



1 Para ensaios moleculares o ensaio de proficiência pode ser feito para o resultado global, ou seria mais adequado realizar a validação por etapas (extração, PCR) devido às variáveis de cada etapa?

O ensaio de proficiência (EP) ideal avalia todas as etapas do processo (global) e é composto pelo mesmo tipo de material biológico testado no dia a dia. No entanto, isso nem sempre é possível. Algumas amostras são raras, outras instáveis ou escassas. Diante disso, alternativas são aceitáveis, bastas justificá-las e a justificativa ser coerente. É melhor ter um EP baseado em DNA extraído que contemple um grupo de laboratórios do que um controle externo alternativo entre dois laboratórios.

2 Poderia falar um pouco mais de CQI quantitativos nos ensaios moleculares?

Análise quantitativa absoluta é considerada o ápice dos ensaios moleculares, pois fornece informações cruciais sobre a concentração e a quantidade das moléculas de interesse, desempenhando um papel fundamental em várias aplicações clínicas. Seu controle interno da qualidade deve contemplar 3 concentrações (alta, média e baixa) representando toda faixa linear do ensaio. Normalmente, a unidade destes resultados é: cópias/mL, UI/mL, ng/mL, equivalentes genômicos/mL, e outras. Análise do ciclo quantitativo (Cq) bruto não é aplicável para quantificação absoluta, mas sim, sua interpolação contra uma curva padrão. Para cada concentração testada avalia-se se o valor observado na corrida analítica esta dentro do valor esperado definido durante a validação, no início do novo lote de controle, ou com resultado esperado. Pode-se usar o gráfico de levey-jennigs para se avaliar visualmente os diferentes níveis de controle ao longo do tempo.

3 Como podemos proceder a comparação de um método in-house com outros dois métodos já existentes? Devo enviar uma amostra para algum laboratório com um método diferente do meu? Existe algum problema envolvendo LGPD?

Existem diferentes estratégias de validação de métodos: a) aplicar método teste em amostras com resultado conhecido, b) comparar métodos teste com um método já validado, c) comparar dois métodos testes independentes, d) comparar método teste com diagnóstico clínico do paciente, e outras. Na estratégia "c" compara-se o método teste com um outro método teste independente. Esta situação é mais aplicável para testes inexistentes ou novas tecnologias, como o NGS, por exemplo. Enviar amostras para outro laboratório é uma opção, seria a situação "b", método teste contra método já validado. Em relação ao envio de amostras de pacientes para outro laboratório, sim, é necessário obedecer a LGPD. Neste sentido, é importante obter a autorização do paciente para uso do remanescente da sua amostra **anonimizada** em validação no momento do cadastro do exame, antes de se conhecer o resultado da sua amostra.



4 Poderia indicar referência bibliográfica para validação em NGS?

Uma referência recente sobre validação e controle de qualidade em NGS é o CLSI MM09 "Human Genetic and Genomic Testing Using Traditional and High-Throughput Nucleic Acid Sequencing Methods, 3rd Edition" (<https://clsi.org/mm09>). 

5 O senhor mencionou concordância positiva e concordância negativa. Seria valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Ou são termos totalmente diferentes?

São apenas termos diferentes e equivalem a sensibilidade e especificidade em uma tabela 2x2. Realmente, sensibilidade/especificidade são amplamente conhecidos e usados, os termos concordância positiva/negativa não são. Tradicionalmente, em uma tabela 2x2, onde se compara um método teste com a presença ou ausência de doença ou com método padrão ouro obtém-se sensibilidade ($a/a+c$), especificidade ($d/b+d$), valor preditivo positivo ($a/a+b$) e valor preditivo negativo ($d/c+d$). No entanto, quando são comparados dois "métodos testes", em que se desconhece a presença ou ausência da doença ou não exista um teste padrão ouro para o analito em questão, a denominação correta para ($a/a+c$) é concordância positiva e ($d/b+d$) é concordância negativa. Neste caso, se tem também a concordância total entre os métodos ($a+d/a+b+c+d$). O CLSI EP12 "Evaluation of Qualitative, Binary Output Examination Performance, 3rd Edition" descreve a avaliação de desempenho de métodos qualitativos e estes termos (<https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep12/>). 

