

ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE DOPAGEM

APRESENTAÇÃO

- ▶ Criado em 1984
- ▶ Controlo “Doping” no Desporto
- ▶ Controlo de drogas de abuso
- ▶ Diagnóstico clínico de praticantes desportivos



Acreditação de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025

Acreditação de acordo com o *International Standard for Laboratories*

AGÊNCIA MUNDIAL ANTIDOPAGEM / COMITÉ OLÍMPICO INTERNACIONAL



*Accredited
Laboratory*

METODOLOGIA

- ▶ **Espectrometria de massa (GC/MS; GC/MS-MS; LC/MS-MS)**
- ▶ **Matriz - Urina humana**
- ▶ **Métodos validados internamente**
- ▶ **Quantificação por curva de calibração**
- ▶ **Análise das amostras em triplicados independentes**
- ▶ **Controlos positivos (amostras fortificadas) em cada sequência analisados em triplicados independentes**
- ▶ **Material de referência (padrões de calibração), controlos e amostras sofrem o mesmo tratamento em cada sequência de análises**
- ▶ **Não existem materiais de referência certificados adequados**



ESTIMATIVA DA INCERTEZA - Requisitos

- ▶ Requisitos do ponto 5.4.6 - “Estimativa da incerteza” da Norma NP EN ISO/IEC 17025
- ▶ Requisitos específicos do *International Standard for Laboratories (ISL)*

“Uncertainty of quantitative results should be addressed during the validation of the assay through measurement of Repeatability, Intermediate Precision and Bias, where possible”.

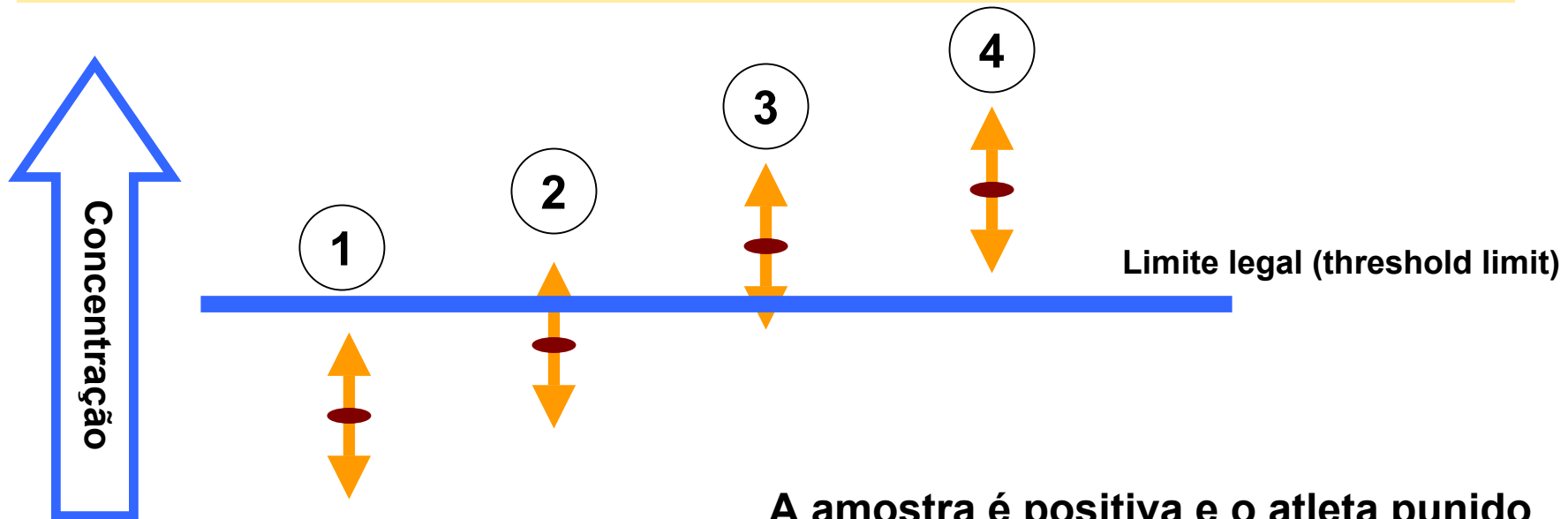
“The expression of uncertainty should use the expanded uncertainty using a coverage factor (k), to reflect a level of confidence of 95 %”.

“The estimate of uncertainty should not be included on the Test Report but must be included in the Laboratory Documentation Packages”.

ESTIMATIVA DA INCERTEZA - Requisitos

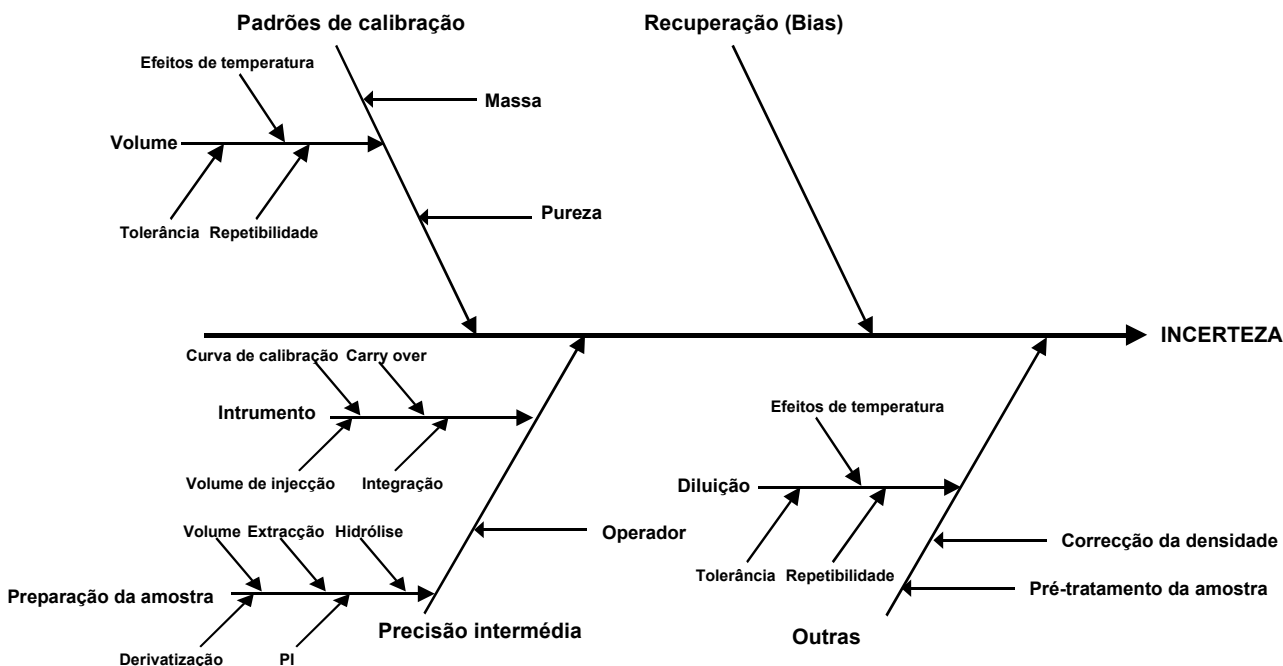
- ▶ Requisitos específicos do *International Standard for Laboratories (ISL)*

“The mean value for the B sample is required to exceed the threshold limit including consideration of uncertainty”.

