



Avaliação Externa  
de Qualidade

**Relatório Global**  
**Décima Primeira Avaliação**  
**Externa da Qualidade dos Testes**  
**de Genotipagem**  
**11AEQ13/Geno**





Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

**Relatório Global**  
**Décima Primeira Avaliação Externa da Qualidade**  
**dos Testes de Genotipagem**  
**11AEQ13/Geno**

2013  
Brasília – DF

## 1. INTRODUÇÃO

A Rede Nacional de laboratório de genotipagem está constituída atualmente por 22 laboratórios executores e treinados para realizar a genotipagem do HIV-1 e um laboratório de resgate. Por serem parte de uma Rede Nacional que gera dados para critérios clínicos de tratamento, esses laboratórios devem estar aptos a apresentar resultados homogêneos quanto ao padrão de resistência de amostras pertencentes a painéis de controle de qualidade.

Como continuidade ao sistema de Avaliação Externa da Qualidade dos Testes de Genotipagem, com a finalidade de avaliar o desempenho dos laboratórios que compõem a Rede Nacional de laboratórios na realização dos testes de Genotipagem do HIV-1, foi elaborada a décima primeira avaliação, a partir de agora chamada de 11AEQ13.

## 2. OBJETIVOS

Para este módulo, um painel-teste de amostras clínicas foi confeccionado e enviado, em 22 de abril de 2013, para 22 laboratórios que compõem a Rede.

Este painel teve como objetivo principal avaliar o desempenho dos laboratórios quanto à qualidade dos procedimentos e dos resultados obtidos. São objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade do laboratório em amplificar por PCR o gene pol de duas amostras, com carga viral de aproximadamente entre 1.000 e 5.000 cópias / mL;
- Avaliar a capacidade dos laboratórios em gerar sequências sem contaminação de amostras;
- Avaliar a capacidade do técnico executor na montagem e edição das sequências no projeto.

## 3. METODOLOGIA

A metodologia da genotipagem do HIV-1 consiste, resumidamente, na obtenção satisfatória de sequências de nucleotídeos do HIV-1 isolados de amostras clínicas de indivíduos falhando ao tratamento antirretroviral. Essas sequências devem compreender parte do gene pol do HIV-1, que codifica as enzimas protease e transcriptase reversa, que são os alvos terapêuticos dos antirretrovirais.

O método inicia-se com o isolamento do RNA viral de amostra do plasma do paciente, que é transformado em cDNA por reação de transcrição reversa, seguido de amplificação do gene pol do HIV-1 pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction"). A partir do produto da amplificação, as sequências são geradas por sequenciamento genômico automático.

Após obtenção dessas sequências de DNA, o laboratório deve ser capaz de formar um "case" (ou projeto) que compara esse gene e suas proteínas resultantes com um protótipo viral padrão de laboratório sem mutações relacionadas à resistência aos antirretrovirais. A existência de polimorfismos genéticos é então indicada, notadamente os que se relacionam com resistência aos antirretrovirais. Esse resultado é fornecido em laudo específico para encaminhamento aos MRG (médicos referência em genotipagem) e em seguida aos médicos solicitantes.

## 4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras do painel da 11AEQ13 foram obtidas a partir de amostras clínicas de pacientes HIV-1 soropositivos. O painel foi preparado no Laboratório de Retrovirologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP. As características das amostras estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das amostras do painel 11AEQ13

Amostra	Carga Viral (cópias/mL)
11AEQ13-1	4.000
11AEQ13-2	1.500
11AEQ13-3	2.500
11AEQ13-4	3.000

## 5. CRITÉRIOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DOS DADOS

Os critérios escolhidos para análise dos dados da 11AEQ13 estão descritos e pontuados na Tabela 2.

