



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
Centro de Ciências da Saúde - CCS
Departamento de Saúde Pública - SPB
Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva - PGSC

Andrea Petry

**IMPLANTAÇÃO DOS TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE
ÁCIDOS NUCLÉICOS HIV/HCV BIO-MANGUINHOS® NA
TRIAGEM DE DOADORES DE SANGUE: QUESTÕES
EPIDEMIOLÓGICAS E LOGÍSTICAS**

Florianópolis, 2013.

ANDREA PETRY

**IMPLANTAÇÃO DOS TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE
ÁCIDOS NUCLÉICOS HIV/HCV BIO-MANGUINHOS® NA
TRIAGEM DE DOADORES DE SANGUE: QUESTÕES
EPIDEMIOLÓGICAS E LOGÍSTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Saúde Coletiva.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia de Doenças Transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Emil Kupek

Florianópolis, 2013.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Petry, Andrea
IMPLANTAÇÃO DOS TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS
NUCLÉICOS HIV/HCV BIO-MANGUINHOS® NA TRIAGEM DE DOADORES DE
SANGUE: QUESTÕES EPIDEMIOLÓGICAS E LOGÍSTICAS / Andrea
Petry ; orientador, Emil Kupek - Florianópolis, SC, 2013.
152 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Saúde Coletiva.

Inclui referências

1. Saúde Coletiva. 2. NAT HIV HCV. 3. Doadores de
Sangue. 4. Segurança Transfusional. I. Kupek, Emil. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Saúde Coletiva. III. Título.

*Dedico esta tese ao meu pai Valdir (in memoriam) e a minha mãe Nanci
por me ensinarem que tudo nessa vida é possível: basta acreditar!*

AGRADECIMENTOS

Ao amado esposo Everaldo pelo amor, carinho e principalmente pela paciência e compreensão durante esta jornada.

Ao meu amado e saudoso pai Valdir, a minha querida mãe Nanci e aos meus irmãos: Giane, Karine, Elisabete, Valdir Jr e Daniel, por tudo o que significam em minha vida.

Ao querido orientador Prof. Dr. Emil Kupek que sempre esteve presente e acreditou nas minhas potencialidades: agradeço a oportunidade do desenvolvimento dessa tese e os ensinamentos e auxílio que foram fundamentais no desenvolvimento desse estudo. Obrigado!

Aos estimados Dr. Guilherme Genovez e a Jane Terezinha Martins pelas grandes oportunidades de crescimento profissional e pessoal com a participação de Grupos de Assessoramento Técnico (GAT) do NAT e de Controle de Qualidade Externo em Sorologia em Hemoterapia, junto a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde. A Giselle Evangelista Bissaro Barban pelo carinho e disponibilização dos dados da Hemorrede Brasileira.

As amigas Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves (Pesquisadora e Supervisora do Laboratório de Sorologia e NAT da UNICAMP), Dra. Patrícia Alvarez Baptista (Gerente do Projeto NAT-FIOCRUZ), Dra. Milena Oliveira (Chefe do Laboratório NAT da Fundação HEMOMINAS) e Dra. Priscila Murador (Assessora na Área de Hemoterapia da CGSH), exemplos de profissionais, pesquisadoras, mulheres e amigas.

Aos estimados membros avaliadores pertencentes ao quadro de docentes da UFSC: Prof. Dra. Maria Luiza Bazzo, Prof. Dr. Alcides Milton da Silva e Prof. Dr. Agnaldo Roberto Pinto: agradeço o carinho como aceitaram o convite para avaliar este estudo e pela sua disponibilidade.

Aos pesquisados da UFRJ e do IBMP, principalmente ao Dr. Rodrigo Brindeiro, um dos grandes idealizadores do kit NAT Bio-Manguinhos®, que juntamente com Patrícia Alvarez Baptista da FIOCRUZ, podem ser considerados os verdadeiros “pais” desse produto. Sem a competência, a dedicação e o empenho deles, o kit NAT não haveria nascido!

A Elisabete Ferreira, pela amizade que foi construída junto com o nascimento do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos.

A Patrícia Carsten, amiga de todas as horas...

As colegas e amigas Ligia Casagrande, Maria Aparecida, Sandra Regina, Liliane e Celina pela amizade e incentivo.

A Dirce e Osni meus queridos sogros e minha segunda família.

A equipe do Laboratório de Sorologia/NAT do HEMOSC pelo apoio e por entenderem a necessidade de minha ausência em muitos momentos.

Aos colegas do Curso de Doutorado: Doroteia, Ione, Daniela e Angela pela amizade.

A equipe técnica do Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC) de Bio-Manguinhos, aos supervisores e aos técnicos que executam suas atividades nos 14 Laboratórios SIT-NAT instalados no Brasil pela busca incansável da qualidade na execução dos testes NAT HIV/HCV.