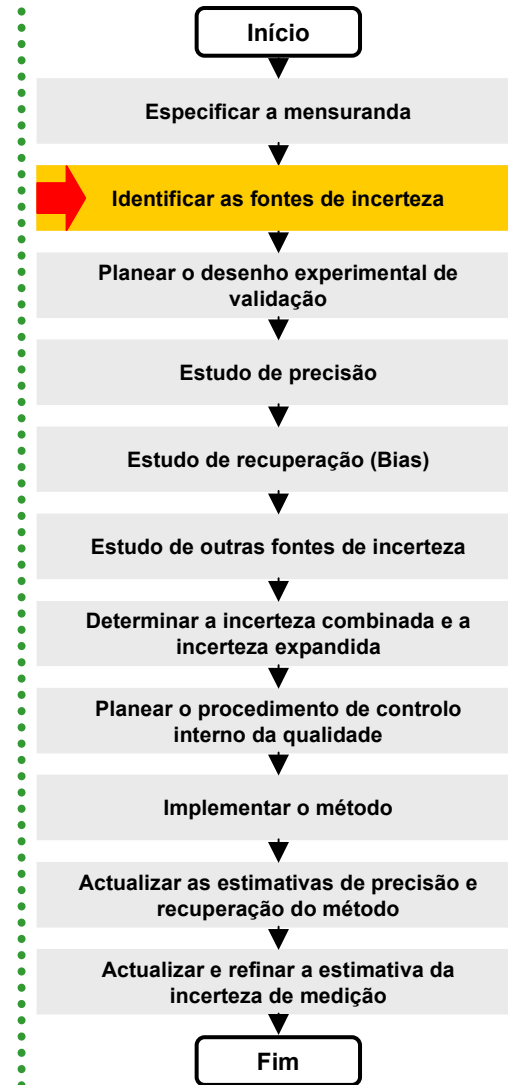


A amostra é positiva e o atleta punido apenas no caso 4.

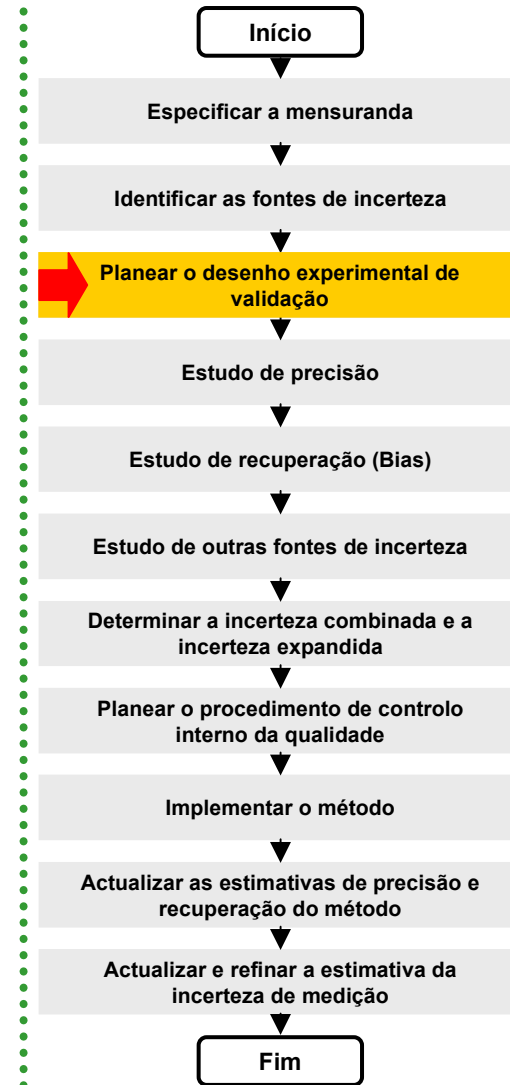
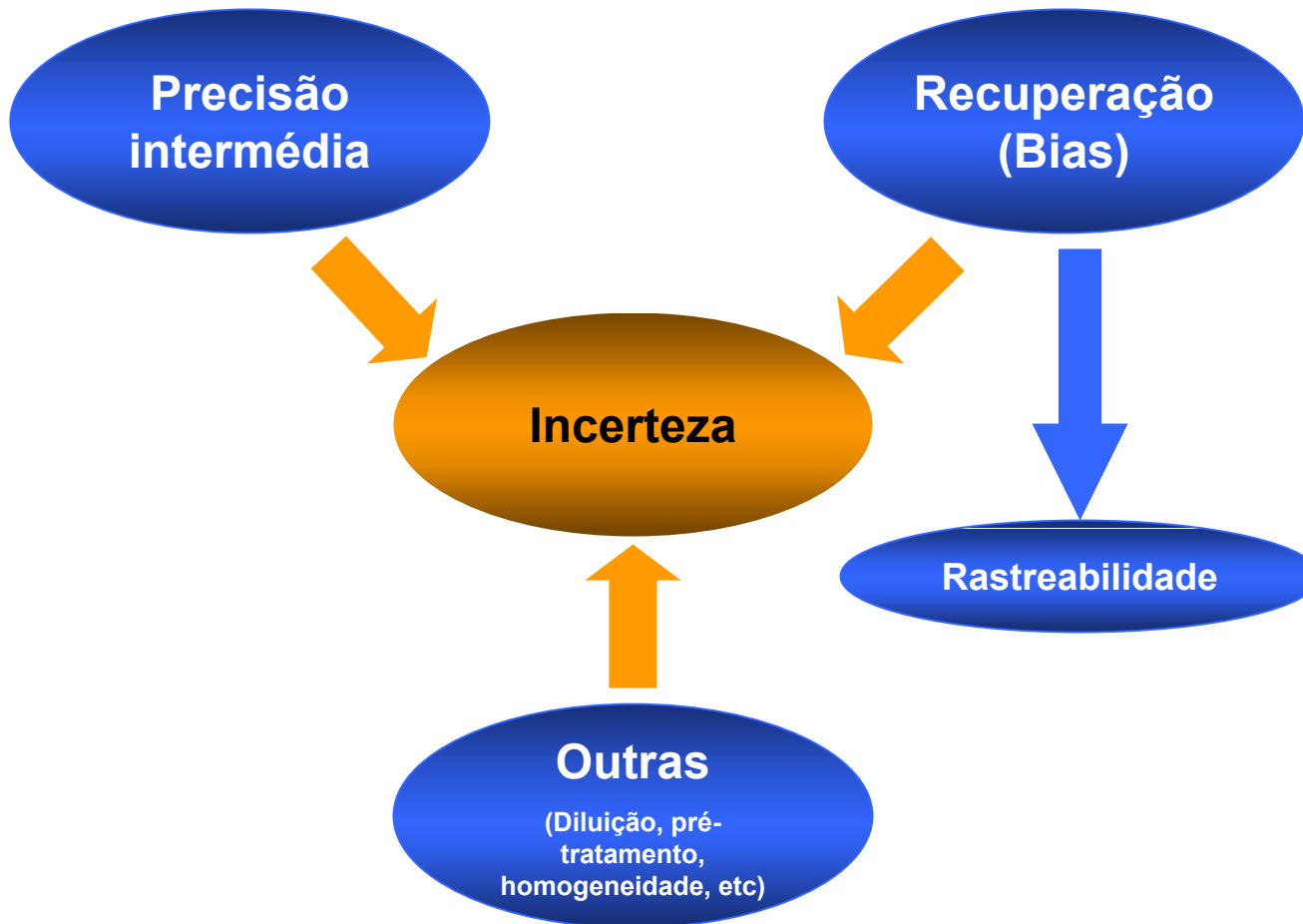
FONTES DE INCERTEZA