**Tabela2** – Pontuação das análises

Item	Pontos				Máximo de Pontos
	amostra 11AEQ13-1	amostra 11AEQ13-2	amostra 11AEQ13-3	amostra 11AEQ13-4	
Análises Qualitativas					
Sequenciamento Amostras					
	2,5	2,5	2,5	2,5	10
Análise de divergência genética					
Até 2%	20	20	20	20	80
Laudo Trugene e Algoritmo Brasileiro					
	2,5	2,5	2,5	2,5	10
Análises Quantitativas					
Número de seqüências obtidas por case:					
6 a 8 seqüências	5	5	5	5	
5 seqüências	2,5	2,5	2,5	2,5	
> 5 seqüências	0	0	0	0	20
Posições críticas analisadas (códon)					
códons da Protease					
Posição 1	2	2	2	2	
Posição 2	2	2	2	2	
Posição 3	2	2	2	2	
Posição 4	2	2	2	2	
Posição 5	2	2	2	2	40
códons da Transcriptase Reversa					
Posição 1	2	2	2	2	
Posição 2	2	2	2	2	
Posição 3	2	2	2	2	
Posição 4	2	2	2	2	
Posição 5	2	2	2	2	40
Total					200

## 5.1. Critérios qualitativos

Os resultados enviados pelos laboratórios participantes foram avaliados quanto à sensibilidade e à especificidade.

- A sensibilidade foi avaliada pela capacidade dos laboratórios em amplificar as quatro amostras-teste por PCR, com valor de carga viral dentro da faixa de sensibilidade do kit utilizado pela rede (TRUGENE® HIV-1 GENOTYPING ASSAY, SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS).
- A especificidade foi avaliada pela capacidade dos laboratórios gerarem sequências semelhantes entre si, para cada amostra viral. Neste caso, se aceita certo grau de diversidade entre as sequências da mesma amostra obtidas pelos vários laboratórios decorrentes da diversidade genética da quase-espécie própria do HIV e da taxa natural de erro da transcriptase reversa ( $\sim 1/500$  incorporações errôneas).

A maneira objetiva de medir esse parâmetro foi a mensuração da distância genética das sequências geradas entre todos os laboratórios, para cada amostra do painel. Utilizamos os “softwares” BioEdit para o alinhamento e matriz de distância entre elas. Se a sequência de qualquer das duas amostras do laboratório tiver uma distância maior que 2% será considerada a possibilidade do produto amplificado ter sofrido contaminação por produto de PCR ou edições incorretas da sequência.

O amplicon (DNA amplificado) sequenciado nesse método possui aproximadamente 1300 pares de bases. Se considerarmos o critério anterior de 2% de diversidade, isso significa que um dado laboratório poderá classificar-se ainda que possua 26 nucleotídeos anotados que sejam diferentes ao consenso gerado. A matriz de distância pareada resultante, feita com as mesmas sequências, encontra-se nas Tabelas 3A, 3B, 3C e 3D.

apresentados sob a forma de Log cópias/mL.

Tabela 3A. Matriz de distâncias entre a sequência consenso e as geradas pelos Laboratórios da Rede de Genotipagem da amostra 11AEQ13-1

Cons	101-1	102-1	105-1	106-1	107-1	108-1	111-1	112-1	113-1	115-1	116-1	136-1	138-1	139-1	161-1	162-1	163-1	164-1	165-1
Cons	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
101-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
102-1	0,11%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,66%	0,55%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,99%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%
105-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,96%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
106-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,59%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
107-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
108-1	0,66%	0,66%	0,66%	0,66%	0,66%	0,00%	1,10%	0,66%	0,66%	0,55%	0,66%	0,66%	0,66%	10,82%	0,66%	0,55%	0,66%	0,66%	0,66%
111-1	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	1,10%	0,00%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	10,09%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%
112-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,84%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
113-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,72%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
115-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,85%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
116-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,61%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
136-1	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,61%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
138-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
139-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,84%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
161-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	10,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
162-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,85%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
163-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
164-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,73%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
165-1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,66%	0,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

**Tabela 3B. Matriz de distâncias entre a sequência consenso e as geradas pelos Laboratórios da Rede de Genotipagem da amostra 11AEQ13-2**

	Cons	101-2	102-2	105-2	106-2	107-2	108-2	111-2	113-2	115-2	116-2	136-2	137-2	138-2	139-2	161-2	162-2	163-2	164-2	165-2
<b>Cons</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>101-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	10,83%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>102-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>105-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,22%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,11%	0,22%	0,00%	11,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>106-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	10,94%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>107-2</b>	0,11%	0,11%	0,11%	0,22%	0,11%	0,00%	0,22%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,22%	0,11%	10,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>108-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,22%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,11%	0,22%	0,00%	11,06%	0,11%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%
<b>111-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>113-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>115-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>116-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	10,85%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>136-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>137-2</b>	0,11%	0,11%	0,22%	0,22%	0,11%	0,22%	0,22%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,00%	0,11%	11,19%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%
<b>138-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>139-2</b>	0,83%	11,07%	11,09%	10,94%	10,97%	10,95%	11,06%	11,10%	11,09%	11,08%	10,85%	11,20%	11,19%	11,07%	0,00%	11,20%	11,20%	11,18%	10,83%	11,07%
<b>161-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>162-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>163-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,18%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>164-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	10,83%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>165-2</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	11,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%