RESUMO

A questão da segurança transfusional relacionada à redução da transmissão do HIV e HCV está ligada ao recrutamento de doadores de sangue saudáveis, de uma triagem clínica eficaz na qual o sangue é coletado de indivíduos isentos de comportamento de risco para doenças infecciosas e no uso de testes para diagnóstico sensíveis e utilização de boas práticas laboratoriais. Este estudo tem o objetivo geral de analisar os aspectos epidemiológicos e logísticos relacionados à implantação do NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem de doadores de sangue. Estes aspectos envolveram a estimativa do risco residual para o HIV e HCV entre os doadores de sangue de Santa Catarina, sendo possível evidenciar que houve a redução do risco após a implantação do NAT. O rendimento do NAT observado para o HIV no Brasil foi de 4,38 casos por milhão de doações de sangue realizadas entre 2011 e 2013 e para o HCV de 1,01 por milhão. Verificou-se que 13 transmissões de HIV e três de HCV foram evitadas no Brasil. Em relação à rotina NAT, realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC, foi detectada uma amostra em período de janela para HCV e duas amostras para HIV, correspondendo ao rendimento do NAT de 1/424.125 doações para o HCV e de 1/212.062 doações para o HIV, em amostra do Sul do Brasil. No estudo de estabilidade do RNA viral para o HCV e o HIV nas amostras testadas, foi possível constatar que as amostras podem ser analisadas nos período máximo de até 168 horas após a coleta e centrifugadas no período de até 144 horas após a coleta em uma temperatura controlada. As amostras podem ser transportadas em temperatura máxima de 25°C. Foi possível verificar o desempenho do kit NAT lote a lote e a padronização do uso de controle de qualidade interno na rotina, sendo obtido um coeficiente de variação médio para o HCV de 2,36% e de 1,23% para o HIV. Esses controles se mostraram de fácil execução e utilização na rotina dos laboratórios NAT. Verificou-se também que, mesmo com a utilização de técnicas muito sensíveis, como o NAT ainda há um risco de transmissão do HIV na transfusão. Ficou evidente que ainda há um grande desafio relacionado ao recrutamento e aos procedimentos de triagem clínica dos doadores de sangue no Brasil. Conclui-se que o uso da plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem do sangue doado trouxe para o Brasil a melhoria na segurança transfusional, e benefícios tecnológicos empregados na triagem laboratorial de doadores de sangue.

Palavras-chave: NAT, HIV, HCV, doadores de sangue, rendimento, estabilidade, controle de qualidade, Brasil.

ABSTRACT

The strategies to improve transfusion safety regarding the risk of HIV and HCV transmission to blood recipients includes the recruitment of healthy blood donors with low risk behavior for acquiring infectious diseases, the application of sensitive diagnostic tests and the use of good laboratory practices. This study aims to analyze some epidemiological and logistical aspects related to the implementation of NAT HIV / HCV Bio - Manguinhos® in screening blood donors.

In the state of Santa Catarina, a significant reduction of residual risk for HIV and HCV was observed after the implementation of NAT screening in blood donors. In Brazil, observed NAT yield for HIV and HCV was 4.38 and 1.01 cases per million blood donations made between 2011 and 2013, respectively, detecting 13 HIV and 3 HCV donations during infectious window period. This result corresponds to the NAT yield of 1/424125 HCV and 1/212062 HIV donations.

In the study of stability of viral RNA for HCV and HIV in the samples tested, it was established that the samples can be analyzed up to 168 hours after blood collection and centrifuged in the period up to 144 hours when stored in controlled temperature. Samples can be transported at temperatures up to 25 ° C. It was possible to verify the performance of the above NAT kit batch by batch and standardize the use of internal quality control routine. The coefficients of variation for HCV and HIV were 2.36% and 1.23%, respectively. The control proved easy to perform and use in daily routine of the NAT laboratories. However, even with the use of highly sensitive techniques such as NAT, residual risk of transmission of HIV through transfusion still remains at the level of 1.01 per 100.000 for HIV and 1.58 per 100.000 for HCV. This poses a great challenge for the recruitment of healthy blood donors in Brazil. We conclude that the use of Brazilian platform NAT HIV / HCV Bio-Manguinhos® in screening blood donors provided a significant improvement in transfusion safety and a technological advance in laboratory screening of blood donors.

Key-words: NAT, HIV, HCV, blood donors, yield, stability, quality control, Brazil.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CGSH – Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados
CBER – *Center for Biologics Evaluation and Research*
CT - *Cycle Threshold*
DATASUS – Departamento de Informática do SUS
DNA – Desoxiribonucleic acid
DNAc - Desoxiribonucleic acid complement
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FDA – *United States Food and Drug Administration*
FHB – Fundação Hemocentro de Brasília
FPS – Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo
GSM-NAT - Sistema de Gerenciamento Multicêntrico
h - hora
HBV – *Hepatitis B vírus*
HBsAg – *HBV superfície antigen*
HCV – *Hepatitis C virus*
HEMOES – Hemocentro do Espírito Santo
HEMOIBA – Hemocentro da Paraíba
HEMOMINAS – Hemocentro de Minas Gerais
HEMONORTE – Hemocentro do Rio Grande do Norte
HEMOPE – Hemocentro de Pernambuco
HEMORIO – Hemocentro do Rio de Janeiro
HEMORGS – Hemocentro do Rio Grande do Sul
HEMOSantos – Hemonúcleo de Santos
HEMOSC – Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HIV – *Human immunodeficiency virus*
HTLV – *Human T-lymphotropic virus*
IBMP – Instituto de Biologia Molecular do Paraná
MS – Ministério da Saúde do Brasil
mL – Mililitro
MP6 – *Minipool* de seis amostras (conjunto de amostras testadas em uma mesma reação)
NAT – *Nucleic Acid Test* (técnica de amplificação de ácidos nucleicos)
PCR – *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PCR-RT - *Polimerase Chain Reaction-Real Time* (reação em cadeia da polimerase em tempo real)
PPT-K - *Plasma preparation tube*
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA – *Ribonucleic acid*

