



Ministerio de Salud y Desarrollo Social
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE
“RAFAEL RANGEL”



REUNIÓN DE LA RED REGIONAL DE LABORATORIOS NACIONALES DE CONTROL DE CALIDAD DE VACUNAS “Validación de Métodos Biológicos”

Caracas 02 de marzo de 2005

María Luz Pombo
Departamento de Control de Vacunas
mpombo@inhrr.gov.ve



Contenido

- Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos
- Experiencia del establecimiento de la calificación de analistas en métodos biológicos, como parte de la validación de dichos métodos
- Sesión de preguntas

Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos

■ **Validación de métodos**

- Asegurar que el procedimiento logra el propósito para lo cual fue diseñado

■ **Parámetros evaluados en la validación de métodos**

- Linearidad
- Exactitud
- Límites de detección y cuantificación
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Precisión intermedia
 - Reproducibilidad



Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos

■ **Linealidad**

- Determinar si la medida obtenida es proporcional a la concentración del componente que se está determinando (analito)

■ **Exactitud**

- Demostrar cuanto se acerca el valor obtenido al valor aceptado o establecido

■ **Límites de detección y cuantificación**

- **LOD:** Cantidad de analito que puede ser detectado pero no cuantificado
- **LOQ:** Cantidad de analito que puede ser medido con una precisión apropiada



Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos

■ **Precisión**

□ **Repetibilidad**

- Expresa la precisión que es determinada en condiciones similares de operación, durante un intervalo corto de tiempo (Precisión intra-ensayo)

Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos

■ Precisión

□ Repetibilidad

- Expresa la precisión que es determinada en condiciones similares de operación, durante un intervalo corto de tiempo (Precisión intra-ensayo)

□ Precisión intermedia

- Expresa las variaciones dentro de un mismo laboratorio, cuando por ejemplo los ensayos son realizados en días diferentes, por más de un analista, con diferentes equipos, etc.

Definiciones y parámetros evaluados durante la validación de métodos biológicos

■ **Precisión**

□ **Repetibilidad**

- Expresa la precisión que es determinada en condiciones similares de operación, durante intervalos cortos de tiempo (Precisión intra-ensayo)

□ **Precisión intermedia**

- Expresa las variaciones dentro de un mismo laboratorio, cuando por ejemplo los ensayos son realizados en días diferentes, por más de un analista, empleando diferentes equipos, etc.

□ **Reproducibilidad**

- Expresa las variaciones existentes entre laboratorios (Precisión inter-laboratorios) y es determinada en general mediante estudios colaborativos, ya sea para el establecimiento de nuevos métodos de ensayo ó para el establecimiento de nuevos patrones de referencia

Experiencia del establecimiento de la calificación de analistas en métodos biológicos, como parte de la validación de dichos métodos

- Elaborar el protocolo de validación (calificación de analistas)
- Determinar las posibles fuentes de variación del método
 - Analista
 - Días
 - Placas de microtitulación, etc
- Establecer, cuando sea posible, los criterios de aceptación para las fuentes de variación identificadas
- Considerar siempre que el protocolo de validación debe ser llevado a cabo bajo las condiciones operativas normales del método, en cuanto por ejemplo al número de productos evaluados por cada prueba
- Evaluación estadística de los resultados obtenidos y documentación de dichos resultados
- Seguimiento de la calificación de los analistas. Re-entrenamiento y calificación de analistas no calificados

Métodos Biológicos Seleccionados para Determinar la Calificación de Analistas de Laboratorio del Departamento de Control de Vacunas del INH “RR”

■ Ensayo de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas (NIH modificado)

- Niveles de precisión evaluados: variación intra-analista/inter-días
variación inter-analistas

■ Ensayo de potencia de vacunas antisarampionosas, de virus vivo, atenuadas

- Niveles de precisión evaluados: variación intra-placas/analista/día
variación intra-analista
variación inter-analistas

■ Ensayo de potencia “in vivo” de vacunas antiamarílicas, de virus vivo, atenuadas

- Niveles de precisión evaluados: variación intra-analista
variación inter-analistas

Tabla 1: Establecimiento de la Repetibilidad (variación intra-analista) en los Métodos Biológicos Seleccionados