Tabela 3C. Matriz de distâncias entre a sequência consenso e as geradas pelos Laboratórios da Rede de Genotipagem da amostra 11AEQ13-3

Cons	101-3	102-3	105-3	106-3	107-3	108-3	111-3	112-3	113-3	115-3	116-3	136-3	137-3	138-3	139-3	161-3	162-3	163-3	164-3	165-3
Cons	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,37%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
101-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,62%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
102-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,87%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
105-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,49%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
106-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,66%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
107-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	11,08%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
108-3	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	10,88%	0,00%	0,00%	0,22%	0,11%	0,00%
111-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,64%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
112-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,77%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
113-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,87%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
115-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,37%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
116-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,37%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
116-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,86%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
136-3	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%	10,65%	0,11%	0,11%	0,22%	0,11%	0,11%
137-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,74%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
138-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,75%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
139-3	10,37%	10,62%	10,87%	10,66%	11,08%	10,88%	10,64%	10,77%	10,87%	10,37%	10,86%	10,65%	10,74%	10,75%	0,00%	10,95%	10,74%	11,18%	10,50%	10,53%
161-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,95%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
162-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,74%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
163-3	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,22%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,22%	0,11%	0,11%	11,18%	0,11%	0,11%	0,00%	0,11%	0,11%
164-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,50%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%
165-3	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	10,53%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%

**Tabela 3D. Matriz de distâncias entre a sequência consenso e as geradas pelos Laboratórios da Rede de Genotipagem da amostra 11AEQ13-4**

	Cons	101-4	102-4	105-4	106-4	108-4	111-4	112-4	113-4	115-4	116-4	136-4	137-4	138-4	139-4	161-4	162-4	163-4	164-4	165-4	
Cons	101-4	0,00%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	12,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,22%	
	102-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	13,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	105-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,38%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	106-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	108-4	0,11%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,63%	0,00%	0,00%	0,11%	0,11%	0,11%	
	111-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1112-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,52%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1113-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,52%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1115-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,39%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1116-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,40%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1136-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1137-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,40%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1138-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
	1139-4	12,11%	13,00%	12,38%	12,50%	12,50%	12,63%	12,42%	12,52%	12,52%	12,39%	12,40%	12,33%	12,40%	12,49%	0,00%	12,54%	12,38%	13,01%	12,78%	12,57%
	161-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,54%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%
	162-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,38%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%
163-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	13,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
164-4	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	12,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
165-4	0,22%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	0,11%	12,57%	0,11%	0,11%	0,00%	0,11%	0,00%	

## 5.2. Critérios quantitativos

### **A - Número de sequências com alta qualidade por projeto montado, para cada amostra.**

O projeto de um isolado viral é montado a partir de seis até oito diferentes sequências geradas pelo kit comercial utilizado. Essas sequências cobrem toda a região importante do gene pol para a avaliação de resistência (1300 nucleotídeos, sendo toda a protease viral e parte da transcriptase reversa). Essas oito sequências não só cobrem toda a região como geram sobreposições redundantes (interseções) entre si a partir de sequenciamento de direções diferentes (algumas no sentido 5' e outras no sentido 3'), e são importantes para ratificar o resultado final e validar polimorfismos genéticos encontrados. É importante que a sequência gerada em um sentido seja corroborada pela gerada em sentido oposto numa mesma região gênica. Quanto menor o número de sequências geradas por amplicon, para cada projeto, mais difícil será a edição e a montagem do case e maior a probabilidade de erros nas edições da sequência gerada.

### **B – Códonos críticos relacionados à resistência aos antirretrovirais, nos genes da protease e transcriptase reversa virais.**

Nesse caso é avaliada a capacidade de cada laboratório participante em acertar os aminoácidos codificados na protease e transcriptase reversa em cinco posições-chave para resistência de cada uma das regiões. Foram utilizados os dados dos sequenciamentos das amostras realizados no Laboratório de Referência da RENAGENO de São Paulo e a sequência consenso das sequências geradas, como base para se escolher aleatoriamente as dez posições-chave a serem analisadas.