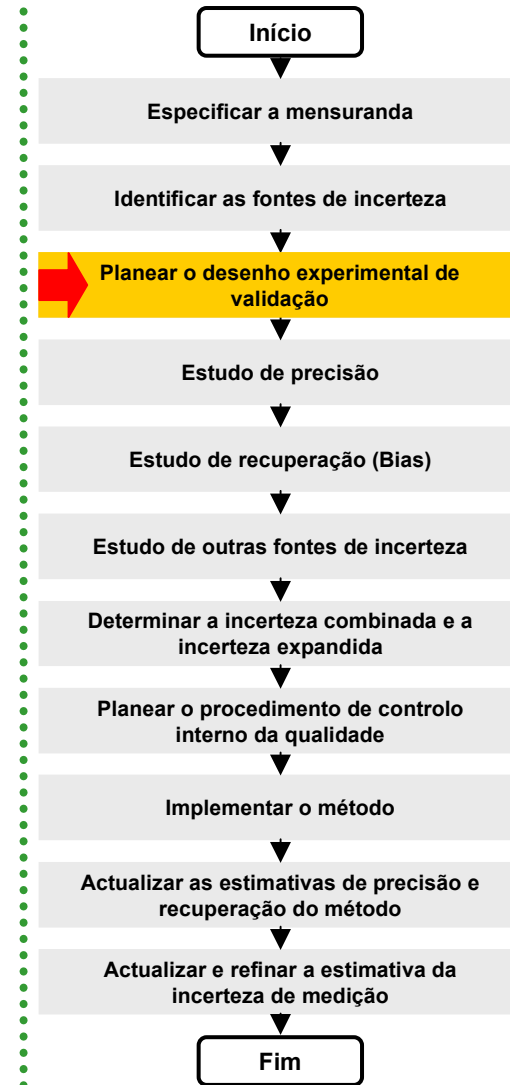
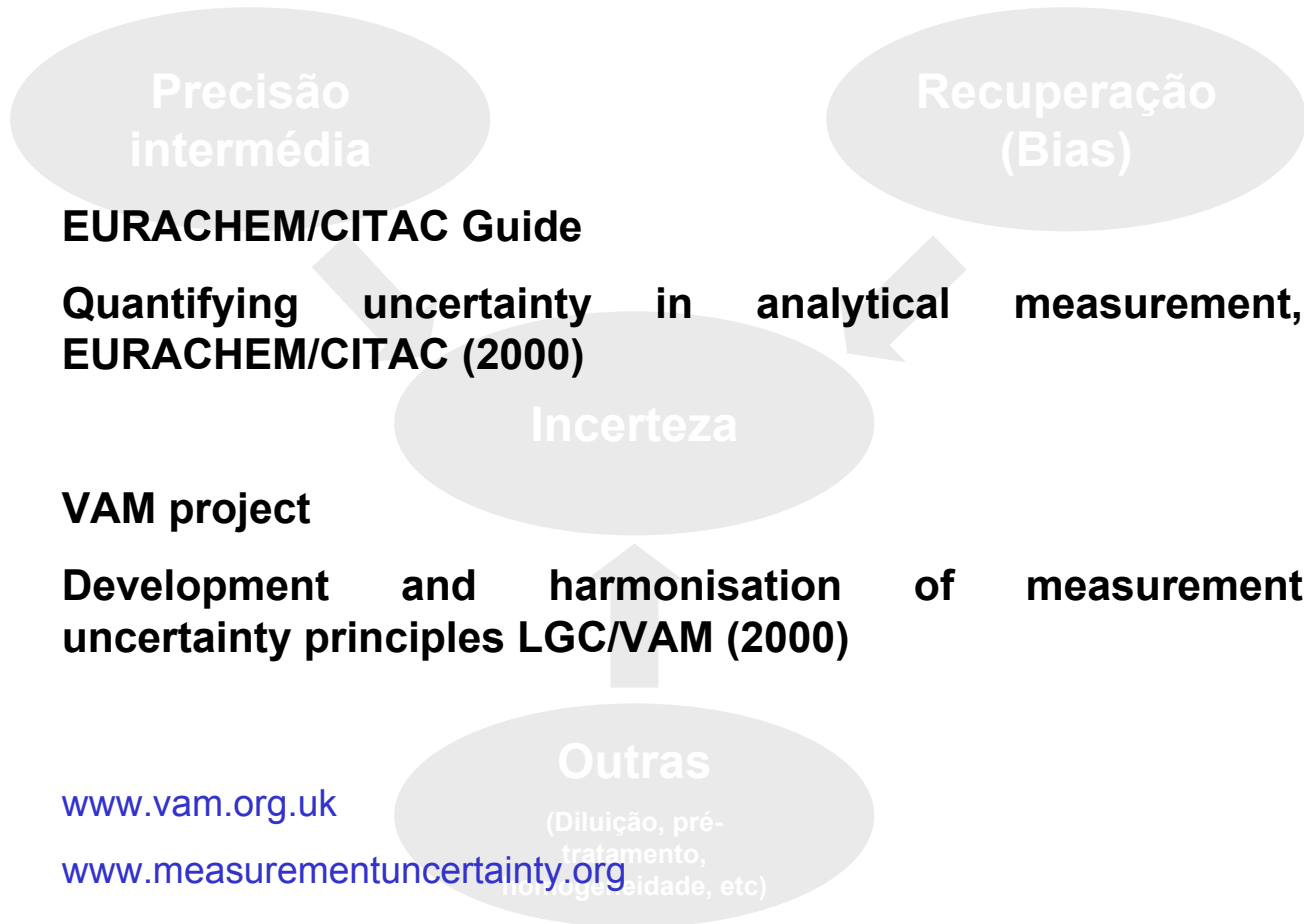
$$C_{Amostra} = C_{Analítica} \times f_{Rastreabilidade} \times f_{Outros}$$



