

UFRJ **LVM**



laboratório de
virologia molecular



DST-AIDS
HEPATITES VIRAIS

Ministério
da Saúde



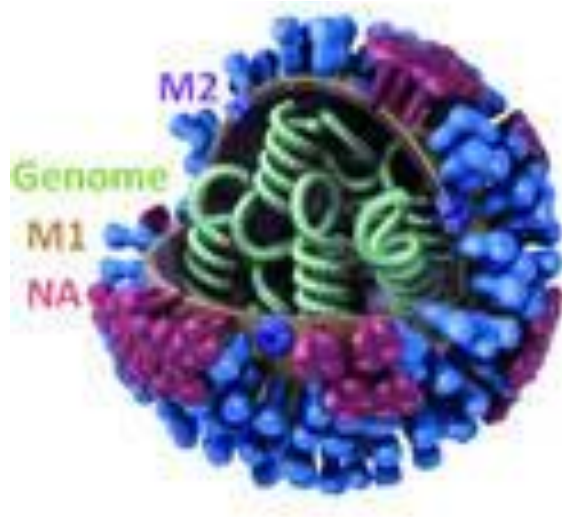
Avaliação externa de Qualidade de carga viral de HCV.

Diana Mariani
2016

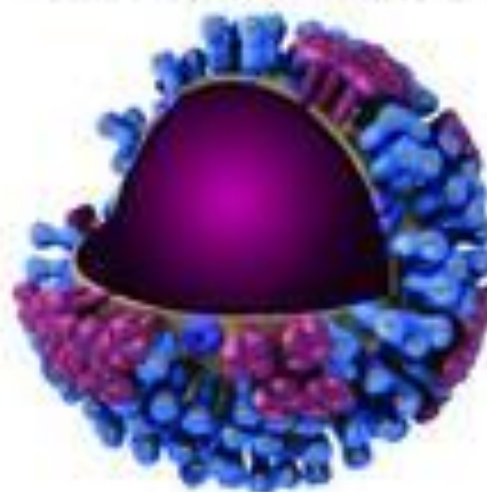
- ✓ A Rede Nacional de Laboratórios para Quantificação da Carga Viral do HCV possui atualmente 56 laboratórios distribuídos pelo País.
- ✓ A AEQ de carga viral do HCV tem como objetivo avaliar e certificar o desempenho dos laboratórios participantes da Rede voltado para a melhoria continuada.
- ✓ A partir dos resultados obtidos, será possível a implementação de ações corretivas, seja elas em relação ao equipamento ou treinamento da equipe responsável.
- ✓ Para maior estabilidade e biossegurança dos painéis, foi desenvolvida uma linhagem celular que produz VLPs (Virus-Like particles)

Definição de VLP

Vírus Influenza



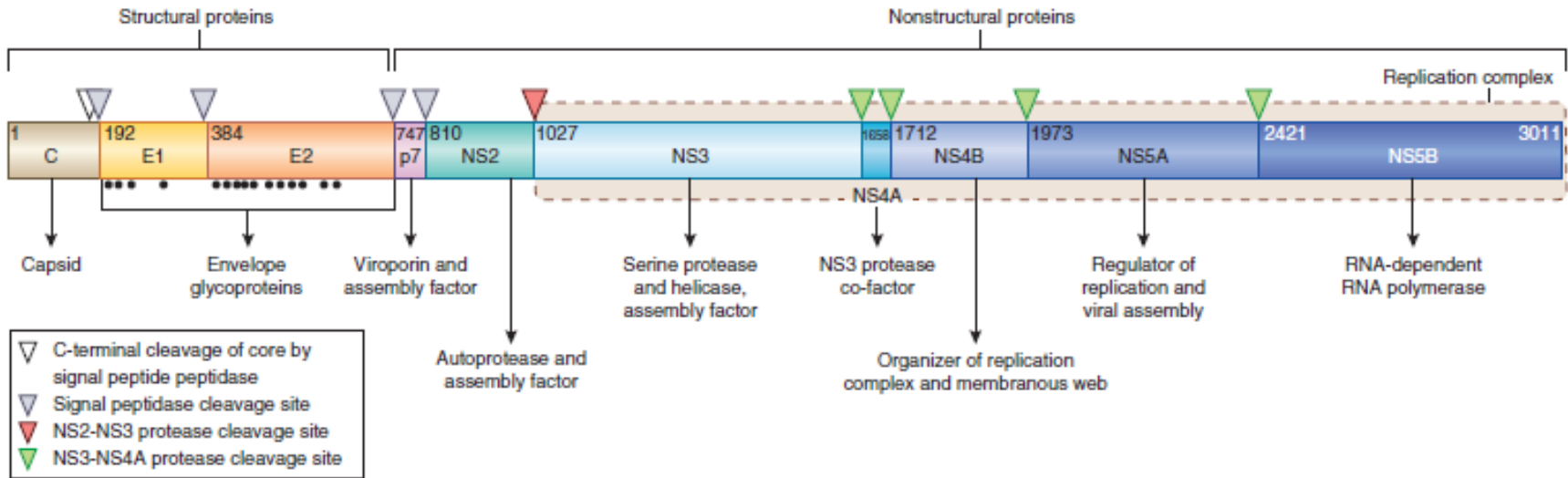
Partícula sintética de
Influenza semelhante
ao vírus (VLP)



(D. Jordan, 2012)

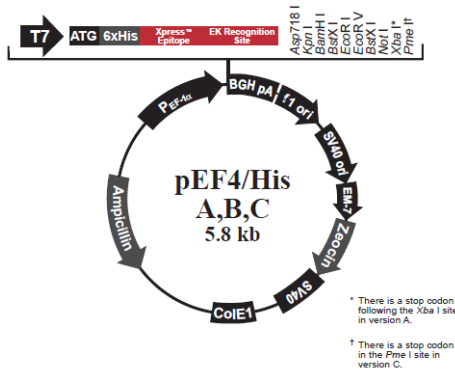
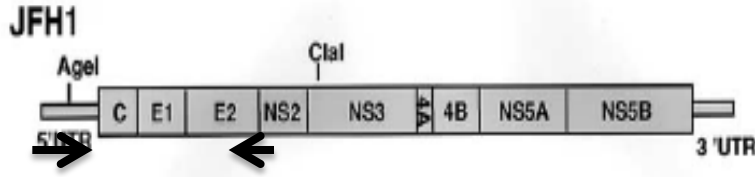
Organização genômica do HCV