## 6. Resultados da avaliação

Os resultados obtidos, discriminados por parâmetro utilizado, estão demonstrados nas Tabelas 4A, 4B, 4C e 4D.



Tabela 4A. Resultados e pontuação discriminada de cada laboratório avaliado, para a amostra 11AEQ13-1.

Número do laboratório	Análise Qualitativa				Análise Quantitativa						TOTAL	
	Sequenciamento		Diversidade genética		Laudo Trugene e Algoritmo Brasileiro		Nº de sequências obtidas		Posições críticas na Protease		Posições críticas na Transcriptase Reversa	
	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação
101	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
102	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
105	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
106	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
107	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
108	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
111	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10
112	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,25	8	5	5	10	5	10
113	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
115	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
116	SIM	2,5	até 2%	20	NÃO	0	8	5	5	10	5	10
136	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10
137	NÃO	0	até 2%	0	NÃO	0	0	0	0	0	0	0
138	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
139	SIM	2,5	até 2%	0	SIM	0	8	0	0	0	0	0
161	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
162	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
163	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2	8	5	5	10	5	10
164	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10
165	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10

Tabela 4B. Resultados e pontuação discriminada de cada laboratório avaliado, para a amostra 11AEQ13-2.

Número do laboratório	Análise Qualitativa						Análise Quantitativa						TOTAL
	Sequenciamento		Diversidade genética		Laudo Trugene e Algoritmo Brasileiro		Nº de sequências obtidas		Posições críticas na Protease		Posições críticas na Transcriptase Reversa		
	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação	
101	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
102	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
105	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2	8	5	5	10	5	10	49,5
106	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
107	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50
108	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
111	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
112	NÃO	0	até 2%	0	NÃO	0	0	0	0	0	0	0	0
113	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
115	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	7	5	5	10	5	10	50
116	SIM	2,5	até 2%	20	NÃO	0	8	5	5	10	5	10	47,5
136	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	4	0	5	10	5	10	45
137	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
138	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
139	SIM	2,5	até 2%	0	SIM	0	8	0	0	0	0	0	2,5
161	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
162	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
163	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2	8	5	5	10	5	10	49,5
164	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
165	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50

Tabela 4C. Resultados e pontuação discriminada de cada laboratório avaliado, para a amostra 11AEQ13-3.

Número do laboratório	Análise Qualitativa						Análise Quantitativa						TOTAL
	Sequenciamento		Diversidade genética		Laudo Trugene e Algoritmo Brasileiro		Nº de sequências obtidas		Posições críticas na Protease		Posições críticas na Transcriptase Reversa		
	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação	
101	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	4	8	48
102	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
105	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
106	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
107	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
108	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
111	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
112	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,25	8	5	5	10	5	10	49,75
113	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
115	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
116	SIM	2,5	até 2%	20	NÃO	0	8	5	5	10	5	10	47,5
136	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50
137	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
138	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
139	SIM	2,5	até 2%	0	SIM	0	8	0	0	0	0	0	2,5
161	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
162	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
163	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2	5	5	5	10	5	10	49,5
164	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50
165	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50