RNA-HIV – *Ribonucleic acid – human immunodeficiency virus*

RNA-HCV – *Ribonucleic acid – hepatitis C virus*

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SIT-NAT – Sítio Testador NAT

SO/CO - *Sample/cut-off*

SUS - Sistema Único de Saúde

TMA - Amplificação Mediada por Transcrição

UCA - Unidade Coletadora de Amostras

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

uL – Microlitro

mL - Mililitro

URA - Unidade Referenciadora de Amostras

APRESENTAÇÃO

Esta tese de Doutorado, organizada de acordo com o regimento do Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), é composta por um capítulo inicial com introdução e justificativa sobre o tema de pesquisa – implantação da metodologia NAT (*Nucleic Acid Amplification Test*) para o HIV (vírus da imunodeficiência humana) e HCV (vírus da hepatite C), na testagem de amostras de doadores de sangue, sob os aspectos epidemiológicos: risco residual de transmissão do HIV e HCV aos receptores de sangue, ganho ou rendimento (*yield*) da implantação dessa tecnologia, prevalência e incidência desses marcadores entre doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC e aspectos logísticos que envolvem: a estabilidade do RNA (ácido ribonucleico) das amostras e a implantação do controle de qualidade na execução desses testes. Outro aspecto a ser abordado é o relato de um caso de transmissão do HIV com a transfusão, com testes sorológicos não reagentes e RNA-HIV não detectável.

Inicialmente são discutidos aspectos relacionados ao risco residual, histórico da implantação dos testes NAT, suas definições principais, a implantação e a atuação da rede de laboratórios testadores. Posteriormente são apresentadas as características do controle de qualidade interno e da avaliação lote a lote do kit NAT. As etapas metodológicas são discutidas em um capítulo (Materiais e Métodos), que descreve inicialmente as etapas comuns aos artigos propostos, com ênfase aos artigos que tratam dos aspectos epidemiológicos do NAT, já que a descrição do método não está completamente descrito nos mesmos. Peculiaridades metodológicas dos manuscritos podem ser observadas na seção que discorre sobre os métodos em cada um deles.

Como requisito do Programa para realização da defesa foi elaborado um artigo que tratou da apresentação de um estudo de caso de hemovigilância, investigado com o técnicas de biologia molecular. Este artigo foi publicado previamente à defesa da Tese, segundo exigência do regimento do Programa, em revista com Qualis B1, no periódico *Transfusion Medicine*.

Os resultados da tese são apresentados no formato de cinco artigos: os três primeiros artigos apresentados tratam dos aspectos epidemiológicos: o primeiro artigo da tese é uma comunicação breve sobre os resultados da implantação do NAT no Brasil, obtido com a coleta de dados nos laboratórios que realizam a testagem das amostras

junto a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH) do Ministério da Saúde. O segundo artigo trata de um estudo epidemiológico sobre a incidência, prevalência e fatores associados, do HIV e HCV nos doadores de sangue da Hemorrede de Santa Catarina e retrata o risco residual associado à transmissão do HIV e HCV com a transfusão. O terceiro artigo mostra a experiência do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina na utilização da plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem de doadores de sangue.

Os últimos dois artigos que compõem os resultados dessa tese tratam dos aspectos epidemiológicos relacionados ao NAT: o quarto artigo versa sobre a estabilidade do RNA das amostras submetidas ao NAT associado à temperatura de armazenamento das amostras, ao tempo entre a coleta e a realização dos testes incluindo também a influência do tempo entre a centrifugação das amostras e o desempenho dos testes. O quinto artigo trata da experiência do laboratório NAT do HEMOSC na produção de controle de qualidade interno e no painel de avaliação de desempenho lote a lote dos kits NAT.

Em observância ao regimento do Programa os artigos não publicados estão em versões na língua portuguesa e aguardaram a avaliação da banca examinadora para serem submetidos a publicação. Posteriormente estes manuscritos obedecerão à formatação de cada periódico selecionado conforme as orientações descritas a serem seguidas pelos autores.