ESTIMATIVA DA INCERTEZA



ESTIMATIVA DA INCERTEZA



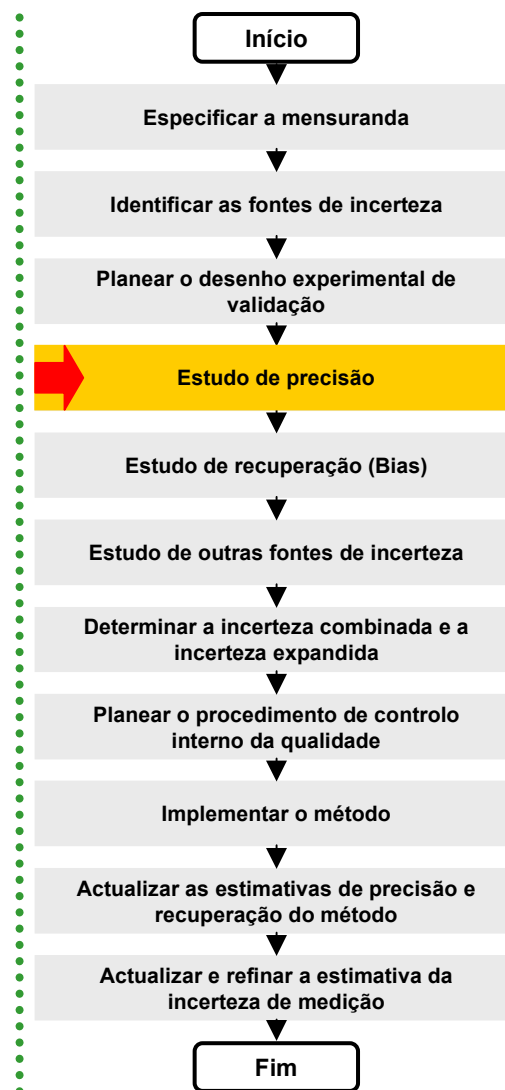
ESTUDO DE PRECISÃO

Planeamento Experimental

Amostras fortificadas a dois ou três níveis de concentração analisadas em triplicados em dias diferentes, por operadores diferentes, durante, no mínimo três meses.

O estudo ao longo do tempo permite a avaliação da contribuição combinada de diversos factores que contribuem para a precisão do método, nomeadamente:

- o tipo de urina
- operador
- condições de funcionamento do equipamento
- curva de calibração
- flutuações de temperatura e humidade
- lotes de reagentes
- mudanças de fases móveis, etc.



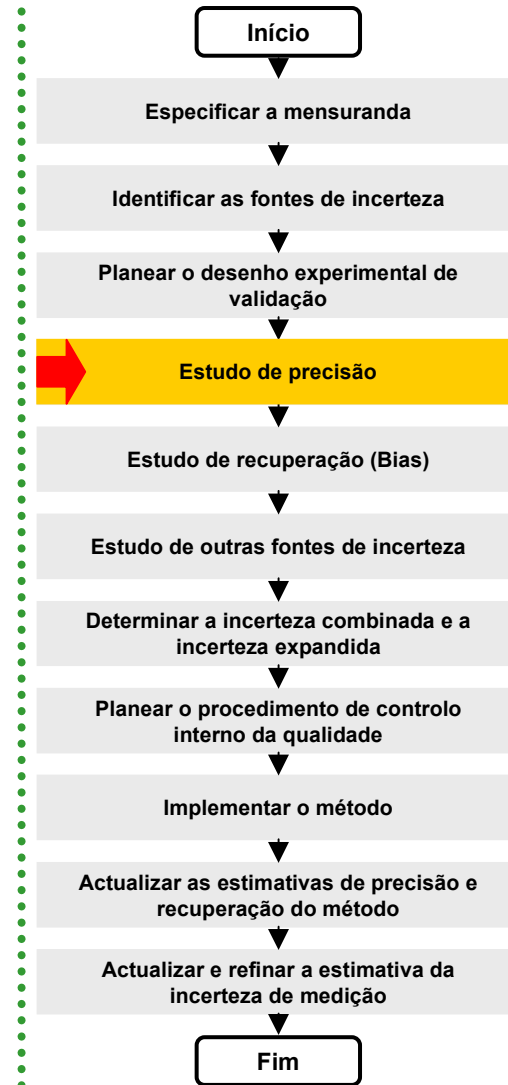
ESTUDO DE PRECISÃO

Planeamento Experimental

Amostras fortificadas a dois ou três níveis de concentração analisadas em triplicados em dias diferentes, por operadores diferentes, durante, no mínimo três meses.

O uso de replicados permite a avaliação conjunta de outras fontes de incertezas relacionadas com a repetibilidade do método, nomeadamente:

- volume de injeção
- integração dos sinais cromatográficos
- homogeneidade das amostras
- repetibilidade do detector
- Volume de padrão interno, etc.