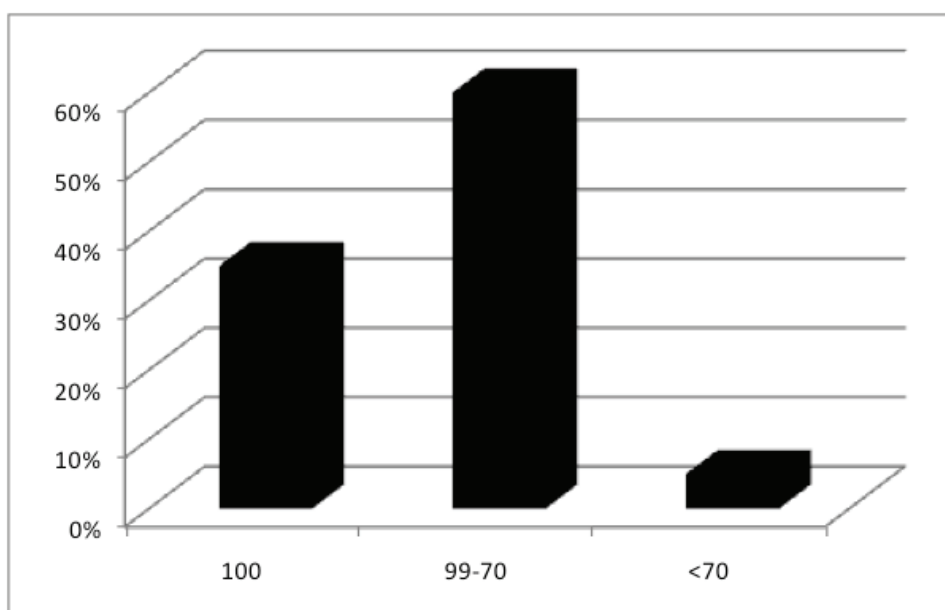


Tabela 4D. Resultados e pontuação discriminada de cada laboratório avaliado, para a amostra 11AEQ13-4.

Número do laboratório	Análise Qualitativa				Análise Quantitativa								TOTAL		
	Sequenciamento		Diversidade genética		Laudo Trugene e Algoritmo Brasileiro		Nº de sequências obtidas		Posições críticas na Protease		Posições críticas na Transcriptase Reversa				
											Resultados corretos			Pontuação	
	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultado	Pontuação	Resultados corretos	Pontuação			
101	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	4	8	5	10	48		
102	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		
105	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2	6	5	4	8	5	10	47,5		
106	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		
107	SIM	2,5	até 2%	0	NÃO	0	4	0	0	0	0	0	2,5		
108	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	5	2,5	4	8	4	8	43,5		
111	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		
112	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,25	8	5	5	10	5	10	49,75		
113	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		
115	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50		
116	SIM	2,5	até 2%	20	NÃO	0	6	5	4	8	5	10	45,5		
136	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	5	10	50		
137	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	4	0	5	10	5	10	45		
138	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	8	5	5	10	4	8	48		
139	SIM	2,5	até 2%	0	SIM	0	8	0	0	0	0	0	2,5		
161	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	4	8	5	10	48		
162	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		
163	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	4	8	3	6	44		
164	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	4	8	48		
165	SIM	2,5	até 2%	20	SIM	2,5	6	5	5	10	5	10	50		

Tabela 5. Pontuação total de cada laboratório.

Laboratório	11AEQ13-1	11AEQ13-2	11AEQ13-3	11AEQ13-4	Pontuação	
101	50	50	48	48	196	98%
102	50	50	50	50	200	100%
105	50	49,5	50	47,5	197	99%
106	50	50	50	50	200	100%
107	50	50	50	2,5	152,5	76%
108	50	50	50	43,5	193,5	97%
111	50	50	50	50	200	100%
112	49,75	0	49,75	49,75	149,25	75%
113	50	50	50	50	200	100%
115	50	50	50	50	200	100%
116	47,5	47,5	47,5	45,5	188	94%
136	50	45	50	50	195	98%
137	0	50	50	45	145	73%
138	50	50	50	48	198	99%
139	2,5	2,5	2,5	2,5	10	5%
161	50	50	50	48	198	99%
162	50	50	50	50	200	100%
163	49,5	49,5	49,5	44	192,5	96%
164	50	50	50	48	198	99%
165	50	50	50	50	200	100%



## 7. CONCLUSÃO

A primeira avaliação externa da qualidade para os testes de genotipagem da RENAGENO foi realizada com um caráter ilustrativo e educativo. Teve como objetivo controlar a qualidade, levantar as condições de trabalho, de proficiência técnica e da adequação da metodologia de genotipagem utilizada na RENAGENO. A partir da segunda avaliação, mantiveram-se os mesmos princípios e objetivos, esperando-se, entretanto um desempenho adequado dos laboratórios participantes e servindo como indicador das intervenções técnicas corretivas que devem ser implementadas para manutenção da qualidade.

No conjunto dos resultados, observa-se que 7 (35%) dos laboratórios participantes foram aprovados com excelência, 12 (60%) foram aprovados com pontuação entre 99 e 70%. Um laboratório (5%) teve pontuação abaixo de 70%. Dois laboratórios não enviaram os resultados por estarem com problemas internos.