SUMÁRIO

	Página
PARTE I	19
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 Aspectos Epidemiológicos - A Problemática do Risco Residual na Transmissão do HIV e HCV	25
3.2 A Importância do NAT na Triagem de Doadores de Sangue	26
3.3 Histórico da Implantação do NAT no Mundo e no Brasil	29
3.3.1 NAT – O início	29
3.3.2 A implantação do NAT – HIV/HCV na Hemorrede Nacional.	34
3.4 Tecnologias NAT Utilizadas na Triagem de Doadores de Sangue	37
3.5 Características da plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos	39
3.6 Logística na Execução do Nat HIV/HCV	42
3.6.1 <i>Necessidade de Definir os Critérios de Estabilidade das Amostras Submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®</i>	42
3.6.2 <i>Necessidade da Implementação do Controle de Qualidade Interno Positivo e Lote a Lote nos Laboratórios Testadores</i>	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Questões Éticas	54
PARTE II – RESULTADOS	55
ARTIGO I - Soroprevalência, incidência e risco residual dos vírus da imunodeficiência humana e da hepatite C em doadores de sangue no Sul do Brasil entre 2007 e 2013	55
ARTIGO II - Ganho do NAT para o vírus da imunodeficiência humana e hepatite C em doadores de sangue brasileiros: resultados preliminares	75
ARTIGO III - Experiência do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Brasil, na utilização da plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos/FIOCRUZ na a triagem de doadores de sangue.	83
ARTIGO IV - Estudo da estabilidade do RNA viral das	95

amostras de doadores de sangue submetidas ao teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) na plataforma brasileira NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos-FIOCRUZ®.	
ARTIGO V - Avaliação do Desempenho da Plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ na triagem de doadores de sangue: uso de controle de qualidade interno e inspeção lote a lote.	113
III - CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
V - ANEXOS	143
Artigo Publicado	143
Termo de Consentimento do Estudo de Estabilidade	149
Resultado da amplificação do RNA-HIV e RNA-HCV	151

PARTE I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A transfusão de sangue é um procedimento terapêutico essencial aos cuidados de saúde, que salva milhões de vidas todos os anos. A cada segundo, alguém no mundo precisa de componentes sanguíneos como suporte em cirurgias e como coadjuvante no tratamento de anemias severas, complicações da gravidez e no pós-parto e no tratamento do câncer. Já outros pacientes necessitam de transfusões periódicas desde o nascimento, como os portadores de anemias hereditárias e os hemofílicos (WHO, 2008). Para atendimento dessas necessidades de componentes sanguíneos, o objetivo dos serviços de hemoterapia é o de garantir um suprimento de sangue adequado, seguro e efetivo para a população (STRAMER, 2004).

Ao lado das incontestáveis qualidades terapêuticas do sangue, a transmissão de infecções virais (como a hepatite C e a síndrome da imunodeficiência humana adquirida) com a transfusão de produtos e componentes derivados é bem conhecida, sendo considerada como uma possível consequência dessa terapêutica (KLEIN et al., 2010, CANDOTTI e ALLAIN, 2013). Para que um agente infeccioso seja considerado um risco na medicina transfusional, o mesmo deve apresentar uma fase de seu ciclo de vida na corrente sanguínea em um indivíduo, a qual deve ser assintomática, podendo ser curta ou prolongada. O agente infeccioso deve ter a capacidade de sobreviver ou persistir nas condições de armazenamento e de produção dos hemocomponentes e hemoderivados sanguíneos e de causar a infecção quando inoculado por via intravenosa (CANDOTTI e ALLAIN, 2013). Esse caso se enquadram o HIV (vírus da imunodeficiência humana) e o HCV (vírus da hepatite C) além de outros agentes patogênicos como o *Trypanosoma cruzi*, o *Treponema pallidum*, o vírus da hepatite B (HBV), o vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV), dentre outros.

Na tentativa de evitar a transmissão das enfermidades causadas por estes agentes através do sangue, os serviços de hemoterapia realizam testes laboratoriais para a pesquisa de agentes infecciosos em amostras de doadores de sangue. Os testes laboratoriais utilizados são os imunoensaios (STRAMER, 2004), nas suas diferentes apresentações como a técnica de enzaimunoensaio e a de quimioluminescência, que apresentam como particularidade a detecção de anticorpos ou os antígenos contra os vírus com períodos de janela diagnóstica,

relativamente longos. A testagem laboratorial para a pesquisa de agentes virais teve seu início em 1963, com a implantação do teste para a pesquisa do antígeno de superfície “S” do vírus da hepatite B (HBsAg) em amostras sanguíneas de doadores. Já a detecção de marcadores para o vírus da hepatite C (HCV) ocorreu em 1993 no Brasil, e para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorreu entre os anos 1980 e 1990, reduzindo os riscos de infecções transmitidas pelas transfusões aos receptores (DWCYRE, FERNANDO e HOLLAND, 2011).

O tempo de janela diagnóstica é um fator preocupante para a segurança do sangue doado, pois, mesmo com os avanços na área diagnóstica, ainda é possível a transfusão de componentes sanguíneos no período de tempo em que os resultados de todos os testes laboratoriais são negativos. Nesse caso existe a possibilidade de transmissão do agente infeccioso ao receptor durante o ato transfusional ou administração de hemoderivados. Para a pesquisa de anticorpos anti-HCV (anticorpos contra o vírus da hepatite C), quando se utilizam testes de 3ª geração, o período da janela diagnóstica é estimado em 61 dias (54 a 64 dias), segundo estudo publicado por Beer e colaboradores em 2006. Já para os testes utilizados na pesquisa de anticorpos contra o HIV a estimativa da janela diagnóstica é de 22 dias (16 a 38 dias), segundo publicação de Busch e colaboradores, 1995. Para os kits de quarta geração esta janela é menor, devido a pesquisa simultânea do antígeno e do anticorpo. Para o HCV, o uso de testes combinados para o HCV reduz em 34,3 dias a janela quando comparado com a pesquisa de anticorpos (DAWSON, 2007) e para o HIV a janela diagnóstica é de 14 a 15 dias (CORNET e KIRN, 2013).

