



Avaliação Externa da Qualidade Carga Viral do HBV DNA

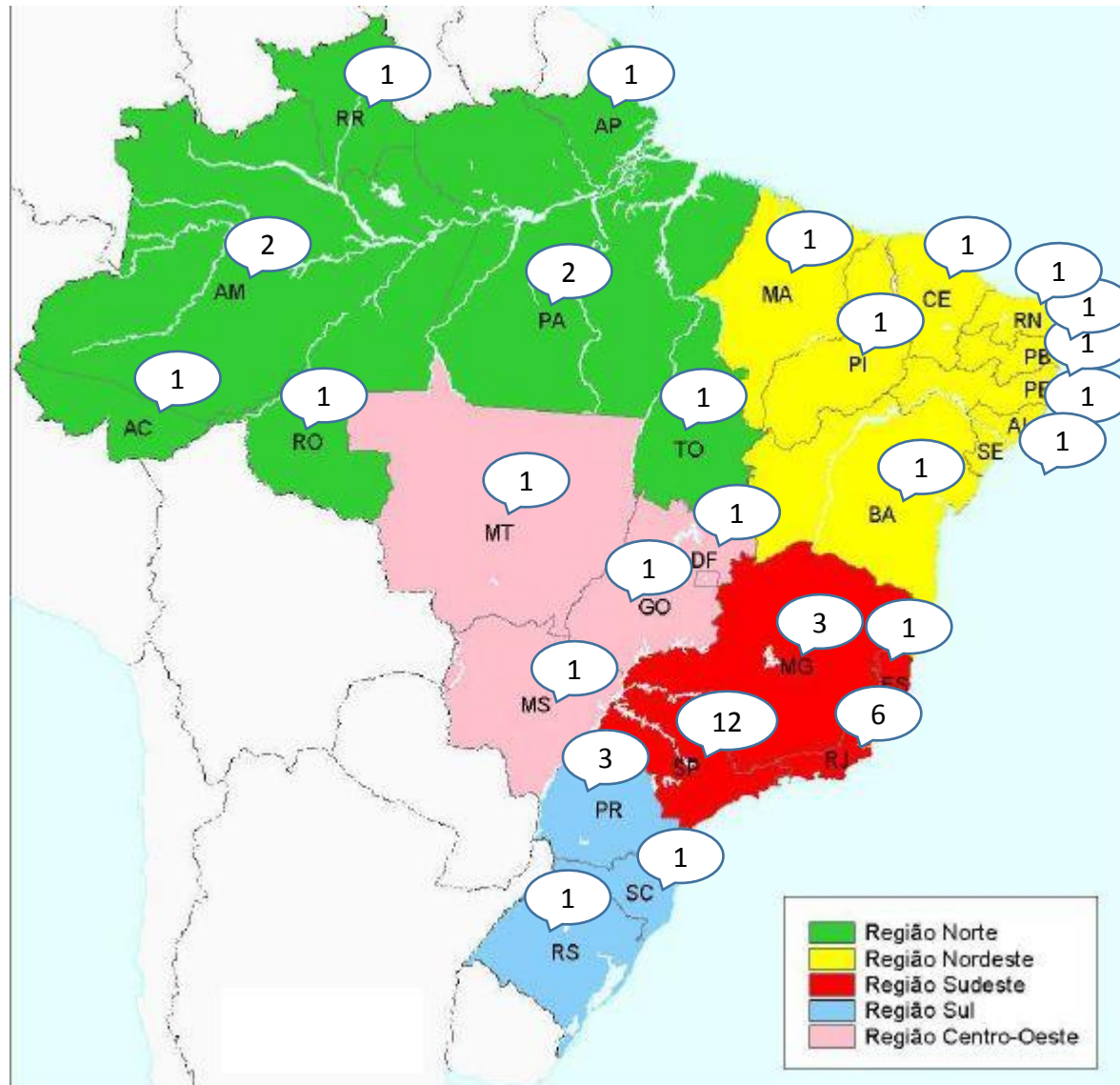
2016

Lia Laura Lewis-Ximenez, MD, PhD
Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Importância

- Sistema de qualidade do laboratório
 - Melhorias de qualidade
 - Boas praticas laboratoriais
 - Aperfeiçoar habilidades técnicas
- Avaliar desempenho do laboratório
- Seguir padrões internacionais (ISO)
- Garantir resultados laboratóriais de qualidade para os clientes (pacientes)
- Identificar problemas nas plataformas da rede