Método Biológico	Metodología Seguida
Ensayo de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas (NIH Modificado)	La variación de un total de 8 determinaciones/analista de la DE_{50} del PNVA-002 fue calculada (días diferentes)
Ensayo de potencia de vacunas antisarampionosas, de virus vivo, atenuadas	La variación de un total de 20 determinaciones/analista del $\log DICC_{50}$ /dosis del MVA600 fue calculada (2 series de diluciones independientes / duplicado / día, en un total de 5 días)
Ensayo de potencia “in vivo” de vacunas antiamarílicas, de virus vivo, atenuadas	La variación de un total de 6 determinaciones/analista del $\log DL_{50}$ /dosis del Patrón Regional fue calculada (días diferentes)

Tabla 2: Establecimiento de la precisión intermedia (variación inter-analistas) en los Métodos Biológicos Seleccionados

Método Biológico	Metodología Seguida
Ensayo de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas (NIH Modificado)	<u>Inter-analistas/intra-día:</u> la variación de la determinación/analista de DE_{50} de un total de 5 vacunas (en un solo día) fue calculada <u>Inter-analistas/inter-días:</u> la variación de 16 determinaciones de la DE_{50} de la repetibilidad/analista fue calculada
Ensayo de potencia de vacunas antisarampionosas, de virus vivo, atenuadas	<u>Inter-analistas/inter-días:</u> la variación de 80 determinaciones del $\log DICC_{50}$/dosis de la repetibilidad/analista fue calculada
Ensayo de potencia “in vivo” de vacunas antiamarílicas, de virus vivo, atenuadas	<u>Inter-analistas/inter-días:</u> la variación de los resultados de 24 determinaciones del $\log DL_{50}$/dosis de la repetibilidad/analista fué calculada

Tabla 3: Resultados de Repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días

“Ensayo de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas (NIH Modificado) al 2004”

Analista A			Analista B			Variación Inter-analistas	
DE ₅₀	Media (DE ₅₀) n=8	% CV	DE ₅₀	Media (DE ₅₀) n=8	% CV	Media (DE ₅₀) n=16	% CV
82,38	44,51	40,69	34,36	41,99	18,97	43,20	31,43
55,90			39,78				
47,30			45,42				
29,67			45,42				
39,98			40,71				
27,78			49,58				
30,35			27,95				
42,70			51,96				

Tabla 4: Resultados de variación inter-analista/intra-día
 “Ensayo de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas (NIH
 Modificado) al 2004”

Producto	Analista	Resultados (DE ₅₀)	Media (DE ₅₀)	% CV
VAR002-7	A	50,76	57,25	16,02
	B	63,73		
	C	Inválida		
VAR002-8	A	85,97	99,76	19,55
	B	113,55		
	C	Inválida		
VAR002-9	A	77,34	60,40	39,66
	B	43,46		
	C	Inválida		
VAR002-10	A	49,68	87,34	60,98
	B	125,00		
	C	Inválida		
PNVA-002	A	81,28	74,59	12,69
	B	67,89		
	C	Inválida		

Conclusiones

- Fueron establecidos los parámetros de precisión (repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días)
- Los resultados arrojaron una variabilidad no mayor de 31,43% cuando la determinación de DE_{50} del PNVA-002 es realizada en días diferentes, y no mayor a 61% cuando la determinación fué hecha en un sólo día, por parte de los analistas A y B. El analista C no fué incluido en la determinación de repetibilidad.
- En cuanto a la repetibilidad, el analista A presentó una variabilidad de 40,69% y el analista B de 18,97%
- Se recomendó la re-calificación de dichos analistas al menos 1 vez/año

Tabla 5: Resultados de Repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días

“Ensayo de potencia de vacunas antisarampionosas, de virus vivo, atenuadas al 2004”

Día	Resultados por analista								Inter-analistas	
	A		C		D		E		Media n=80	% CV
	Media n=4	% CV	Media n=4	% CV	Media n=4	% CV	Media n=4	% CV		
1	3,02	4,98	3,22	4,95	3,22	4,44	3,12	1,50	3,21	4,86
2	3,02	3,92	3,21	1,70	3,32	6,72	3,34	2,58		
3	3,20	5,54	3,08	2,75	3,33	7,08	3,24	1,54		
4	3,33	1,94	3,13	4,89	3,25	5,40	3,29	3,72		
5	3,16	3,82	3,36	5,20	3,26	2,96	3,12	1,86		
Media	3,15		3,20		3,27		3,22			
%CV	5,31		4,79		5,10		3,52			