Ainda que outros fatores possam influenciar a possibilidade de infecção proporcionada pela transfusão como: a presença de cepas virais mutantes, a soroconversão atípica e possíveis erros laboratoriais, atualmente a causa mais frequente de contaminação de receptores se relaciona a ocorrência de janela imunológica ou diagnóstica principalmente para o HIV e HCV, devido ao fato dos imunoenaios utilizados na triagem de doadores de sangue não detectarem os agentes virais no período inicial das infecções agudas (AUBUCHON, BIRKMEYER e BUSH, 1997, STRAMER et al., 2004).

Mesmo com esta possibilidade de transmissão ainda presente, verifica-se que nas últimas décadas houve uma relevante redução no risco (ou chance) de transmissão de doenças infecciosas com a transfusão de sangue, em parte devido à melhoria nos testes de triagem laboratorial utilizados na triagem dos doadores de sangue (BUSCH, 2000, KOSAN et al., 2010). Esta redução está associada aos esforços

dos serviços de hemoterapia em introduzir processos de seleção mais rígidos, utilizados no recrutamento dos candidatos a serem doadores de sangue e componentes, bem como na utilização de métodos laboratoriais de triagem cada vez mais sensíveis (MACHUCA e HEWLETT, 2003; MARESCH et al., 2008).

Dessa forma, uma das possibilidades de aumentar a segurança transfusional e de evitar a contaminação dos receptores de componentes sanguíneos é reduzir o tempo da janela diagnóstica, pela adoção de tecnologias capazes de detectar a presença dos agentes virais, antes do surgimento dos anticorpos. Uma das tecnologias disponíveis é a pesquisa dos ácidos nucléicos de agentes infecciosos utilizando técnicas de biologia molecular, conhecidas como testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAT), introduzidas no final da década de 1990 (VERMEULEN et al., 2011). A tecnologia NAT é constituída por testes qualitativos ou quantitativos *in vitro* cujo objetivo é detectar de forma direta o RNA ou DNA de agentes infecciosos. Na hemoterapia os mais utilizados possibilitam a detecção simultânea do RNA do HIV e o RNA do HCV nas amostras de doadores de sangue (CARDOSO, et al., 1998; STRAMER, et al., 2004; ZOU et al., 2010).

No Brasil a implantação do NAT foi muito recente e ocorreu devido a uma atitude inovadora do Ministério da Saúde, que possibilitou a produção nacional e a distribuição a Hemorrede Pública de um conjunto diagnóstico utilizado para a detecção simultânea do HIV e do HCV. Este produto tem como característica a de ter o seu desenvolvimento realizado com tecnologia nacional, sendo distribuído pelo Ministério da Saúde com a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH) para quatorze centros testadores no Brasil pertencentes à Hemorrede Pública vinculada ao Sistema Único de Saúde - SUS. Este conjunto diagnóstico é produzido seguindo padrões de boas práticas de fabricação e de qualidade por Bio-Manguinhos, uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Ministério da Saúde (MS) cuja atividade é a produção de imunobiológicos, utilizados na prevenção, tratamento e diagnóstico de doenças.

Por se tratar de um teste para diagnóstico, recentemente implantado na rotina dos bancos de sangue, estudos sobre o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® ainda não foram publicados. Durante a sua implantação surgiram muitas dúvidas sobre o ganho em termos de redução do risco associado à transmissão do HIV e HCV com a transfusão, e para isso a necessidade de calcular a prevalência e a incidência desses agentes virais nos doadores. Outra preocupação é com a estabilidade do RNA viral nas amostras coletadas, um fator crítico para

o bom desempenho de qualquer plataforma NAT. Outro ponto importante associado à qualidade desses testes foi a necessidade de implantação do controle de qualidade interno e da avaliação a cada lote dos reagentes que chegam ao laboratório previamente a sua inserção na rotina.