6 Em relação a validação de PCR em tempo real (qPCR) in house, após definir o LOD 95% foi comentado que é necessário determinar a precisão da concentração na qual o teste passa de positivo para negativo e assim definir a zona cinza (na qual uma amostra nessa(s) concentração (es) apresenta resultados imprecisos, hora positivo hora negativo), ou seja o "perfil de amostras inconclusivas". Me perdi na informação:

Isso mesmo. Para um ensaio qualitativo de qPCR a análise da precisão somente é aplicável próxima ao LOD, pois trata-se do ponto de decisão clínica. Ou seja, detectado ou não detectado para o analito. Toda a faixa em que o ensaio retorna resultado positivo acima disso passa a ser irrelevante, pois sempre se tem resultados "detectado". Então, na validação, é necessário conhecer a precisão do ensaio próximo ao LOD 95% por dois motivos: 1) evitar uso de ensaio pouco precisos em que o LOD varia muito entre corridas analíticas e; 2) fundamentar a decisão se uma amostra é detectada, indeterminada ou não detectada no dia-a-dia.



7 Para determinar a zona cinza (em concentrações e valores de Cq), deve-se pegar esse último ponto do LOD 95% e fazer diluições seriadas a 1:2 e 1:10 é isso? Na diluição 1:2 seria para definir a zona cinza? Na diluição 1:10 o que definiria?

A diluição 1:10 (com 5-6 pontos) define o intervalo analítico do ensaio e ajuda a escolher o ponto inicial da diluição 1:2 para definição do LOD. Deve-se escolher um ponto reprodutível qualitativamente da diluição 1:10 (ex. detectado em triplicata, mesmo que o Cq varie um pouco) e usá-lo como ponto de partida para diluição 1:2 para definição do LOD (normalmente 5-6 pontos também). Para definir o LOD, basta executar a diluição 1:2 uma vez e aplicar a regressão probit. Para definir a precisão no LOD (na zona cinza), basta repetir a curva 1:2 do LOD de 3 a 5 vezes ou testar uma segunda diluição 1:10 com apenas 3 pontos a partir do mesmo ponto escolhido para se iniciar a diluição 1:2 (essa regra não é fixa, pode variar de acordo com os resultados obtidos). Particularmente, prefiro repetir a curva de LOD 3-5 vezes.

8 Para ensaios de quantificação de carga microbiana pode-se empregar no cálculo a quantidade estimada de DNA presente em X quantidade de células que vem na informação do kit de extração? Ex. Kit marca X informa que em 200uL empregados de amostra de sangue = [DNA]/3.000 células.

Existem algumas estratégias de normalização do resultado da qPCR para facilitar comparações entre amostras: tamanho/volume da amostra, quantidade de DNA genômico, Cq de um gene de referência, e cq de um DNA exógeno (Leitura recomendada PMID: 15815687). O DNA genômico da amostra pode sim ser usado como normalizador. No entanto, como existe variação biológica na quantidade de leucócitos, assumir que todo 200 ul de sangue tem 3000 células pode gerar comparações errôneas. Uma estimativa da quantidade de DNA na amostra pode ser obtida da análise do controle de reação/endógeno/interno da qPCR. O uso de equivalente genômicos também pode ser aplicável para esta situação – cada célula tem 6,6 pg de DNA (PMID: 17163815).



9

Há alguma referência quanto aos tipos de cálculo a ser empregado em ensaios quantitativos para amostra na qual espera-se menor quantidade de DNA do patógeno e maior quantidade do DNA genômico?

Eu precisaria de mais informações para responder com mais propriedade essa pergunta: tipo de amostra, tipo quantificação (relativa x absoluta), patógeno pesquisado, uso de controle de reação endógeno/exógeno. Assim, poderia compreender melhor a questão biológica relativa à pergunta. A busca de publicações específicas a respeito da qPCR em questão podem ajudar a encontrar os cálculos. No entanto, na maioria dos casos, os tipos cálculos são os mesmos independente da relação entre quantidade de DNA humano e do patógeno, pois a qPCR tende a amplificar pequenas quantidade do DNA do patógeno misturados em uma grande quantidade de DNA humano. Essa relação DNA patógeno/humano com prevalência do DNA humano tende a aumentar o limite de detecção do ensaio, deixando a PCR menos sensível, mas uso de estratégias específicas pode resolver a questão. Fique à vontade para me passar mais detalhes.



Assista ao Encontro Online