

Hacia la Armonización de Métodos de Diagnóstico Molecular: Carga de Virus Epstein-Barr en Argentina II - Estrategias de calibración con Primer Estándar Internacional EBV-OMS

Fellner MD¹; Durand KA¹; Rodriguez M²; Irazu L²; Picconi MA¹ y Red Nacional de Laboratorios de EBV.

¹Servicio Virus Oncogénicos, Laboratorio Nacional de Referencia de EBV, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Carlos G. Malbrán", Argentina

²Equipo Operativo Gestión de Calidad, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Carlos G. Malbrán", Argentina

grupoebv.dx@gmail.com mdfellner@anlis.gov.ar fellnermd@gmail.com

Participantes de la Red Nacional de Laboratorios de EBV: B. Livellara (Htal. Italiano de Buenos Aires); E. Sturba (Laboratorios Stambouliau); M. Rahdal, M.

Zubieta, S. Loudet (Hospital El Cruce); G. Cabral (Hospital Posadas); A. Suarez, M. Gabbarini (IACA Laboratorios); M.A. Baridón, F. Perez (Hospital Rossi, La Plata); M. Sciara, E. Zubillaga, F. Fay (Laboratorio CIBIC); A.G. Sanchez, T. Alvarelos (Hospital Privado Centro Medico de Cordoba); M.G. Barbás, G. Castro; A. Cudola (Laboratorio Central de Córdoba); C. Theaux (Hospital Durand); C. Ortowsky, S. Ferrini (Laboratorio Central de Corrientes); S. Lejona (CEMAR), N. Cuglia (Hospital Notti – Mendoza); G. García (Manlab), G. R. Perez (Gammalab- Rosario); S. Grutadauría (Laboratorio Elías Kiener – Córdoba); J. Galavotti, V. Arias, M. Benvenuti (Hospital Penna – Bahía Blanca); F. Bolcic (Clínica Raña – Neuquén); O. Jacquez (Hospital Gutierrez); L. Montoto (Hospital Elizalde).

INTRODUCCIÓN

En 2012, surgió el Primer Estándar Internacional para ácidos nucleicos de virus Epstein-Barr (EBV) producido por NIBSC/OMS (primer eslabón de la cadena de trazabilidad). La trazabilidad es una propiedad que permite transferir el valor verdadero de un material y/o método de referencia a un procedimiento de rutina. Los calibradores de cuantificación molecular en general son solo trazables al del fabricante, y por ende los resultados no son comparables entre las distintas plataformas de diagnóstico. Para iniciar la armonización de los métodos de carga de EBV (CV) en Argentina, se planteó su calibración con el EBV-OMS en unidades internacionales (UI).

Nuestro objetivo fue calibrar en UI las metodologías de CV que se utilizan en Argentina con fines clínicos y comparar las estrategias de calibración utilizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

- ✓ El Laboratorio Nacional de Referencia de EBV (LNR) envió una dilución del EBV-OMS [5x10⁵ UI/ml] a 21 laboratorios, que estimaron la CV-EBV sobre la/s [EBV- OMS], según el protocolo de calibración seleccionado e informaron los resultados en copias/ml y UI/ml.
- ✓ Los factores de conversión de copias a UI fueron calculados aplicando la media aritmética (MA), la media geométrica (MG) y recta de regresión (RR).
- ✓ Para comparar los factores de conversión: i. Se seleccionaron los 9 laboratorios que aplicaron un protocolo de calibración que generó 36 datos sobre un mismo tipo de muestra clínica. ii. Se estimaron estadísticos de posición y dispersión de las cargas virales calculadas con las 3 estrategias: MA, MG y RR