Diante do exposto, justificou-se a necessidade do desenvolvimento de estudos epidemiológicos (mensurar a incidência, prevalência, risco residual, ganho da implantação, desempenho do teste), bem como respostas a questões logísticas (estabilidade do RNA viral e técnicas de controle de qualidade) do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®, cuja implantação teve como objetivo incrementar a segurança dos componentes sanguíneos transfundidos na população catarinense e brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar os aspectos epidemiológicos e logísticos associados à implantação dos testes de amplificação de ácidos nucleicos HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem de doadores de sangue.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Determinar o risco residual, a incidência e a prevalência para o HIV e HCV, entre os doadores de sangue e os fatores associados, no período antes e após a implementação do NAT HIV/HCV na rotina de triagem em bancos de sangue.
- b) Descrever os resultados preliminares da implantação do NAT HIV/HCV na triagem de doadores de sangue da Hemorrede Pública Brasileira.
- c) Verificar os aspectos relacionados à rotina laboratorial, a concordância entre o NAT e os testes sorológicos utilizados, as janelas de detecção obtidas no laboratório NAT do HEMOSC.
- d) Determinar a estabilidade do RNA viral do HCV e do HIV nas amostras de sangue encaminhadas para a realização do NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®, com relação a tempo e temperatura de armazenamento e a influência da centrifugação.
- e) Verificar a reprodutibilidade do CT (*Cycle Threshold*) de amostras de controle de qualidade interno e dos painéis de desempenho lote a lote, produzidos no laboratório NAT do HEMOSC submetidos ao ensaio NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®.

.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

.3.1 Aspectos Epidemiológicos - A Problemática do Risco Residual na Transmissão do HIV e HCV

O primeiro relato de transmissão de doença infecciosa (hepatite B) pelo sangue foi descrito em 1943, porém a testagem das amostras de doadores de sangue para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) teve início apenas em 1969 nos Estados Unidos (DWAYRE et al., 2011). No Brasil, a obrigatoriedade de testagem para sífilis e doença de Chagas teve início em 1943, porém a pesquisa de agentes virais teve início somente no ano de 1975 com a implantação do teste para pesquisa do HBsAg. Em relação ao HIV, a testagem teve início na década de 1980 e do HCV a partir da publicação da Portaria do Ministério da Saúde 1.373 em 1993 (BRASIL, 2003).

Em hemoterapia, uma ferramenta estatística importante para a análise da segurança transfusional é a medida denominada “risco residual”. O risco residual é expresso como a chance de contrair determinada infecção através do sangue transfundido, sendo expressa como “incidência de casos/número de doações analisadas no período”. A incidência é definida como a taxa de casos novos de doadores com resultados reagentes para as doenças transmitidas pelo sangue, em doações subsequentes (ou seja, doações anteriores com resultados não reagentes) ajustadas por pessoas/ano e pelo tempo determinado em literatura correspondente à janela imunológica ou diagnóstica (SCHREIBER et al., 1996).

A janela diagnóstica é o período compreendido entre o momento que se dá a introdução do agente infeccioso no hospedeiro suscetível e o início da detecção dos anticorpos produzidos frente aos antígenos virais ou a detecção desses antígenos. Dessa forma, durante a fase de janela imunológica ou indetecção, um doador poderá ter em seu sangue um número considerável de partículas virais na ausência de marcadores sorológicos e/ou sinais e sintomas de uma infecção em curso, o que poderá ocasionar a contaminação do receptor (SCHREIBER et al., 1996; WILLIAMSON et al., 1996).

Com o objetivo de estimar o risco residual e o ganho potencial da implantação do NAT, ou a capacidade de transmissão de infecções com a transfusão, dados sobre prevalência, incidência e intervalo entre as doações, dados sobre janela de pré-soroconversão ou diagnóstica, painéis de soroconversão e modelos animais podem ser utilizados (ROTH & SEIFRIED, 2001). Pode ainda ser utilizada a taxa de

transmissão de agentes virais nos receptores (SEED et al., 2002).

Estudos realizados no Brasil mostram que a prevalência do HIV em doadores de sangue foi de 0,17% (Hemocentro de São Paulo) no período de 1995 a 2001, com incidência de 25,9 (IC 95%: 18,2–31,1) por 100.000 pessoas-ano em doadores de repetição (BARRETO et al., 2005) e de 26,9 (IC 95%: 18,9-34,9) por 100.000 pessoas-ano em doadores de primeira vez (SABINO et al., 1999). Em Santa Catarina a incidência para o HIV foi calculada na década de 90 como 36 (IC 95%: 13 a 79) por 100.000 pessoas/ano (KUPEK^b, 2001).

Em Santa Catarina, o estudo publicado por Kupek^a em 2001 reporta o risco residual para o vírus HCV com o uso dos testes de pesquisa de anticorpos de 1: 13.721 doações (IC 95% 1: 7.102 a 1:30.820). Este estudo foi realizado com 139.188 doações no período de 1991 a 1999, com dados do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC/Florianópolis. Em 2004, em outra publicação, Kupek estimou o risco residual para transmissão de HIV em Santa Catarina em 1: 48.777 doações no período de 1991 a 2001. Maresch e colaboradores, no período de 1998 a 2002 calcularam o risco residual total de 5,18 (IC 95%: 2,23-9,59) por 100.000 doações e para o HIV de 3,81 (IC 95% 1,56- 6,76) por 100.000 doações, na Hemorrede de Santa Catarina. Esse mesmo estudo o risco de transmissão da hepatite C foi de 1: 19.300 doações (IC 95% 10.400 - 44.800) e para o HIV é de 1: 26.200 (IC 95% 14.800 - 64.100) doações. Spada et al., em 2005 encontraram o risco de residual para transmissão de HIV na região serrana de Santa Catarina estimado em 1:50.000 doadores.