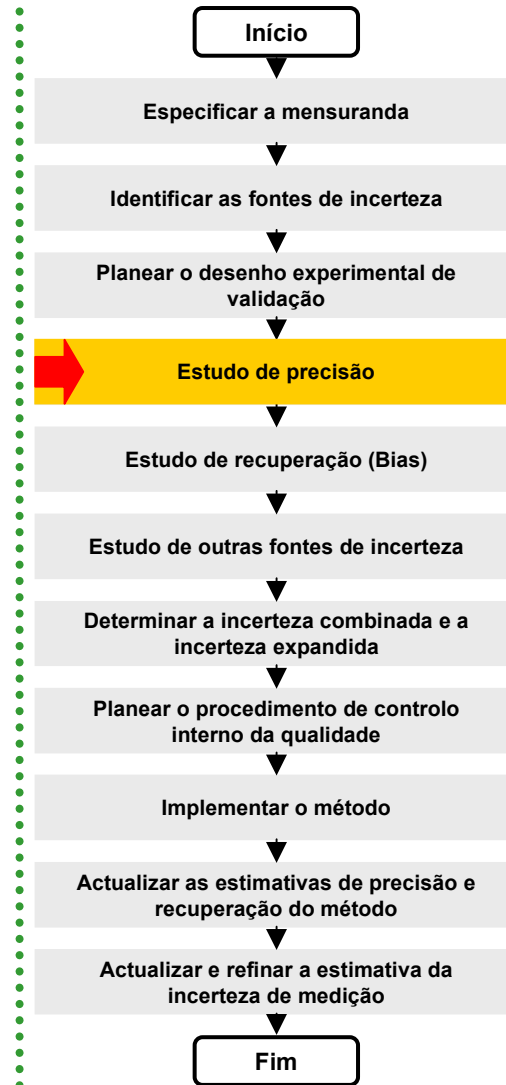
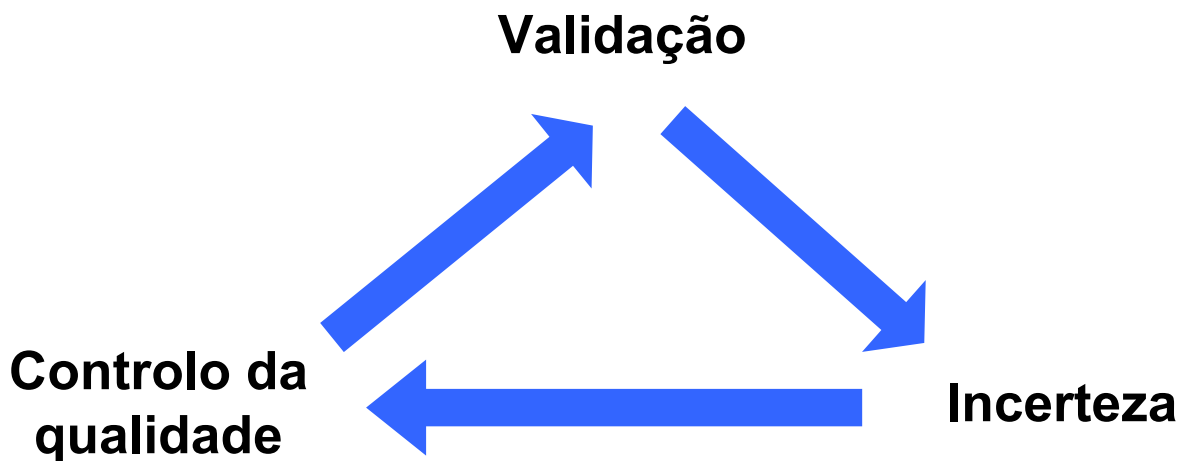


ESTUDO DE PRECISÃO

Planeamento Experimental

Amostras fortificadas a dois ou três níveis de concentração analisadas em triplicados em dias diferentes, por operadores diferentes, durante, no mínimo três meses.

O uso de dois ou três níveis de concentração permite estudar precisão do método ao longo da gama de trabalho.



ESTUDO DE PRECISÃO

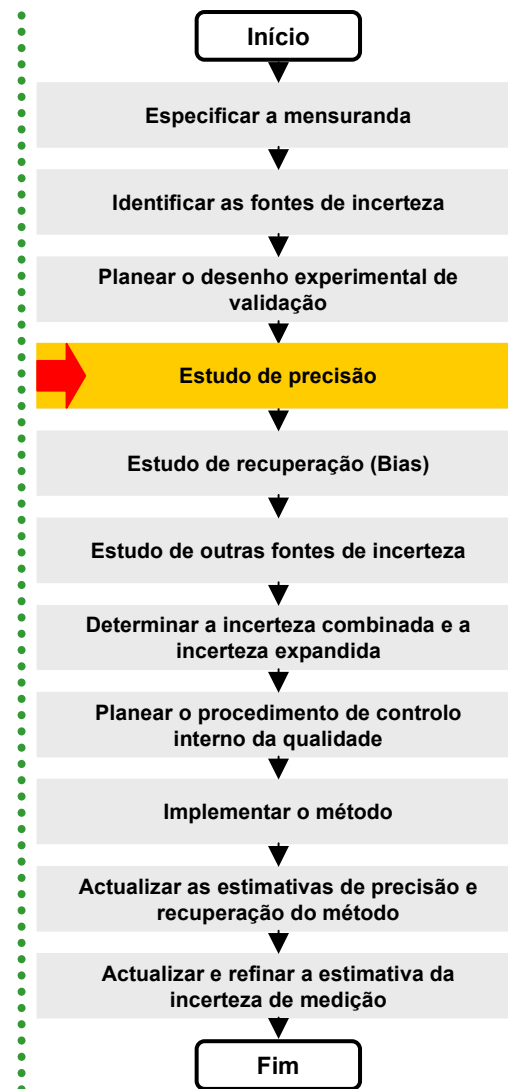
Tratamento dos resultados

(ANOVA)

Tabela ANOVA

Fonte de Variação	MQ	Graus de liberdade
Entre grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1}$	$p-1$
Dentro de grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n-1)}$	$p(n-1)$
Total		$pn-1$

p é o nº de sequências de análises de cada nível de concentração. n é o número de replicados em cada sequência. x_{ij} representa um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i . \bar{x}_i representa a média de n replicados obtidos na sequência i , e finalmente, \bar{x} é a média das média de p sequências.