RESULTADOS

Calibración

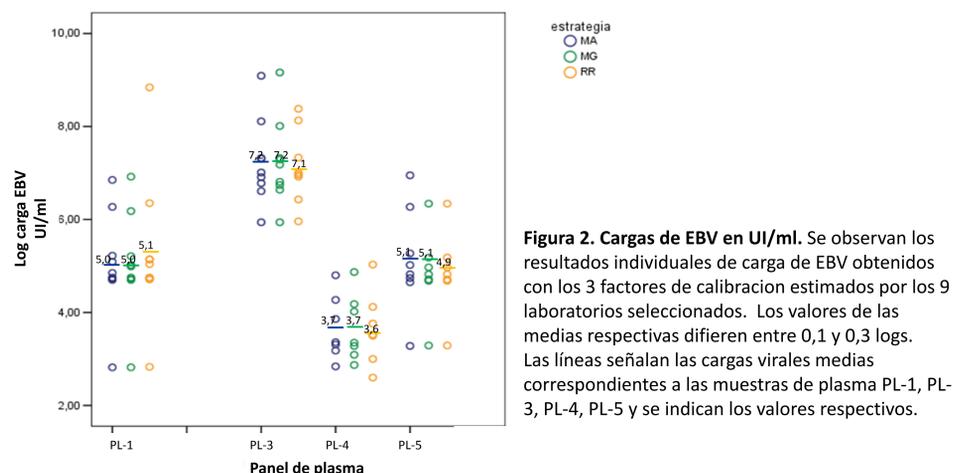
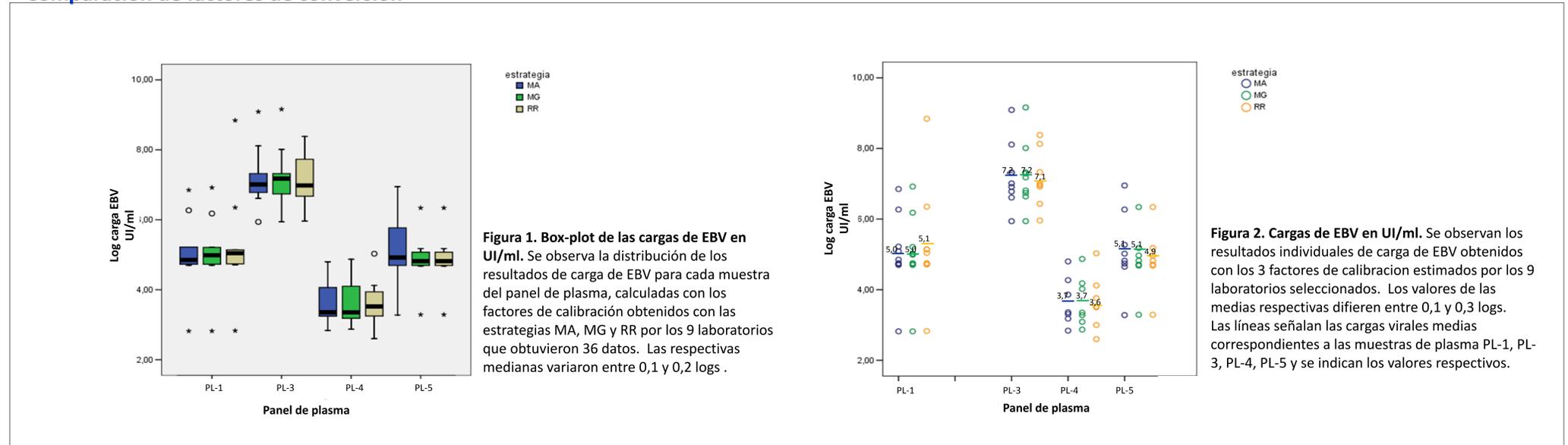
LABORATORIOS	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN	VOLUMEN MUESTRA EXTRAÍDA (µL)	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE EBV
A	Plasma	High Pure Template (Roche)	200	LightCycler EBV (Roche)
B	Plasma	High Pure Template (Roche)	200	Tib Mol Biol
C	Plasma	MagnaPure (Roche)	200	Argene-Biomeriux
D	Plasma	MagnaPure (Roche)	500	LightCycler EBV (Roche)
E	Plasma	MagnaPure (Roche)	500	LightCycler EBV (Roche)
F	Plasma	High Pure Template (Roche)	200	Tib Mol Biol
G	Plasma	MagnaPure (Roche)	1000	LightCycler EBV (Roche)
H	Plasma	High Pure Template (Roche)	200	LightCycler EBV (Roche)
I	Plasma	MagnaPure (Roche)	400	Tib Mol Biol
J	Plasma	Nuclisens / Minimag (Biomerieux)	200	Argene-Biomeriux
K	Plasma	MagnaPure (Roche)	400	LightCycler EBV (Roche)
L	Plasma	Mini Kit, QiaGen	200	Artesanal
LL	Plasma	QIAamp MinElute Virus Spin Kit	200	Tib Mol Biol
M	Plasma	MagnaPure (Roche)	200	ND
N	SE	Mini Kit, QiaGen	200	LightCycler EBV (Roche)
Ñ	SE	Zymo Research Viral DNA	200	EBV Q-PCR Alert Kit
O	SE	High Pure Template (Roche)	200	LightCycler EBV (Roche)
P	SE	MagnaPure (Roche)	400	LightCycler EBV (Roche)
Q	SE	NI	200	EBV Q-PCR Alert Kit
R	SE	Zymo Research Quick DNA Plus	100	EBV Q-PCR Alert Kit
S	SE	Zymo Research	200	EBV Q-PCR Alert Kit
T	SE	Mini Kit, QiaGen	200	Método artesanal
U	SE	Mini Kit, QiaGen	200	