Com a implementação dos testes NAT, associada à pesquisa de antígenos/anticorpos para os vírus HIV e HCV em ensaios sorológicos na triagem dos doadores, espera-se reduzir substancialmente o risco residual de transmissão de agentes patogênicos aos receptores de componentes sanguíneos (VELATI et al., 2008).

.3.2 A Importância do NAT na Triagem de Doadores de Sangue

O objetivo principal da utilização do NAT concebido pelos pesquisadores brasileiros e que está sendo utilizado na Hemorrede Pública do Brasil é a busca na redução do período de janela diagnóstica para o HIV e o HCV. Este período varia para cada um desses agentes virais e diminui com o desenvolvimento de novas gerações de testes de triagem.

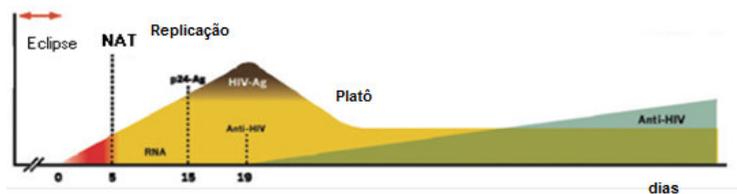
Para se avaliar a redução do período de redução da “janela” torna-se imprescindível o conhecimento da história natural das infecções pelo HIV e HCV. Para ambos os agentes virais, a cinética da resposta do hospedeiro a infecção viral é dividida em três períodos distintos (KLEINMAN et al., 2009):

- Fase de eclipse: representa o estabelecimento inicial da infecção. A replicação do agente é lenta e nem sempre os testes que utilizam técnicas de biologia molecular são capazes de detectar o ácido nucléico;
- Fase de replicação exponencial: esta fase representa a replicação viral rápida, com o estabelecimento da infecção;
- Fase de platô: período em que a carga viral é constante. Esta fase é curta para o HIV e prolongada para o HCV. Alguns indivíduos permanecem nessa fase sem o desenvolvimento de anticorpos detectáveis nos testes sorológicos e são chamados de imunossilenciosos.

As figuras a seguir mostram esquematicamente as etapas: infectividade, viremia e detecção pelos testes NAT e ensaios sorológicos para cada fase das infecções pelo HIV e pelo HCV e a dinâmica da viremia e da produção de anticorpos nas fases de eclipse, replicação e platô. Estudos de soroconversão têm mostrado que a carga viral dobra a cada 0,85 dia para o HIV (FIEBIG et al., 2003) e 0,45 dia para o HCV (GLINN et al., 2005).

Figura 1 – Detecção com o NAT e testes sorológicos para o HIV (A) e o HCV (B), adaptado de KLEINMAN et al., 2009

A. HIV-1



B. HCV



Observa-se, na figura 1-A na infecção pelo HIV, que a fase de eclipse tem duração de cinco dias após o contágio. Já os testes de detecção de anticorpos começam a reagentes somente em torno do 15° ao 19° dias. A detecção do RNA viral pelo NAT passa a ser significativa a partir do quinto dia a partir do início da infecção, quando a fase de replicação exponencial tem seu início. No caso de testes que detectam anticorpos, a detecção ocorre a partir do décimo nono dia, quando a fase de platô para o RNA tem início. Dessa forma o uso de técnicas moleculares, para a detecção do genoma viral tem importância significativa na fase pós-eclipse e início da fase de replicação do HIV (FIEBIG et al., 2003, KLEINMAN et al., 2009).

Em relação ao HCV representado na figura 1-B, há um expressivo ganho na redução da janela diagnóstica, quando o NAT é realizado em comparação testes de pesquisa de anticorpos: em torno do 10° dia após o contágio, o RNA já pode ser detectado e quando os testes de pesquisa de anticorpos são utilizados na triagem de doadores somente após o 65° dia, é possível sua detecção (GLINN et al., 2005, KLEINMAN et al., 2009).

A triagem de doadores de sangue utilizando a metodologia de amplificação de ácidos nucleicos também se aplica a detecção de RNA viral em amostras de indivíduos imunossilenciosos, que não apresentam a produção de anticorpos frente à infecção, porém transmitem os vírus. Não é possível a identificação desses indivíduos somente com a utilização de testes para a pesquisa de anticorpos, havendo a necessidade da utilização dos testes NAT ou testes combinados (4ª geração). O NAT é complementar aos testes sorológicos e não possui a capacidade de substituí-los uma vez que com a progressão da infecção, a carga viral tende a se manter em alguns momentos indetectável para ambas as infecções, e também pela existência de indivíduos controladores de elite (FIEBIG et al., 2003; GLINN et al., 2005; KLEINMAN et al., 2009).

A total garantia de detecção de agentes infecciosos não é proporcionada por nenhum teste laboratorial utilizado no momento, devido ao período do eclipse viral, presente nos ciclos do HIV e HCV. Nesse período não é possível detectar a presença de antígenos, RNA viral e dos anticorpos circulantes, uma vez que o vírus apresenta-se com replicação local intracelular e o organismo ainda não produziu anticorpos para o agente infeccioso (LAPERCHÉ et al., 2003).