ESTUDO DE PRECISÃO

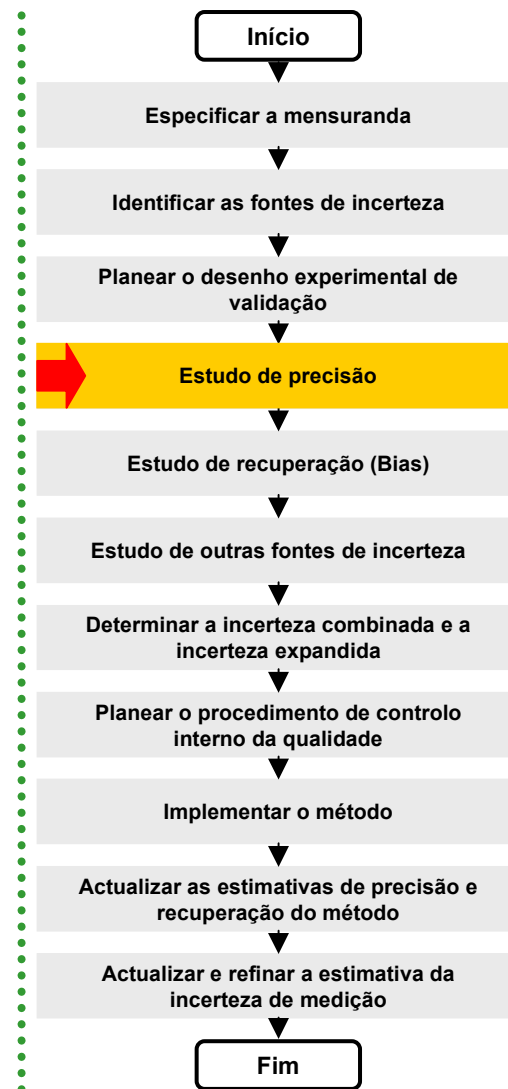
Tratamento dos resultados (ANOVA)

Cálculo das estimativas de precisão

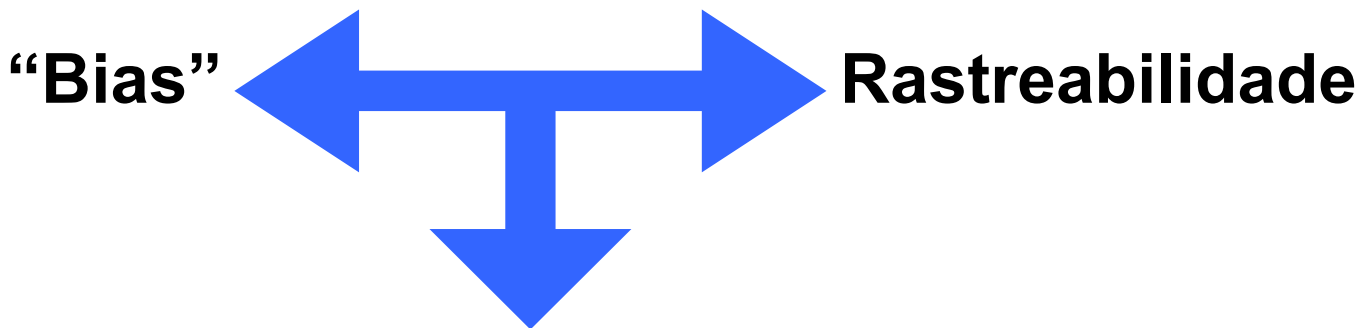
Precisão	Expressão
Repetibilidade (s_r)	$s_r = \sqrt{MS_r}$
Precisão Entre Grupos (s_{run})	$s_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia (s_I)	$s_I = \sqrt{(s_r^2) + (s_{run}^2)}$ $U_P = S_I$

ISO 5725-3 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method ISO (1994).

A.Maroto; R. Boqué; J. Riu; F. Rius Analytica Chimica Acta (2001) 133-145.



ESTUDO DE RECUPERAÇÃO “Bias”

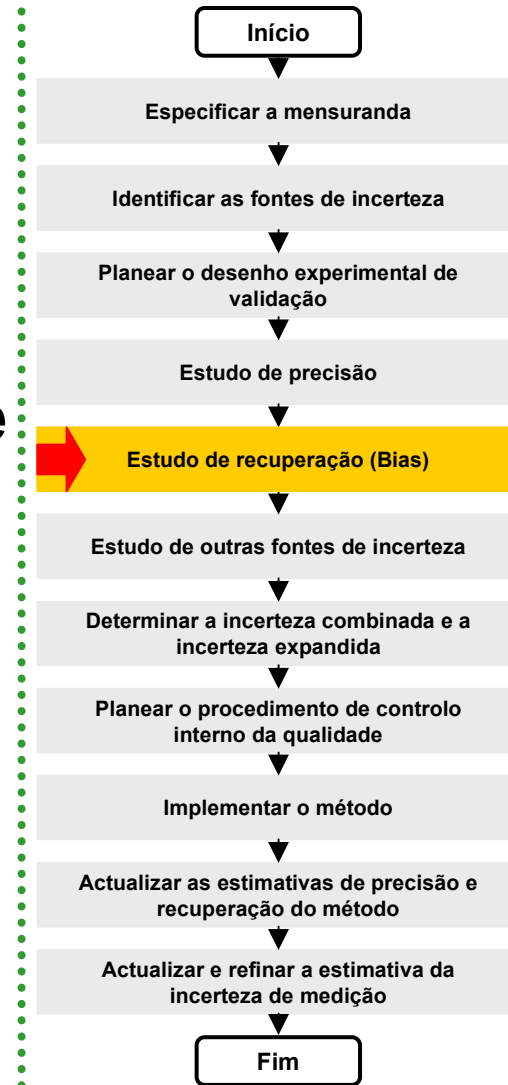


MRC

Ensaios interlaboratoriais Modelo 2

Métodos de referência

Amostras fortificadas Modelo 1



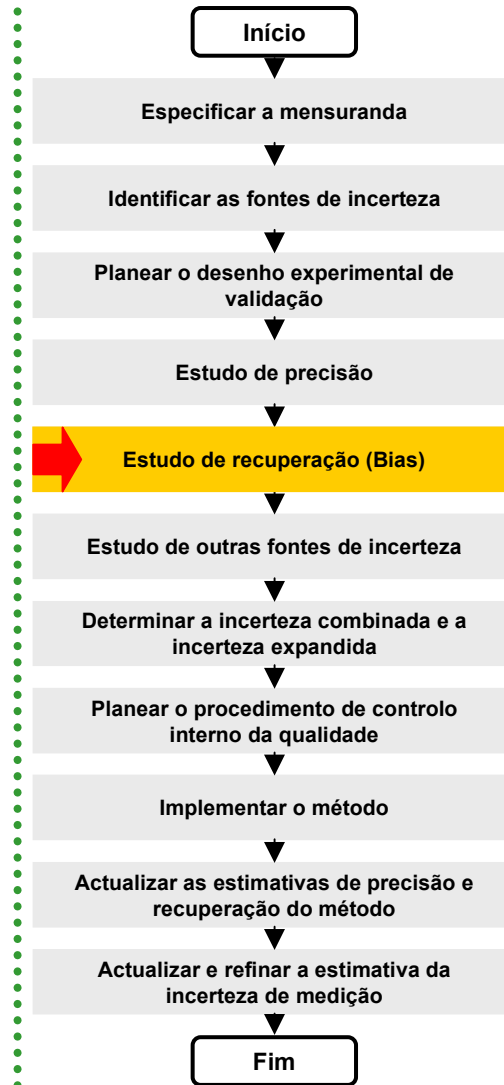
ESTUDO DE RECUPERAÇÃO “Bias”