- ✓ Genoma de RNA de 9,6kb, polaridade positiva



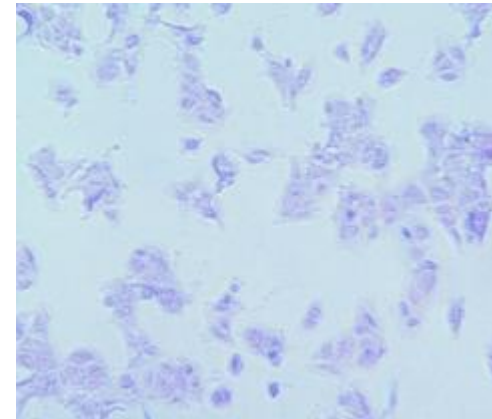
Scheel TKH & Rice CM, 2013

Seleção de células Huh-7 expressando as proteínas estruturais do HCV.



pEFJFHc-NS2

Transfecção FuGene



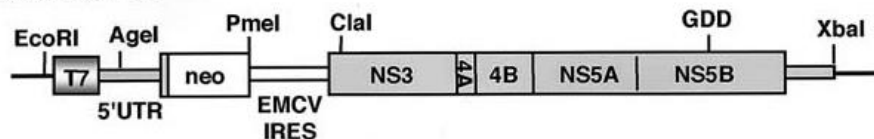
Células HuH-7 (hepatocarcinoma humano)

Seleção com
 antibiótico
 Zeocina
 0,2mg/mL

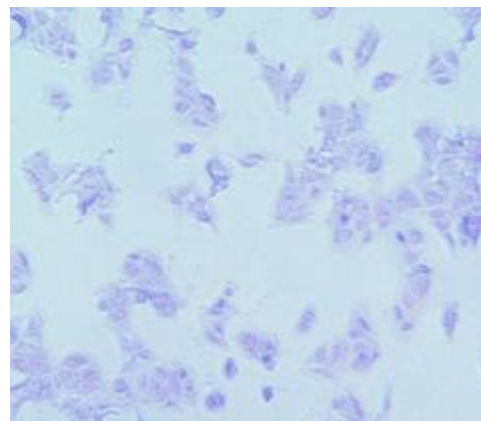


Seleção de células Huh-7 c-NS2 para empacotar o JFH1 em VLPs.

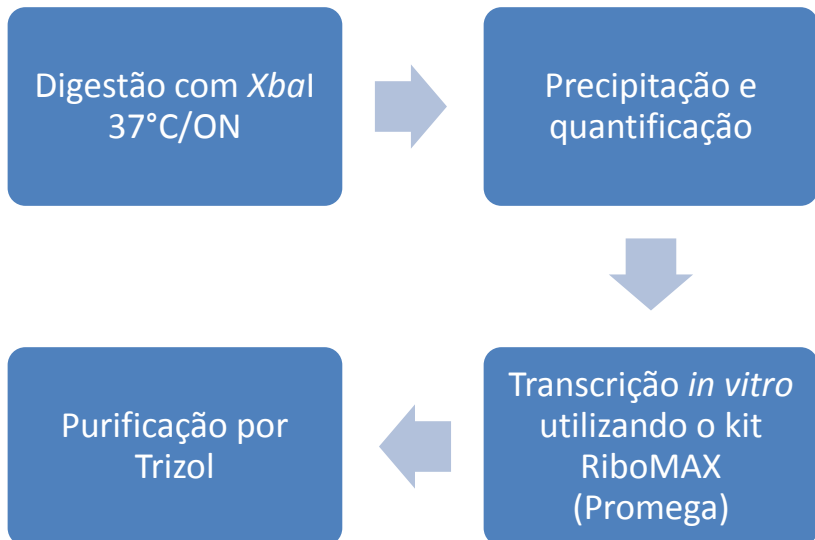
pSGR-JFH1



→
Eletroporação 10µg



Células HuH-7 c-NS2(hepatocarcinoma humano)



Seleção com
antibiótico
Zeocina
0,2mg/mL +
0,375 mg/ml
G418

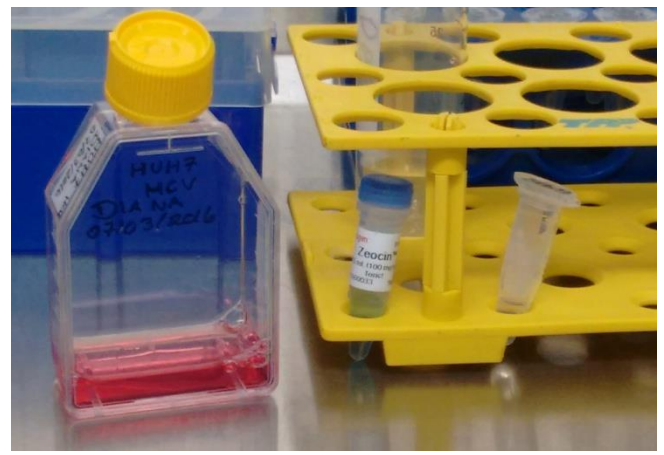
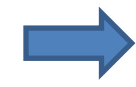
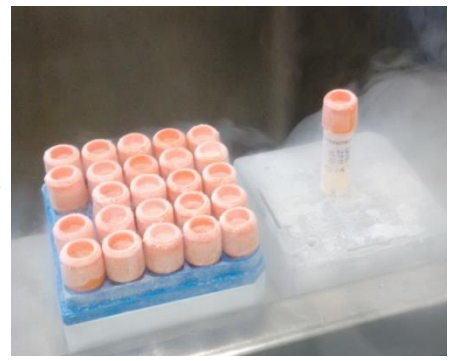