Rede de Laboratórios – AEQ CV-HBV



Nº de Laboratórios por Região

2012 AEQ-CV HBV 001 = 33

2014 AEQ-CV HBV 002 = 37

2015 AEQ-CV HBV 003 = 49

Distribuição de Laboratórios por Região (2015)

Região	Estados	Nº de Laboratórios
Norte	7	9
Nordeste	9	9
Centro-Oeste	4	4
Sudeste	4	22
Sul	3	5
Total	27	49

AEQ de Carga Viral do HBV

- ✓ Identificação de amostras matrizes
- ✓ Diluição seriada das amostras
- ✓ Montagem dos painéis
- ✓ Envio dos painéis aos laboratórios da rede
- ✓ Testagem do AEQ
- ✓ Envio de resultados no sistema (QUALILAB)
- ✓ Avaliação dos resultados
- ✓ Relatório final

Origem das Amostras

Amostras brasileiras

- Plasma excedente de amostras do LACEN/RJ e Fiocruz
- Amostras primárias: cargas virais $\geq 6 \log \text{UI/ml}$.

AEQ	Matriz de HBV DNA	Nº de painéis
AEQ 001	Pool de várias amostras com $CV \approx 6 \log_{10}$	43 painéis (12 tubos cada)
AEQ 002	Pool de 2 amostras com $CV \approx 7 \log_{10}$	90 painéis (12 tubos cada)
AEQ 003	1 amostra com $CV \approx 9 \log_{10}$ (geno F)	79 painéis (12 tubos cada)

Diluyente Utilizado

AEQ	Diluyente	Preparo do Plasma	Cargas Virais
AEQ CV-HBV 001	Plasma de banco de sangue	Centrifugação (1x) e filtração	5, 4 e 3 \log_{10}
AEQ CV-HBV 002	Plasma de banco de sangue	Centrifugação (3x) e filtração	5, 4 e 3 \log_{10}
AEQ CV-HBV 003	Plasma commercial desfibrinado	não necessário	6, 5 e 4 \log_{10}

Controle de Volume dos Painéis



AEQ	Pesagem individual	Volume	Volumes < 10%
AEQ CV-HBV 001	não	750 μ l	-
AEQ CV-HBV 002	← sim	1000 μ l	1/1080
AEQ CV-HBV 003	sim	1000 μ l	0/948

Envio dos Painéis



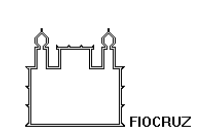
Figura – Caixa para envio dos painéis. Componentes da caixa: isopor, canister, círculo de isopor, círculo de isopor e plástico bolha.