Conclusiones

- Fueron establecidos los parámetros de precisión (repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días)
- En cuanto a la repetibilidad, se pudo demostrar que la variabilidad que cada analista presenta individualmente en un día, no es superior al 7,08%. La variación presentada por cada analista en un total de 5 días no supera el 5,31%, lo cual indica que el realizar análisis en días diferentes no aporta una mayor variabilidad a los resultados obtenidos.
- La variabilidad inter-analistas/inter-días obtenida es de 4,86%, lo cual indica que el realizar análisis por diferentes analistas, en diferentes días, no representa una mayor diferencia en resultados obtenidos a la hora de evaluar un lote de vacuna antisarampionosa
- Se recomendó la re-calificación de dichos analistas al menos 1 vez/año

Tabla 6: Resultados de Repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días

“Ensayo de potencia “in vivo” de vacunas antiamarílicas, de virus vivo, atenuadas al 2004”

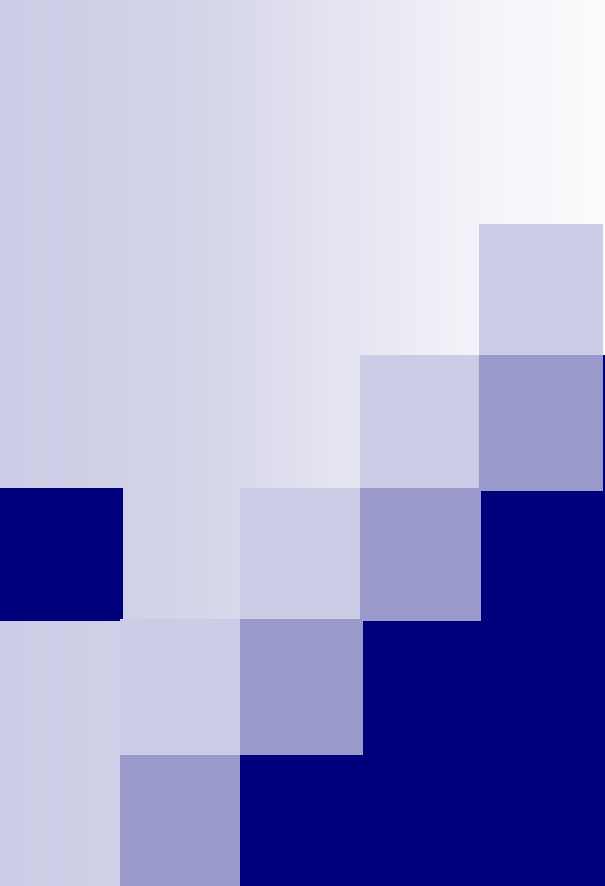
Día	Resultados de potencia obtenidos/por analista (logDL ₅₀)				Inter-analistas	
	A	C	D	E	Media n=24	% CV
1	4,32	3,81	4,57	4,56	4,29	7,07
2	4,86	4,65	4,11	4,46		
3	4,41	3,95	3,94	4,64		
4	4,14	4,50	4,31	4,63		
5	3,98	3,82	4,30	4,38		
6	3,78	4,14	4,22	4,51		
Media	4,25	4,15	4,24	4,53		
%CV	8,86	8,61	5,00	2,23		

Conclusiones

- Fueron establecidos los parámetros de precisión (repetibilidad y variación inter-analistas/inter-días)
- En cuanto a la repetibilidad, se pudo demostrar que la variabilidad que cada analista presenta individualmente no es superior al 8,86%, valor que consideramos muy bueno por tratarse del método “in vivo” para determinar la potencia de vacunas contra la fiebre amarilla
- La variabilidad inter-analistas/inter-días obtenida es de 7,07%, lo cual indica que el realizar análisis por diferentes analistas, en diferentes días, no representa una mayor diferencia en resultados obtenidos a la hora de evaluar un lote de vacuna
- Se recomendó la re-calificación de dichos analistas al menos 1 vez/año

Referencias

- ICH Q2A: Text on validation of analytical procedures (definitions, table of requirements)
- ICH Q2B: Validation of analytical procedures: methodology
- USP General Chapter <1225> Validation of compendial methods
- WHO: Validation of analytical assays
- WHO: Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization
- Fuentes de información:
 - <http://fda.gov/cder/regulatory/default.htm>
- European Pharmacopeia. Section 5.3 for potency assay analysis issues



¿Preguntas?