**DST-AIDS
HEPATITES VIRAIS**

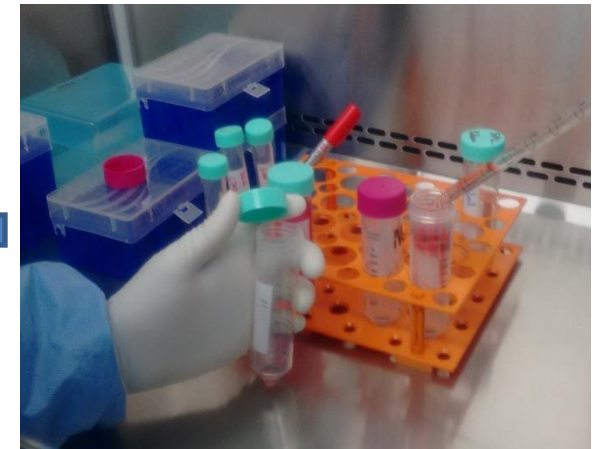
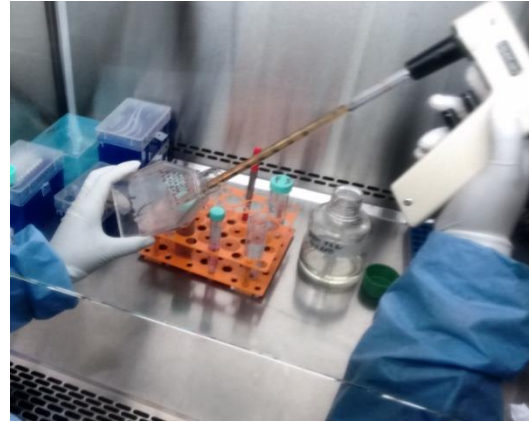
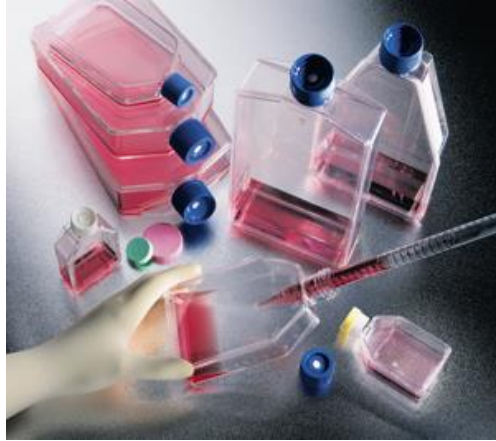
Ministério
da Saúde



Produção das partículas HCV like.



Produção das partículas HCV like.



Elaboração da AEQ.



As concentrações das amostras pertencentes a AEQ são determinadas a partir da quantificação prévia do estoque Viral obtido.

Elaboração da AEQ.

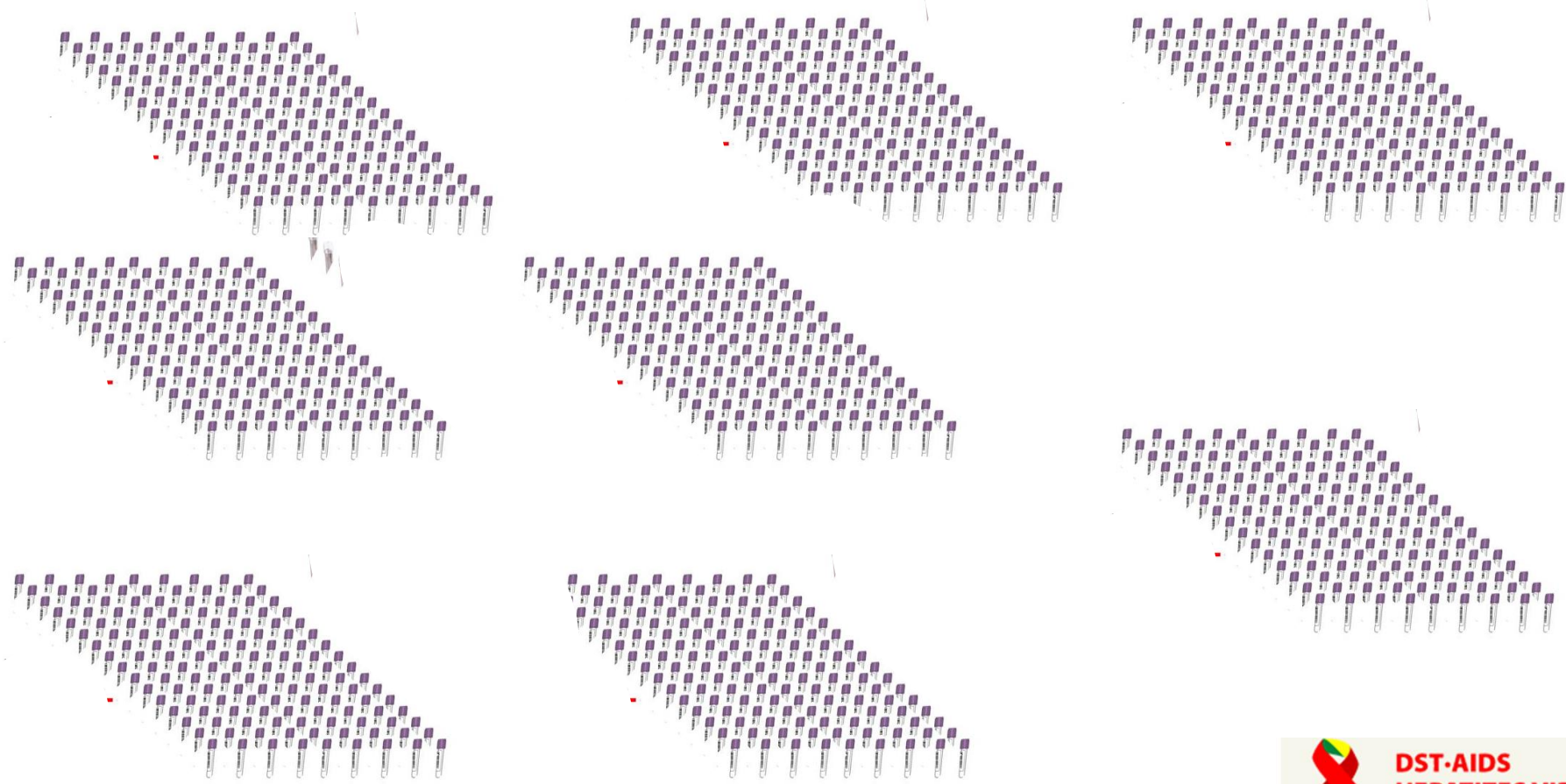
AEQ HCV 01 (vol 1.0ml)		
<i>Pool</i>	Código da Amostra	Resultado
1	1	Não Detectável
	2	5×10^4 (4,7 log)
	3	5×10^4
	4	10^4 (4 log)
	5	2×10^3 (3,3 log)
	6	Não Detectável
2	7	Não Detectável
	8	2×10^3
	9	10^4
	10	Não Detectável
	11	10^4
	12	2×10^3
	13	5×10^4

Diluyente: Plasma Negativo desfibrinado.