Planeamento Experimental - MODELO 1

Amostras fortificadas a dois ou três níveis de concentração analisadas em triplicados em dias diferentes, por operadores diferentes, durante, no mínimo três meses.

O mesmo planeamento e os mesmos dados do estudo de precisão

O modelo 2 utiliza os dados dos ensaios interlaboratoriais para estimar a incerteza associada à recuperação (Bias). Esta metodologia não é abordada nesta apresentação.



ESTUDO DE RECUPERAÇÃO “Bias”

Tratamento dos resultados - MODELO 1

Recuperação $R_i = \frac{C_{Obs\ i}}{C_{Spike}}$

Recuperação Média $\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p}$

Incerteza associada à recuperação média $U_{\% \bar{R}} = \frac{S_{obs}}{\sqrt{p}}$

$t_{Exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}}$

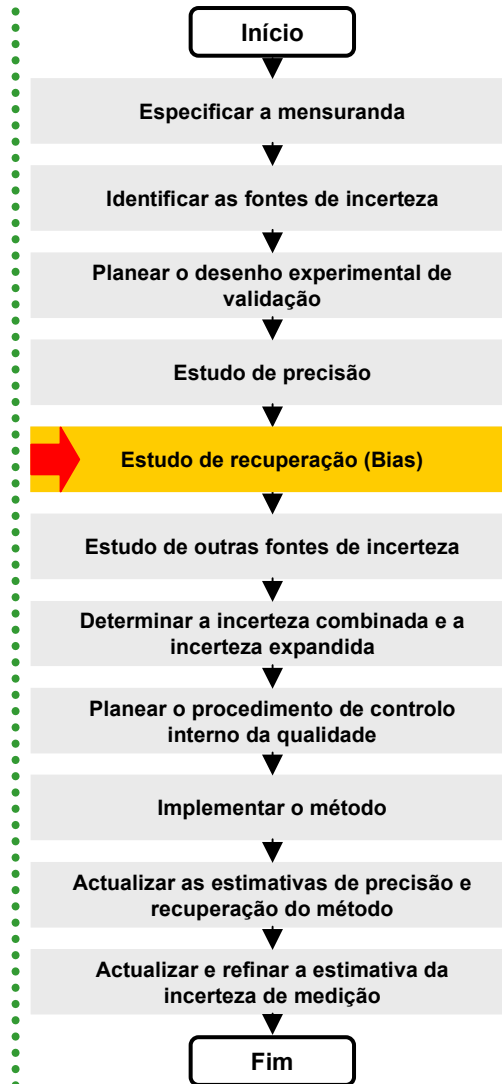
Se $t_{Exp} < t_{Crit}$ então \bar{R} não é significativamente diferente de 100 % e $U_{\bar{R}}$ é calculado com base na seguinte equação:

Incerteza de recuperação $U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}}$

t_{Crit} : valor crítico bi-caudal para p-1 graus de liberdade e 95 % de confiança.

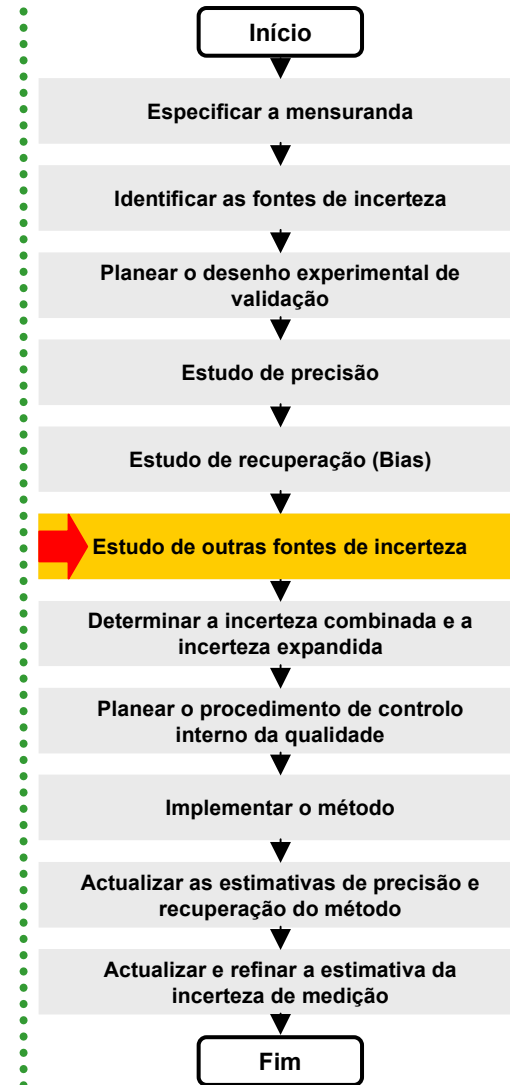
S_{obs} é o desvio padrão de p valores de R_i obtidos em condições de precisão intermédia. R_i é a recuperação média de três replicados obtidos em condições de repetibilidade.

C_{obs} : Concentração observada; C_{spike} : Concentração esperada.



3 - OUTRAS FONTES DE INCERTEZA

- ▶ Incerteza associada aos padrões de calibração ($U_{C.Cal}$)
- ▶ Incerteza associada à diluição da amostra (U_{Dil})
- ▶ Incerteza associada a factores de correcção do resultado final (ex: correcção em relação à densidade da amostra)
- ▶ Incerteza associada ao pré-tratamento da amostra
- ▶ Etc.



