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZÁLEZ, F. H. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p.443-452, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00158.x>>. Acesso: 29 de dez. 2020.

SHESKIN, D. **Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures**. 4.ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n.5, p.835-855, 2002.

TRULLOLS, E.; RUISANCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.

UNGER-HEUMANN, M. Strategy of analytical test kits. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 354, n. 7-8, p. 803-806, 1996.

VANDENBERG, O.; MARTINY, D.; ROCHAS, O.; VAN BELKUM, A.; KOZLAKIDIS, Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. **Nature Reviews Microbiology**, 2020.