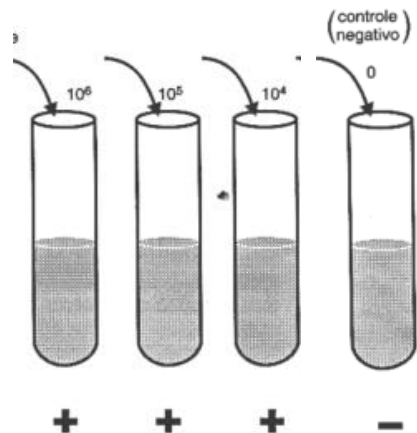
AEQ03_CV_HCV Tubo 01
2016
Temperatura de transporte 4°C
Temperatura de armazenamento -70°C



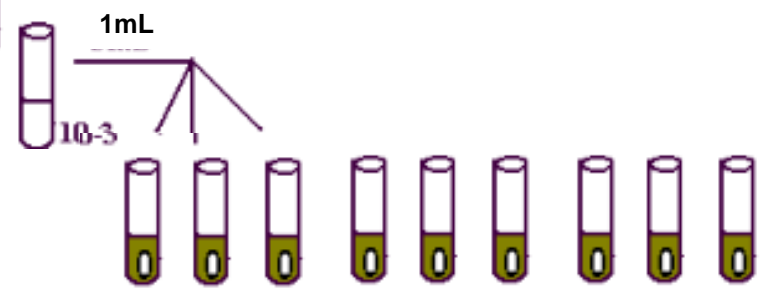
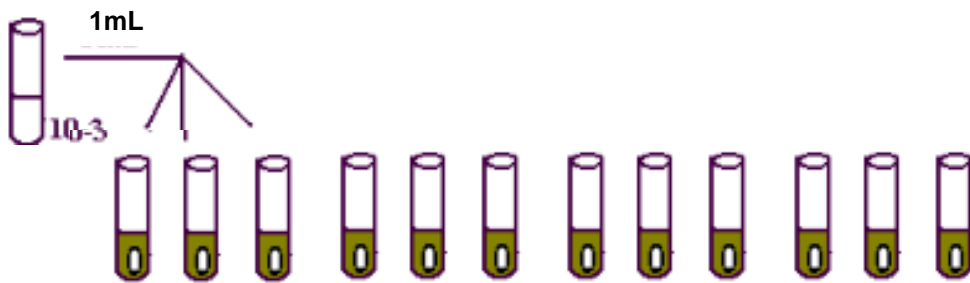
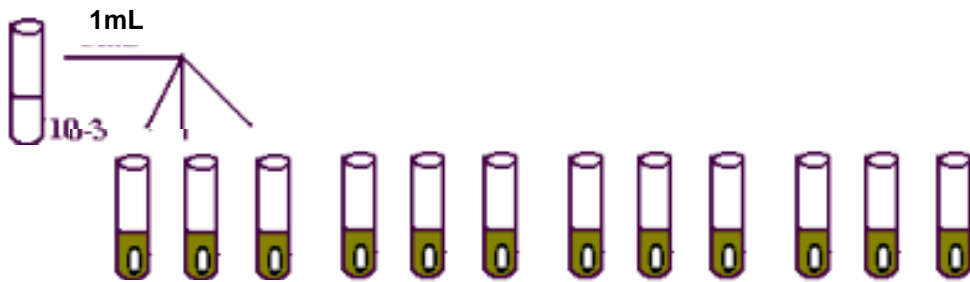
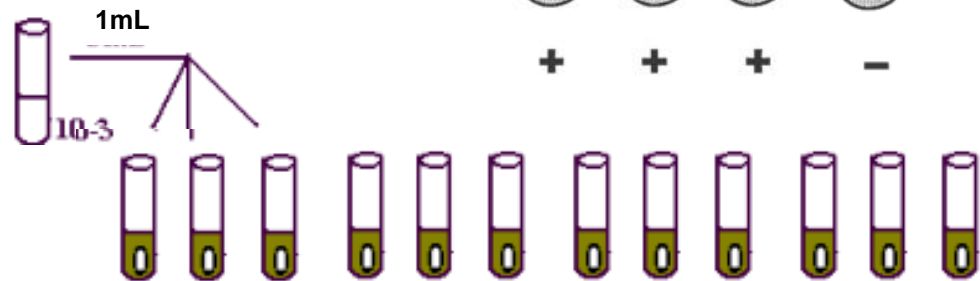


Concentrado viral

laboratório de virologia molecular



Plasma desfibrinado



Transporte da AEQ.



✓ O transporte ocorre em uma caixa de biossegurança com gelo reciclável (4°C), seguindo as recomendações de transporte e armazenamento da Nota Técnica 189/2010 DST/AIDS/HV/SVS/MS e deverá chegar ao laboratório em até 48 horas.

Avaliação da AEQ de carga viral de HCV

- ✓ Avaliar a variação das médias individuais das amostras A, B e C de cada laboratório com relação à média geral dos laboratórios participantes.
- ✓ Avaliar a variação das diferenças de carga viral entre as médias individuais das amostras A, B e C com relação à média geral das diferenças obtidas por todos os laboratórios participantes.
- ✓ Avaliar o grau de reprodutibilidade (desvio padrão das médias individuais) da quantificação da carga viral das amostras A, B e C testadas em cada triplicata.
- ✓ Avaliar a contaminação de reações através das quatro amostras negativas para HCV.



Tabela 2 - Sistema de pontuação de acordo com os parâmetros analisados na AEQ02-CV-HCV

Item Avaliado	Parâmetro		
Amostra	Média Individual da Amostra		
	Entre a média geral +/- 1 DP (inclusive)	Entre a média geral +/- 1 DP e a média geral +/- 2 DP	Acima da média geral +/- 2 DP
A	4 pontos	2 pontos	0 ponto
B	4 pontos	2 pontos	0 ponto
C	4 pontos	2 pontos	0 ponto
Amostra	Desvio Padrão da Média Individual (reprodutibilidade)		
	Entre 0,0 e 0,15 (inclusive)	Entre 0,15 e 0,30 (inclusive)	Acima de 0,30
A	4 pontos	2 pontos	0 ponto
B	4 pontos	2 pontos	0 ponto
C	4 pontos	2 pontos	0 ponto
Diferença	Diferença entre as médias individuais das amostras		
	Média geral +/- 1 DP (inclusive)	Entre a média geral da diferença +/- 1 DP e +/- 2 DP	Acima da média geral da diferença +/- 2 DP
A-B	3 pontos	1,5 pontos	0 ponto
B-C	3 pontos	1,5 pontos	0 ponto
Amostra	Contaminação de Amostras Negativas		
D	Reprovação (independente da pontuação obtida com as outras amostras)		