INCERTEZA COMBINADA

Incerteza combinada

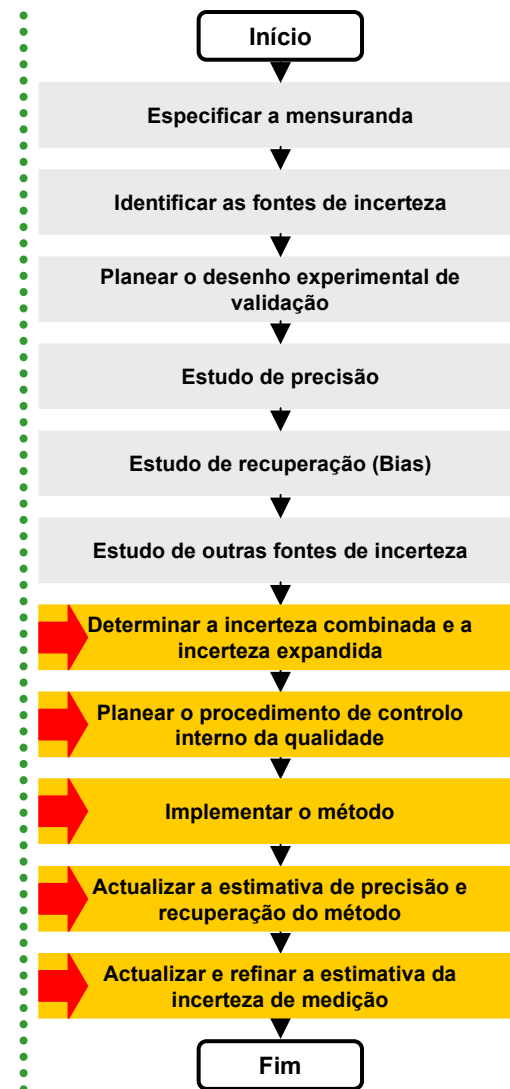
$$U_{Comb} = \sqrt{(U_P)^2 + (U_{\bar{R}})^2 + (U_{C.Cal})^2 + (U_{Outras})^2}$$

As incertezas padrão relativas são combinadas directamente. As incertezas expressas em valor absoluto são divididas pela concentração da amostra.

INCERTEZA EXPANDIDA

Incerteza expandida

$$U_{Exp} = k \times U_{Comb}$$



EXEMPLOS

Método	U_P (%)	$U_{\bar{R}}$ (%)	$U_{C.Cal}$ (%)	U_{Outros} (%)	U_{Comb} (%)	U_{Exp} (%) $k=2$	Observações
Cafeína (HPLC-UV-DAD)	4,0 %	1,7 %	1,9 %	-----	4,7 %	9,4 %	Aplicável para concentrações superiores a 12 µg/mL
Cannabis (GC/MS-MS)	10,8 %	1,7 %	2,1 %	6,7 %	13,0 %	26%	Aplicável para concentrações entre 15 a 50 ng/mL

Incerteza de pré-tratamento e conservação da amostra

$$U_{Comb} = \sqrt{(U_P)^2 + (U_{\bar{R}})^2 + (U_{C.Cal})^2 + (U_{Outras})^2}$$

$$U_{Exp} = k \times U_{Comb}$$

TESTE DO MODELO - Cafeína

QUATRO ENSAIOS INTERLABORATORIAIS

Nº de laboratórios	Entre 22 a 28 laboratórios de análises de dopagem a nível mundial
Gama de trabalho	12 a 25 $\mu\text{g/mL}$
Reprodutibilidade	4,0 a 4,7 % (Coeficiente de variação de todos os participantes)
Z-Score	- 0,05; 0,4; 0,6 e - 0,8

O intervalo de incertezas inclui tanto o valor teórico como o valor médio de todos os participantes.

TESTE DO MODELO - Cannabis

- ▶ **Cartas de controlo (CV %) Entre 7 a 9 % para 15 e 50 ng/mL**

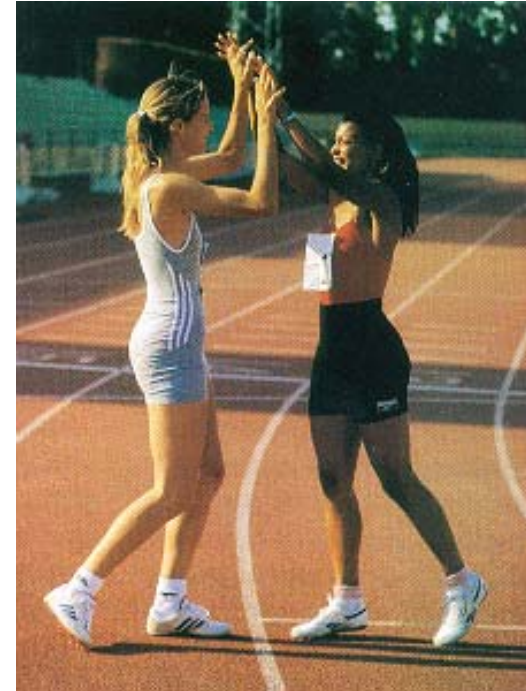


X 3 ≈ 20 a 30 %

- ▶ **Previsão inicial obtida por julgamento profissional ≈ 20 %**
- ▶ **O uso de ensaios interlaboratoriais para validar o modelo de estimativa da incerteza não é adequado devido à grande variedade de métodos entre os participantes nos ensaios interlaboratoriais de determinação de cannabis**

CONCLUSÕES

- 1. O modelo cumpre os requisitos aplicáveis**
- 2. Minimiza o esforço e recursos necessários à estimativa de incertezas**
- 3. Aplicação geral aos métodos quantitativos típicos de laboratórios de análises de dopagem**
- 4. Permite facilmente a actualização contínua do cálculo da incerteza através da actualização regular (eg. semestral) das estimativas das fontes principais de incerteza.**
- 5. A principal desvantagem do modelo reside no facto de ser efectuada uma avaliação da contribuição combinada de diversos factores sem discriminar quais dos factores são de facto significativos para o balanço final da incerteza.**



BIBLIOGRAFIA

1. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO (1993)
2. EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying uncertainty in analytical measurement, EURACHEM/CITAC (2000)
3. VAM project 3.2.1 - Development and harmonisation of measurement uncertainty principles LGC/VAM (2000)
4. ISO 5725-3 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method ISO (1994).
5. A.Maroto; R. Boqué; J. Riu; F. Rius Analytica Chimica Acta (2001) 133-145.

Laboratório de Análises e Dopagem

Av. Prof. Egas Moniz (Estádio Universitário) 1600-190 Lisboa

Tel: 217 954 000 Fax: 217 977 529 Ladb.cmd.ind@mail.telepac.pt