Transporte dos painéis do AEQ para carga viral do HBV DNA

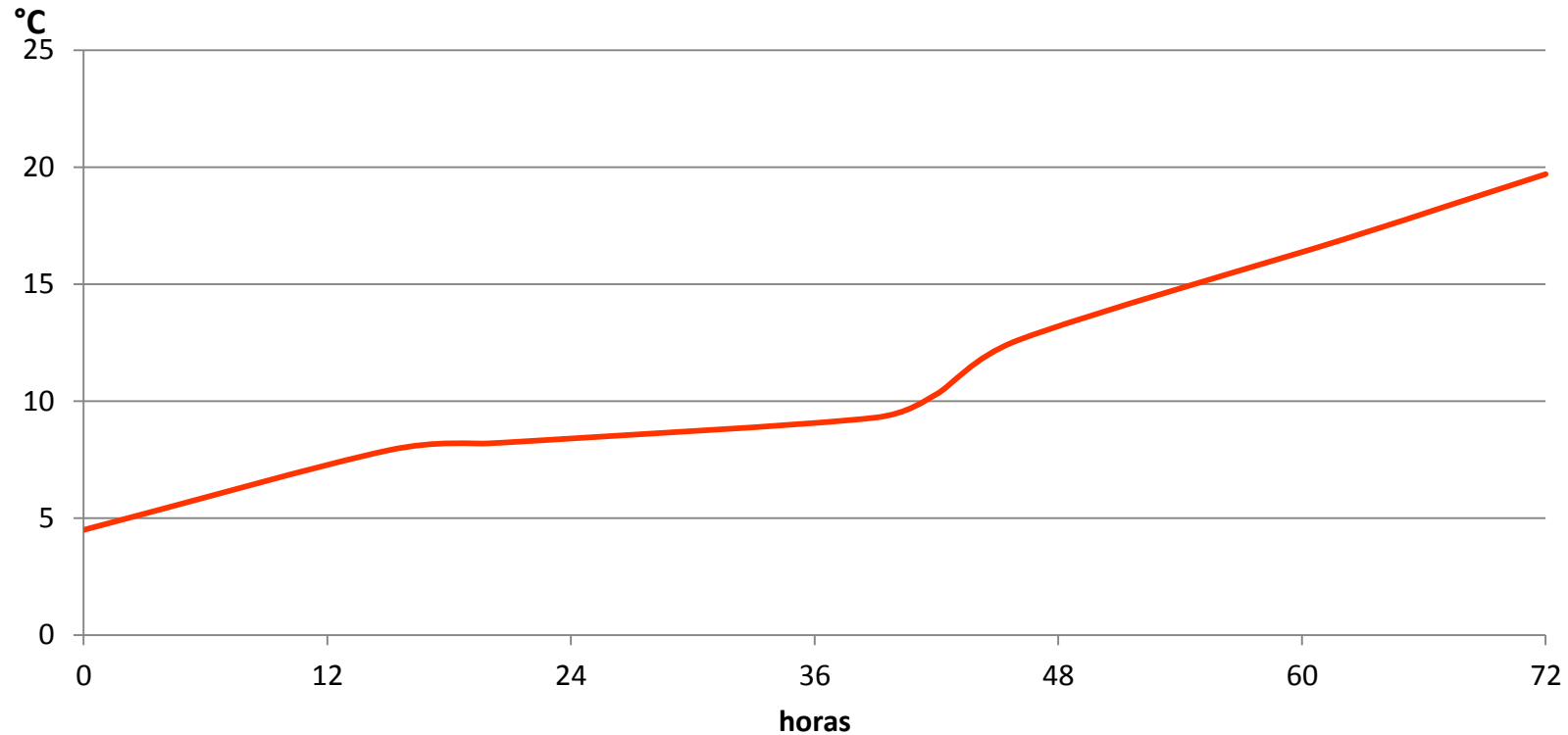


Embalagem segue
as normas do IATA
(International Air
Transport Association)





Variação da temperatura interna das caixas térmicas que acondicionam os painéis juntamente com gelo reciclável



Estabilidade do HBV DNA

TABLE 1. Sample degradation of unstabilized viral nucleic acids in plasma at 37°C shown by quantitative PCR

Days	Quantity (log molecules mL)		
	HCV	HIV	HBV