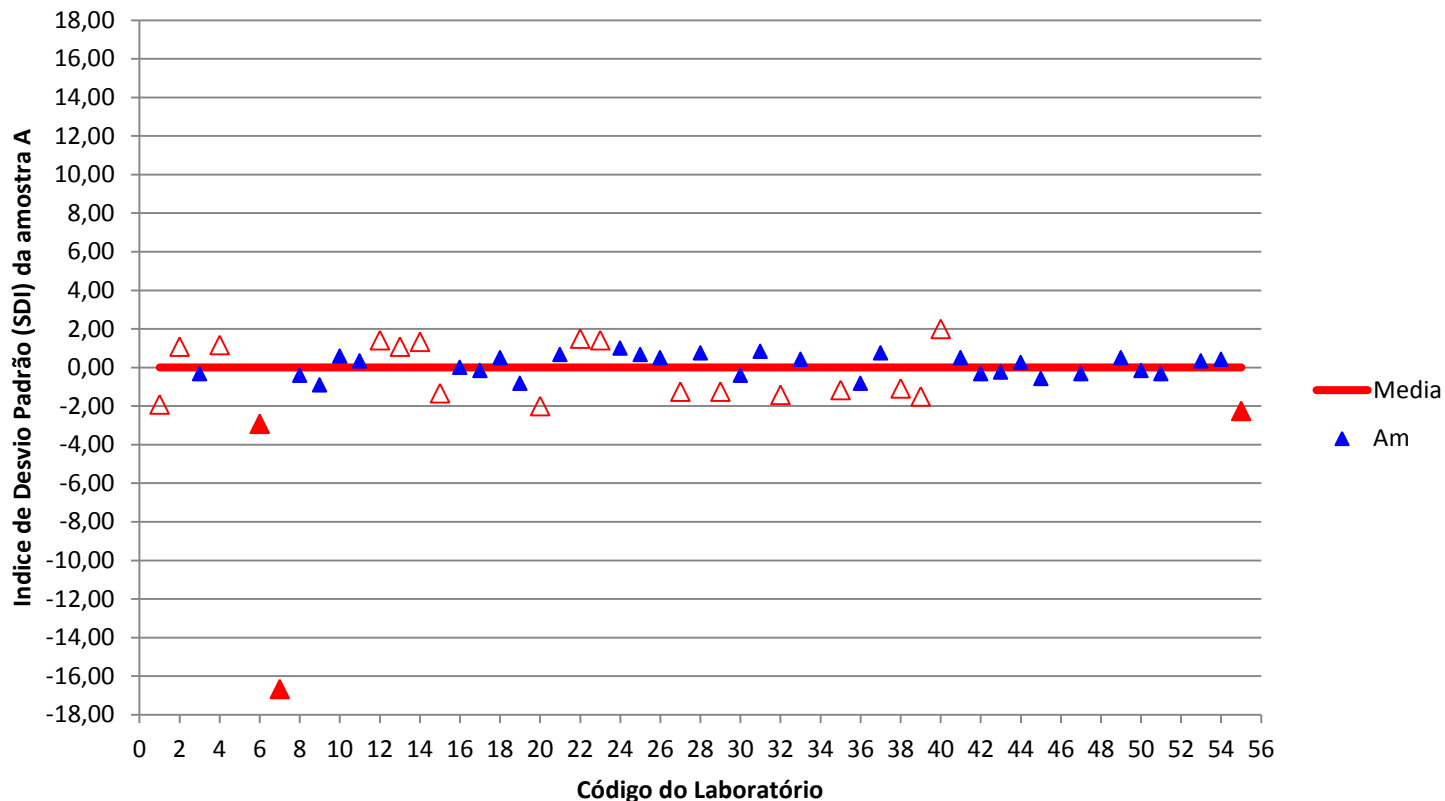
Montagem dos Painéis.

Tabela 1 - Caracterização das amostras da CVAEQ02-HCV

Amostra	Numeração dos tubos	Carga viral (UI/mL)	Carga viral (Log-UI/mL)
A	Tubos 1, 8, 12	50.000	4,70
B	Tubos 2, 10, 11	5.000	3,70
C	Tubos 3, 6, 9, 13	2.500	3,40
D	Tubos 4, 5, 7	Negativo	-----