MUESTRA CLÍNICA	[EBV-OMS]	PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN		N° LABORATORIOS	FACTORES DE CONVERSIÓN
		N° datos (Extr / PCR-TR / días)	ESTRATEGIA DE CÁLCULO		
Plasma	5x10 ⁵	12 (1/3/ 4)	MA	4 (B, C, J, LL)	0,7; ---; 0,8; 4,1
SE				6 (M; Ñ; O; Q; R; S)	4,1; 36,3; 0,2; 4,3; 1,0; 2,0
Plasma	5x10 ⁵ ; 5x10 ⁴ ; 5x10 ³	36 (2/2/ 3)	MG	6 (A; E; F; H; I; K)	0,1; 23,3; 1,0; 0,2; 177; 0,2
SE				2 (N; P)	0,2; 1,0
Plasma	5x10 ⁵ ; 5x10 ⁴ ; 5x10 ³	36 (1/4/ 3)	RR	3 (D; G; L)	1,0; 1,1; 1,2
SE				2 (T)	1,2; 1,1

Tabla 2. Protocolos de calibración. Para calcular el factor de conversión se aplicaron 3 estrategias: 1) Media aritmética (MA): implicó la obtención de 12 datos a partir de una única concentración EBV-OMS y se calculó el factor de conversión según, 500000 (EBV-OMS)/MA; 2) Media geométrica (MG): implicó la obtención de 36 datos a partir de tres concentraciones de EBV-OMS y se calculó el factor de conversión según, 500000/MG. 3) Recta de regresión (RR): se generan 36 datos y se determina la ecuación de la recta correspondiente, a partir de la cual se calcula el factor de conversión. El laboratorio C utilizó un protocolo comercial.

Tabla 1. Métodos de carga de EBV utilizados por los participantes. Se utilizaron una amplia variedad de metodologías de extracción de ADN y de cuantificación de EBV para analizar los paneles de plasma y sangre entera. SE: sangre entera. NI: no informado

Comparación de factores de conversión



CONCLUSIONES

- Hasta el momento 22 laboratorios de la Red Nacional de EBV han calibrado sus metodologías de carga viral en unidades internacionales (UI).
- La similitud de los valores de CV-EBV expresados en UI/ml, independientemente del modelo de calibración aplicado, permite sugerir el uso de la estrategia de 12 determinaciones debido a su menor costo.

PERSPECTIVA: Continuar la implementación de las calibraciones en los laboratorios clínicos del país, lo que permitirá armonizar los métodos de carga viral en el camino para alcanzar un consenso en el diagnóstico de EBV.