0 (FFP)	4.88 ± 0.15*	7.72 ± 0.21	6.84 ± 0.11
1	4.63 ± 0.08†	7.61 ± 0.21	6.81 ± 0.14
3	4.10 ± 0.17†	7.39 ± 0.19†	6.77 ± 0.12
7	3.77 ± 0.20†	6.77 ± 0.11†	6.77 ± 0.16
14			6.76 ± 0.20
21			6.72 ± 0.05†
28			6.56 ± 0.17†

* Mean ± SD quantity of six replicates determined by quantitative PCR.

† Significantly different from Day 0 sample ($p < 0.05$).

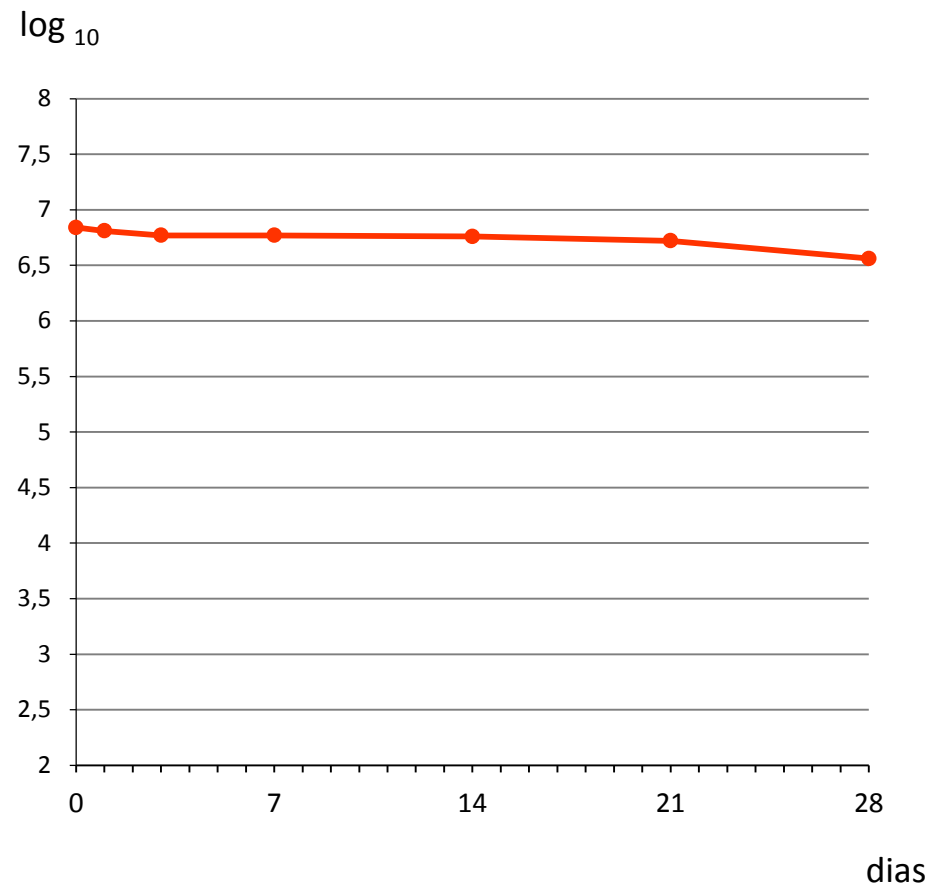
Tabela 1. Quantificação do HBV DNA ao longo de 7 dias em amostras armazenadas a 42°C.