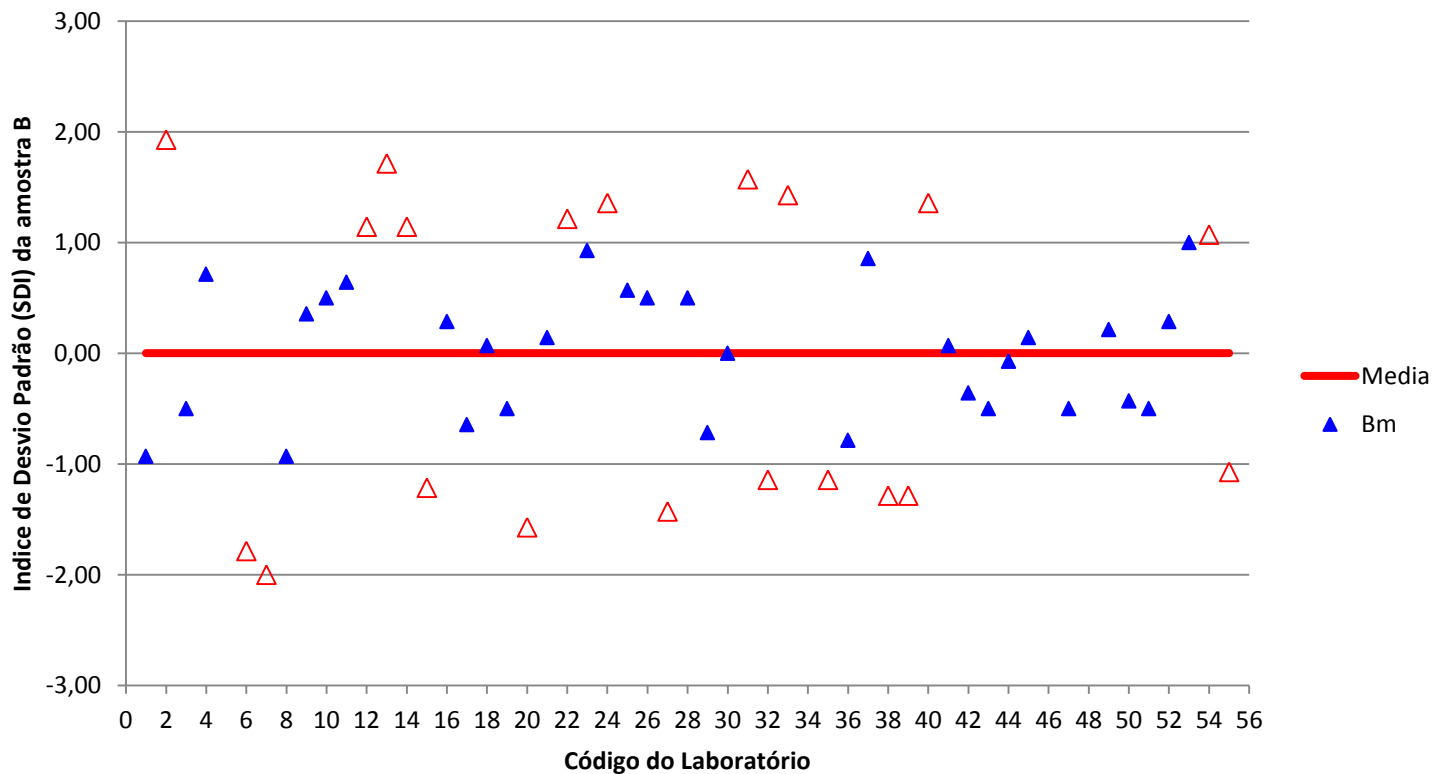
Resultados do AEQ02-CV-HCV

Media da Amostra A



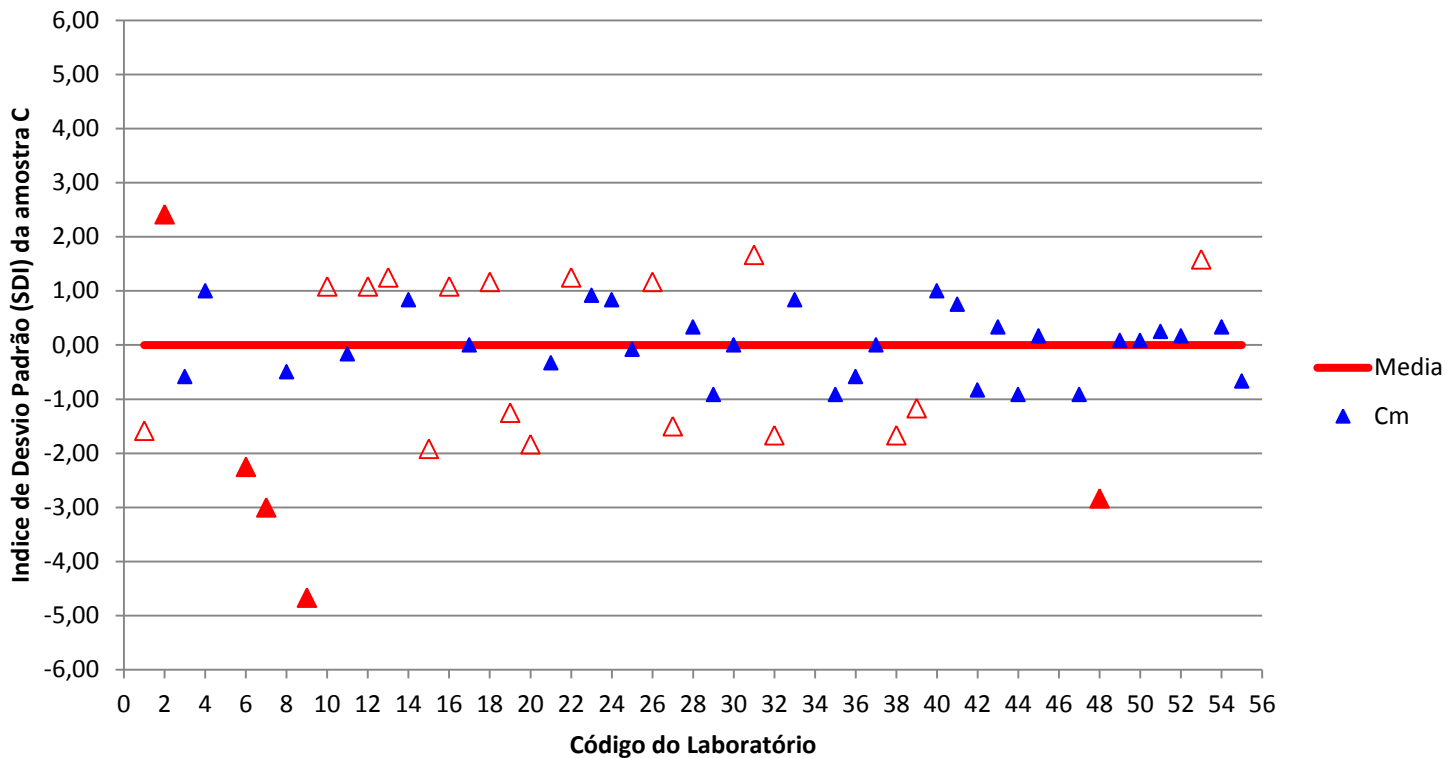
Resultados do AEQ02-CV-HCV

Media da Amostra B



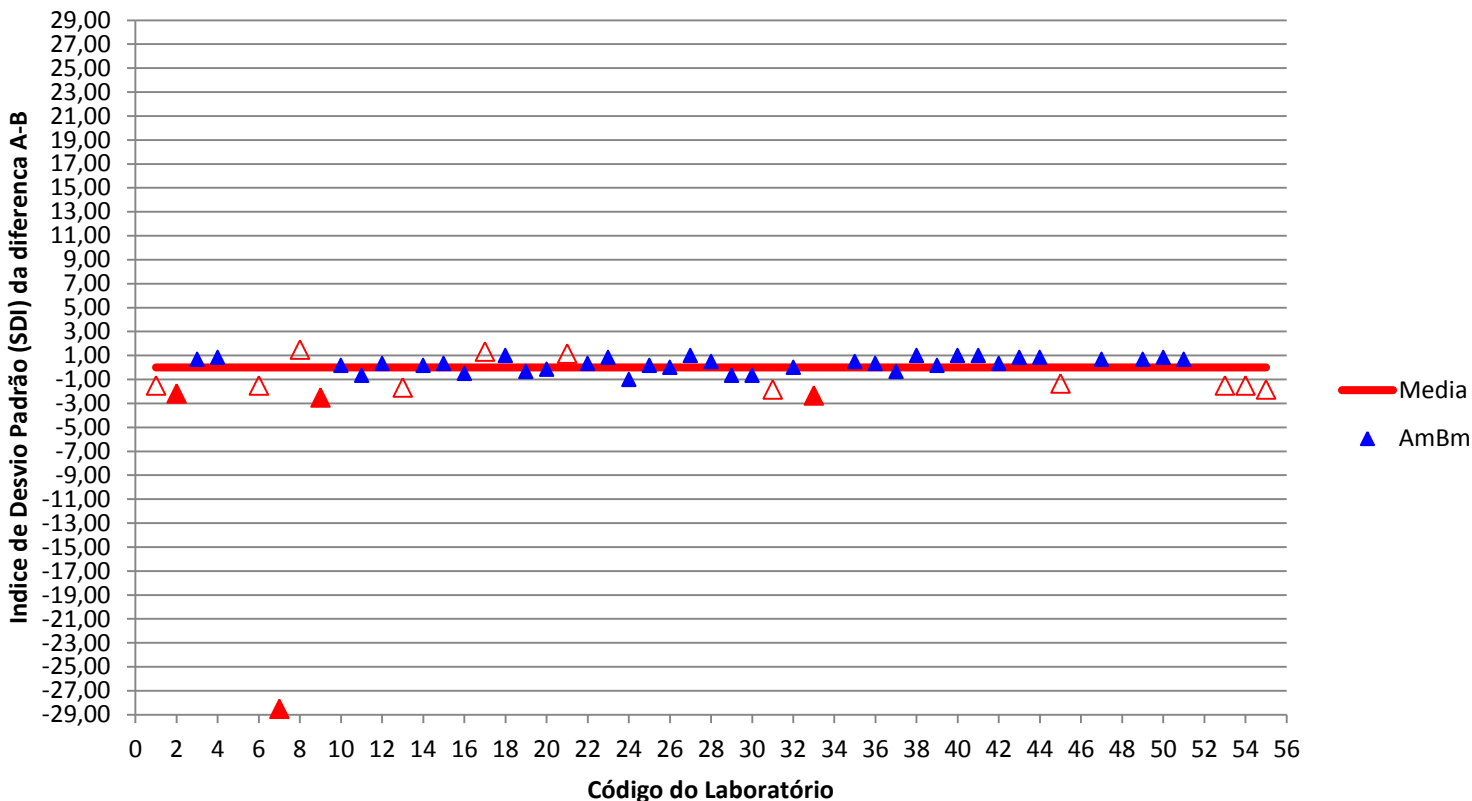
Resultados do AEQ02-CV-HCV

Media da Amostra C



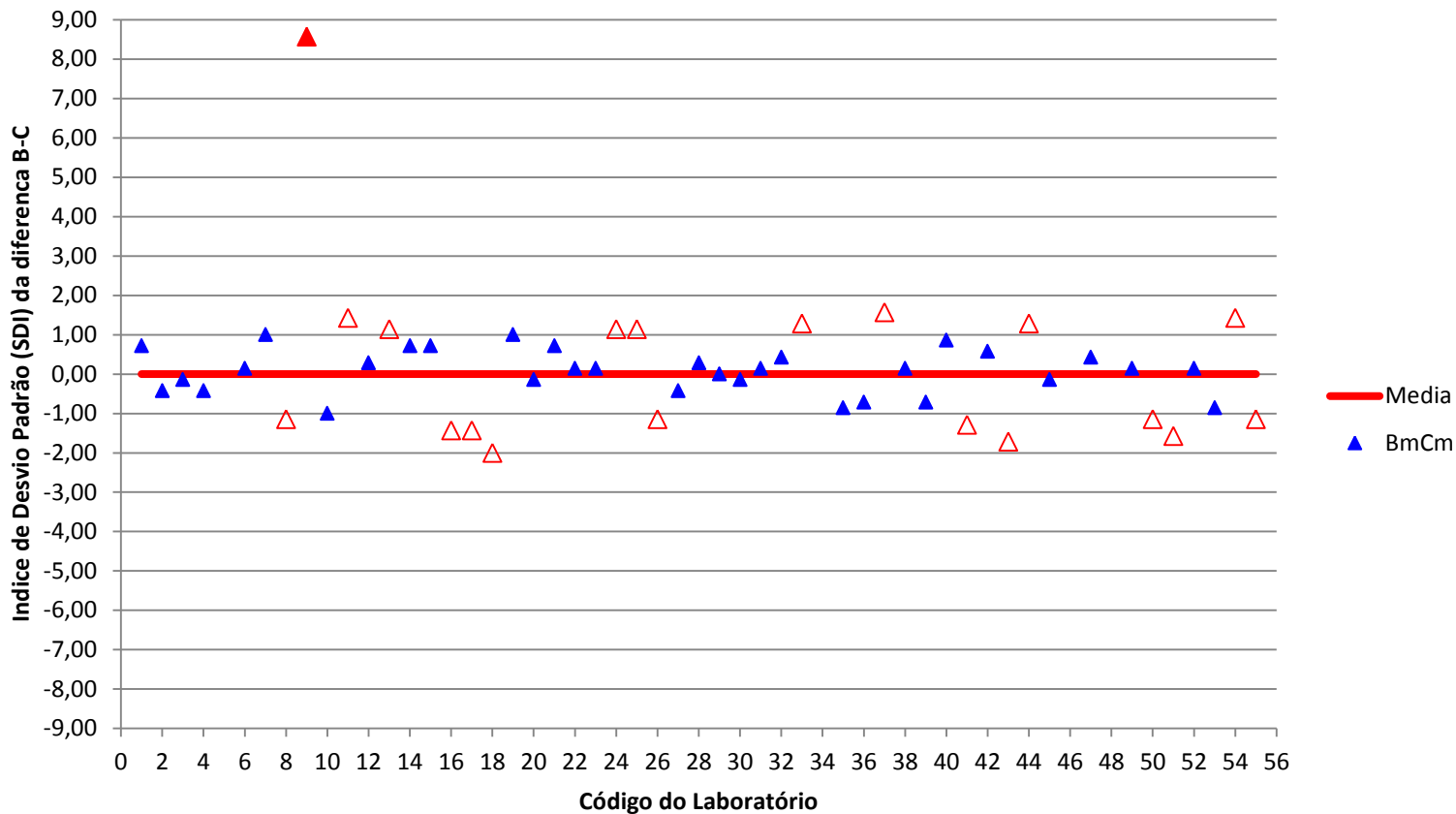
Resultados do AEQ02-CV-HCV

Media da Diferença A-B



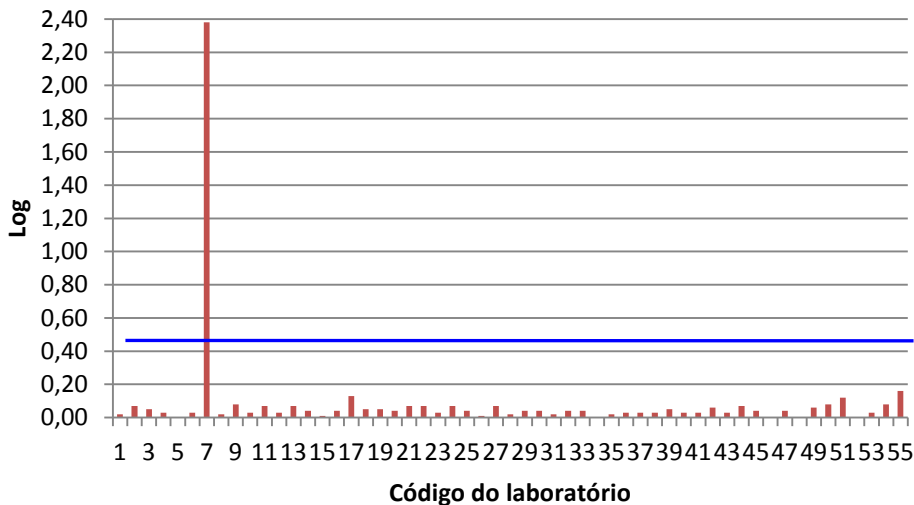
Resultados do AEQ02-CV-HCV

Media da Diferença B-C

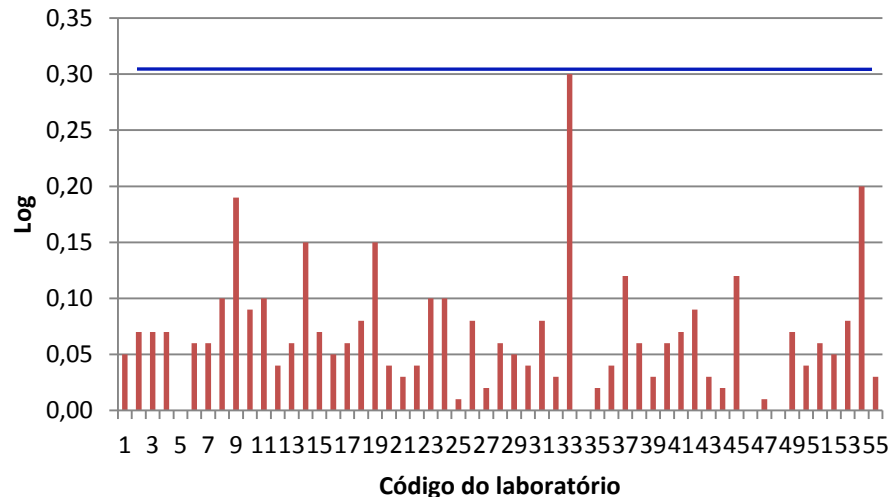


Resultados do AEQ02-CV-HCV

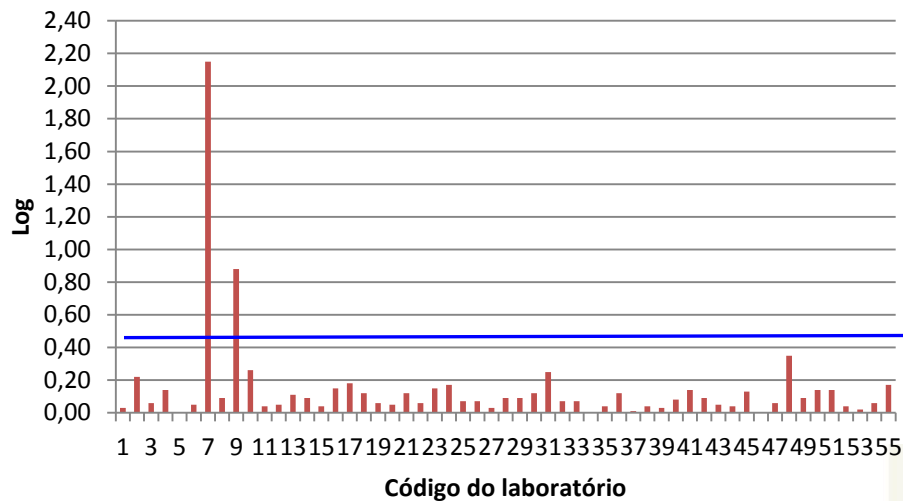
Desvio padrão amostra A (Asd)