Lembramos que os resultados das Avaliações Externas da Qualidade são absolutamente confidenciais e que o número de seu laboratório é de conhecimento apenas do próprio laboratório e dos profissionais responsáveis pela análise dos resultados.

Recomendamos que o laboratório, que obteve pontuação abaixo de 70%, verifique com atenção a rotina de trabalho com o intuito de identificar possíveis problemas de processamento. O que pudemos notar neste caso foi que as amostras foram trocadas (veja a árvore filogenética no ANEXO1).

No ANEXO 2 listamos as ocorrências relatadas ou detectadas. Um dos laboratórios nos encaminhou um documento sobre algumas considerações. Este documento será encaminhado para ser avaliado pelo grupo de trabalho da Qualidade e da RENAGENO.

Consideramos também que um aspecto importante na manutenção da qualidade é a interação e o diálogo entre os laboratórios que compõem a rede e o comitê assessor do sistema de garantia da qualidade. Para tanto, sugerimos que dúvidas e sugestões sejam encaminhadas à Maria Cecilia ([cecilia.araripe@unifesp.com](mailto:cecilia.araripe@unifesp.com)) e/ou Ana Flávia ([ana.pires@aids.gov.br](mailto:ana.pires@aids.gov.br)) e/ou Maria Luiza ([mlbazzo@yahoo.com.br](mailto:mlbazzo@yahoo.com.br)).

Por último, é necessário enfatizar que esta avaliação tem a finalidade de verificar o desempenho individual de cada um dos laboratórios que compõem a Rede Nacional de Laboratório na realização dos testes de Genotipagem do HIV-1, para a correção dos problemas, se houver, e para a homogeneização de suas condutas objetivando padrão de excelência, pois somente laboratório com comprovada qualidade pode garantir resultados confiáveis aos usuários do Sistema Único de Saúde.



## TESTES DE GENOTIPAGEM PARA O HIV-1 DO DEPARTAMENTO DE DST/AIDS E HEPATITES VIRAIS.

### **Maria Cecília Araripe Sucupira**

Laboratório de Retrovirologia  
Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo  
UNIFESP - SP

### **Ricardo Sobhie Diaz**

Laboratório de Retrovirologia  
Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo  
UNIFESP – SP

### **Milena Brunialti**

Laboratório de Imunologia  
Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo  
UNIFESP – SP

### **Mônica Barcellos Arruda**

Laboratório de Virologia Molecular Animal  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
UFRJ - RJ

### **Maria Luiza Bazzo**

Universidade Federal de Santa Catarina  
UFSC - SC

### **Rosângela Maria M. Ribeiro**

Cuidado e Qualidade de Vida  
Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais

### **Anderson Alvarenga Pereira**

Cuidado e Qualidade de Vida  
Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais

### **Ana Flávia Nacif P. Coelho Pires**

Cuidado e Qualidade de Vida  
Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais

### **Marcelo Araújo de Freitas**

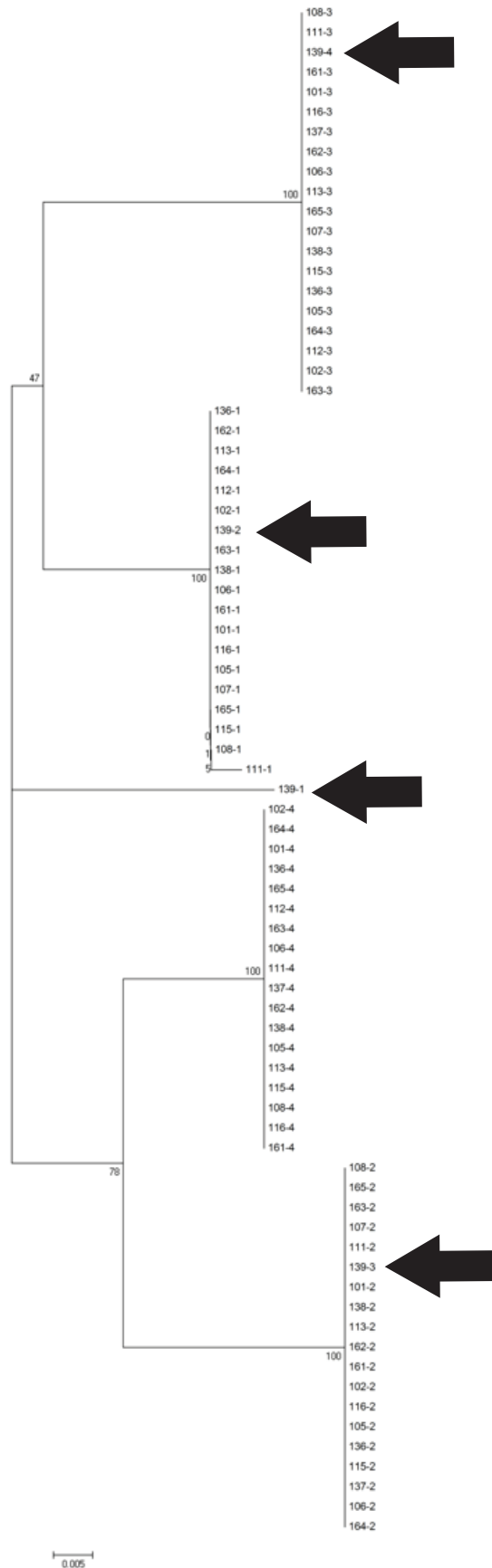
Cuidado e Qualidade de Vida  
Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais

### **Dirceu B. Greco**

Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais

**Anexo 1:**

Árvore filogenética da região pol do HIV-1 das amostras encaminhadas para a décima primeira avaliação externa da qualidade dos laboratórios da RENAGENO



## Anexo 2:

Ocorrências relatadas pelos laboratórios da RENAGENO participantes do 11AEQ13. Ocorrências detectadas nas análises dos dados encaminhados para avaliação.

- Na amostra 4 faltaram mais do que 5 bases na sequência consenso quando comparada com a sequência de referência do vírus do tipo selvagem, devido a presença de um hard stop no códon 9 e portanto o software não foi capaz de alinhar do códon 4 ao 8. Porém foi possível visualizar as bases que foram inseridas.
- Repetiram a amostra 4 desde a RT-PCR para confirmar resultado. Na impressão do laudo do Algoritmo Brasileiro não saiu o resultado do TDF+3TC (amostra 2), das amostras 1, 3 e 4 saiu cortado mas deu para ver a interpretação.
- Não participaram, pois o laboratório se encontra em avaliação pela SIEMENS (desde o ano passado) sobre contaminação ambiental. Já realizaram inúmeras limpezas e aguardam a compra de outro produto para este fim. A rotina foi transferida para outro laboratório.
- Repetiu a amostra 4 e o início da protease (antes do códon 10) precisou chamar as bases manualmente.
- Imprimiram os laudos em preto e branco por problemas na impressora padrão.
- Não participaram, pois estavam com o laboratório em reforma.
- Não encaminharam os laudos TruGene e Algoritmo Brasileiro (impresso e/ou eletrônico).
- Observaram que as sequências da RT não têm ficado com boa qualidade. Discutindo com a SIEMENS levantaram a suspeita de ser problema com a Toster, que ficou em avaliação.
- Não amplificaram a amostra 1, a amostra 4 ficou com o início da protease com a qualidade insatisfatória, repetiram o CLIP e permaneceu com o problema. Conseguiram editar, porém avisam que se fosse amostra da rotina solicitariam nova coleta.
- Receberam todas as amostras descongeladas. Na amostra 4 relatam que detectaram leve alteração na linha de base nas sequências 1-4b, 4-8b (até a posição da deleção RT67 e 5-8a (após a posição da deleção RT67), porém as alterações não impediram a edição do case.
- Tiveram problema com a Torre Open gene System, que ficaram parados por aproximadamente uma semana retornando as atividades no dia 24/04/13. Não encaminharam o subtipo pelo algoritmo brasileiro (só fez na amostra 4), enviaram por Stanford.
- Na amostra 4 os primers 1-4a e 1-4b não foram utilizados para formação do case. A amostra 3 por não ser possível subtipar pelo algoritmo brasileiro foi submetido ao de Stanford.
- Relatam que não houve nenhum problema durante a execução do 11AEQ13 e que a amostra 2 não sequenciou.
- Informam que não foi possível fazer a análise da amostra 4 devido a falta de 15 bases no início da P2.







DISQUE SAÚDE

**136**

Ouv doria Geral do SUS.  
[www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)



Secretaria de  
Vigilância em Saúde

Ministério da  
Saúde