DAYS	Target Level 5 log ₁₀	Target Level 4 log ₁₀	Target Level 3 log ₁₀
0	5,43 ± 0,120	4,59 ± 0,030	3,57 ± 0,110
1	5,33 ± 0,035	4,49 ± 0,017	3,46 ± 0,300
2	5,35 ± 0,035	4,54 ± 0,020	3,51 ± 0,120
3	5,36 ± 0,042	4,61 ± 0,026	3,47 ± 0,210
4	5,37 ± 0,035	4,44 ± 0,050	3,38 ± 0,035
5	5,27 ± 0,140	4,41 ± 0,030	3,51 ± 0,015
7	5,30 ± 0,023	4,35 ± 0,005	3,46 ± 0,049

Degradação do HBV DNA

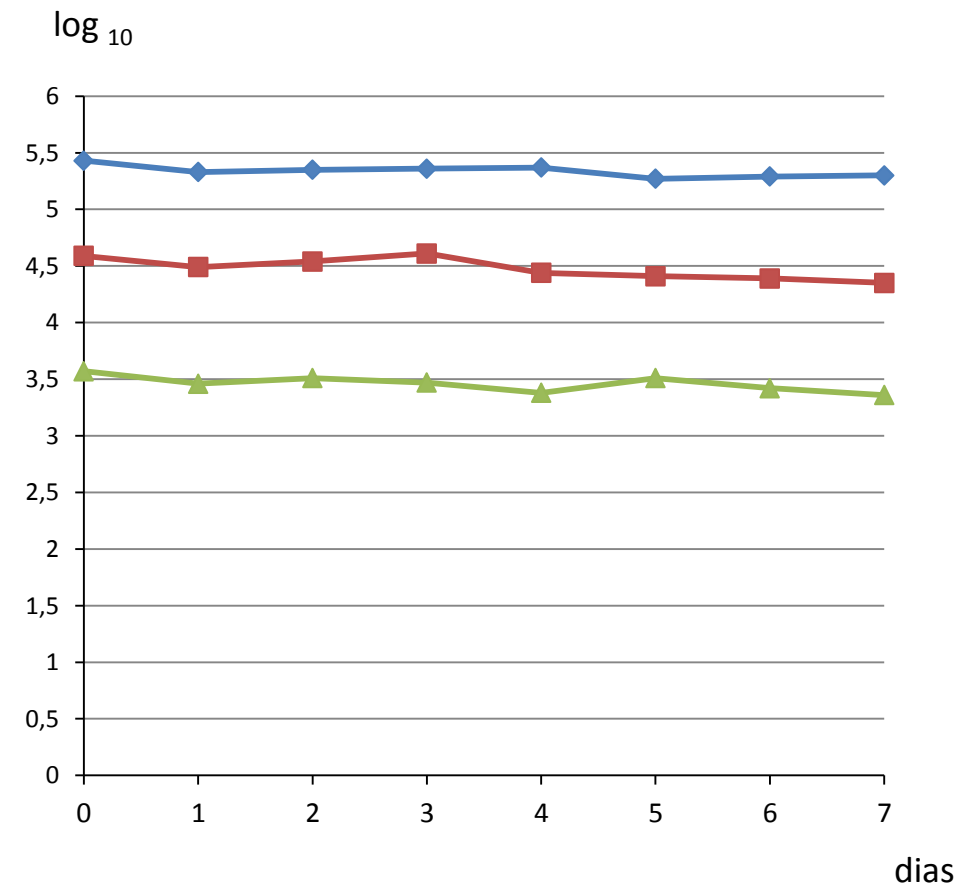
Temperatura = 37° C

Lee, DH *et al*, Transfusion, 2002



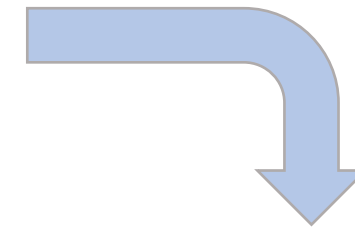
Temperatura = 42° C

De Almeida, WR *et al*, BJMBR, 2015



Pontuação de acordo com parâmetro analisado

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	2 pontos	0 ponto
B-C	3 pontos	2 pontos	0 ponto
Amostra	Contaminação de Amostras Negativas		
D	Reprovação (independente da pontuação obtida com as outras amostras)		



Pontos	Certificado
30	excelência
21-29	aprovado
< 21	reprovado
Contaminação	reprovado

RESULTADOS

Transporte do AEQ tempo e condições de entrega (20 minutos – 53 horas)

AEQ	< 24 horas		24.1 – 48 horas		> 48 horas		Total
	n	%	n	%	n	%	n
AEQ 001	31	93.94	2	6.06	0	0	33
AEQ 002	8	22.86	26	74.28	1	2.57	38 (35*)
AEQ 003	23	46.94	25	51.02	1	2.04	49



AEQ	Congelado		Congelado		Congelado	
	n	%	n	%	n	%
AEQ 001	-	-	-	-	-	-
AEQ 002	4/8	50	14/26	54	0/1	0
AEQ 003	13/23	54	13/25	52	0/1	0

Observações Relatados

AEQ	Total amostras	No de amostras com fibrina	Volume Insuficiente
AEQ 001	360	24 (9 sem resultados)	7
AEQ 002	396	29	12 (1 painel)*
AEQ 003	528	0	0

* Painel chegou congelada afastando possibilidade de extravazamento

AEQ	Pesagem individual	Volume	Volumes < 10%
AEQ CV-HBV 001	não	750 μ l	-
AEQ CV-HBV 002	sim	1000 μ l	1/1080
AEQ CV-HBV 003	sim	1000 μ l	0/948

Desempenho dos Laboratórios

	AEQ 001		AEQ 002		AEQ 003	
LABORATÓRIOS	33	%	37	%	49	%
PARTICIPANTES	30	91	32	86	44	91
NÃO PARTICIPANTES	3	9	5	14	5	9
30 pontos	4	13	10	31	10	23
21-29 pontos	22	73	14	44	28	64
< 21 pontos	4	13	8	25	3	7
contaminação	0	0	0	0	3	7

Observações

- ❑ Inconsistências nos resultados registrados
veracidade das informações reportados
(congelamento das amostras, volumes, etc)
- ❑ Informações incoerentes
Exemplos:
amostras entregues < 6 horas chegaram descongelados
amostras entregues > 48 horas chegaram congeladas
- ❑ Preocupação desnecessária sobre condições de chegada
congelada versus descongelada para o AEQ de HBV DNA

Conclusões

- ❖ Houve elevada adesão ($\geq 86\%$) dos laboratórios da Rede Nacional de Carga Viral ao Programa de Avaliação Externa da Qualidade reflete o compromisso dos laboratórios que a compõem.
- ❖ A maioria dos laboratórios ($\geq 75\%$) foram aprovados nas três avaliações.
- ❖ Recomendamos que os laboratórios que obtiveram pontuação inferior a 21, verifiquem com atenção a rotina de trabalho, com o intuito de identificar possíveis problemas de processamento.
- ❖ Os laboratórios que apresentaram contaminação necessitam realizar medidas corretivas de descontaminação.
- ❖ A Fiocruz continuará utilizando plasma comercial no intuito de eliminar a presença de coágulos de fibrina.
- ❖ O controle individual de pesagem de cada amostra após a confecção dos painéis é uma etapa importante para assegurar o volume necessário para realização dos testes.

Perspectivas Futuras

- Obtenção de amostras HBV DNA + de outras regiões do Brasil
- Liofilização de painéis