Desvio padrão amostra B (Bsd)



Desvio padrão amostra C (Csd)



Resultados do AEQ02-CV-HCV

Laboratórios Participantes do Programa N=56	Resultado Pontuação	
	Nº de Laboratórios	%
Nº de Laboratórios Participantes da AEQ02-CV-HCV	51	91
Nº de Laboratórios que obtiveram Pontuação Máxima	7	13,7
Nº de Laboratórios que obtiveram 70 a 99% da Pontuação Máxima	36	70,6
Nº de Laboratórios com Pontuação inferior a 70% da Pontuação Máxima	4	7,8
Nº de Laboratórios com Contaminação	3	5,9

Resultados do AEQ02-CV-HCV

- ✓ Dos 56 laboratórios participantes apenas 5 não reportaram os resultados.
- ✓ Um laboratório teve a AEQ entregue no setor errado.
- ✓ Um laboratório teve problemas no envio de dados pelo Qualilab.
- ✓ Um laboratório teve problema na calibração.
- ✓ Um laboratório não possuía kit no período correspondente a AEQ.
- ✓ 12 laboratórios tiveram problemas de ERRO com o processamento das amostras, sendo os mais frequentes 3118 (coágulos) e erro 4457 (erro no controle interno).

UFRJ **LVM**



laboratório de
virologia molecular

Dr. Amilcar Tanuri

Dr^a. Diana Mariani

Dr^a. Luciana S. Pessoa

Dr. Orlando C. Ferreira Jr



**DST-AIDS
HEPATITES VIRAIS**

Ministério
da Saúde



Dr^a. Ana Flavia N. Pires
Equipe CLAB

Dr^a. Maria Luiza Bazzo

Obrigado!