3.3 Histórico da Implantação dos Testes NAT no Mundo e no Brasil

3.3.1 NAT – O Início

Em 23 fevereiro de 1994, a empresa *Baxter Healthcare Corporation* retirou do mercado mundial a preparação de imunoglobulina intravenosa “*Gammagard*” após relatos da ocorrência de hepatite C aguda em pacientes tratados com este hemoderivado em dez países (GOMPERTS, 1996). A produção de imunoglobulina não incluía a etapa específica de inativação viral. Em resposta a este incidente, no ano de 1995, nos Estados Unidos o órgão regulador FDA (*Food and Drug Administration*) através do CBER (*Center for Biologics Evaluation and Research*) estabeleceu como critério a realização de testes de pesquisa de HCV-RNA antes da liberação dos lotes de imunoglobulina humana nos quais não foi realizada a etapa de inativação viral. A resposta da Europa nessas mesmas circunstâncias diferiu em um aspecto: o Instituto *Paul Erlich* estabeleceu um critério para o mercado alemão que, somente *pools* de plasma HCV-NAT negativos pudessem ser utilizados na manufatura de imunoglobulina intravenosa que não tivesse a etapa de inativação viral. Dessa forma o NAT foi primeiramente utilizado na triagem de componentes plasmáticos congelados destinados a produção de hemoderivados (GOMPERTS, 1996; FLANAGAN, 1998; BARBARA, 1999; WILLKOMENN et al., 1999).

A indústria europeia de fracionamento de plasma iniciou a utilização da triagem do plasma utilizado como matéria-prima, com a tecnologia NAT na década de 90. O primeiro serviço de hemoterapia a introduzir a testagem com NAT foi o *North Rhine-Westphalia*, na Alemanha em 1997. Nessa época três genomas virais (vírus da hepatite B, da hepatite C e da imunodeficiência humana) já eram testados com a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em um laboratório privado e depois disso com a utilização de uma PCR *in house*

implantou-se a metodologia em um banco de sangue em Frankfurt. Subsequentemente outros países europeus iniciaram o uso do NAT na triagem de doadores (COSTE et al., 2005, CARDOSO et al., 1998, ROTH et al., 2012). Nos Estados Unidos esta implantação ocorreu em 1999 (MACHUCA & HEWLETT, 2003; DWEYRE et al., 2011).

A partir dessa implantação, alguns países da Europa começaram a se preocupar com a utilização do NAT como teste de triagem em componentes lábeis como unidades de plaquetas e hemácias, já pensando na inclusão da pesquisa do HIV RNA e HBV DNA nas amostras de doadores. A relevância na introdução do NAT como teste laboratorial a ser utilizado nas amostras de doadores de sangue foi baseada na busca de uma maior segurança no suprimento de sangue pela detecção de infecções virais agudas na fase de janela e que não são detectados com os testes de triagem de pesquisa de anticorpos (WILLKOMENN et al., 1999 e COSTE et al., 2005).

A implantação começou a ser discutida e alguns dos pontos considerados nessa época eram; tamanho do *pool* e o número de laboratórios necessários para a realização desses testes. No caso do tamanho do *pool*, a indústria estava utilizando *pools* de 480 amostras ou mais e para os componentes lábeis era necessária a realização de *minipools*. Devido ao período curto de validade das unidades de plaquetas (em torno de cinco dias), *pools* menores deveriam ser empregados, a fim de facilitar a busca de amostras positivas entre 48 e 96 amostras. Nessa época não havia a preocupação com a sensibilidade dos testes. O vírus da hepatite C foi primeiramente escolhido para ser pesquisado com as técnicas de biologia molecular nos hemocomponentes, devido à taxa ser mais elevada em alguns países e devido a longa fase de janela diagnóstica que pode ser de 1,5 a 2 meses, quando são utilizados testes de pesquisa de anticorpos anti-HCV (WILKOMENN, 1999). Assim desde o ano de 1997, há uma mobilização para a implantação dos testes NAT na rotina de triagem de doadores de sangue em vários países. O primeiro relato de implantação ocorreu na Alemanha e sucessivamente outros países adotaram a tecnologia na triagem dos doadores (CARDOSO et al., 1998; ROTH et al., 2012).

O ganho (*yield*) obtido com a utilização dos testes NAT para os países que implantaram a tecnologia é variável e está descrito no quadro 1. Este quadro foi construído como resultado do processo de busca de artigos na base de dados PUBMED, utilizando-se os descritores: NAT, HIV, HCV, BLOOD DONORS. Nessa pesquisa foram encontrados 137 artigos, e na leitura dos “abstracts” foram identificados os 30 artigos que

apresentavam dados referentes à implantação do NAT em diversos países.

O primeiro relato do uso do NAT na triagem de doadores de sangue ocorreu em 1998 na Alemanha, (Cardoso et al., 1998). Na análise do quadro, observa-se que o ganho (*yield*) foi variável para cada país sendo mais expressivo para o HCV. A grande maioria dos estudos relata o uso de kits comerciais fabricados pelas empresas Roche ou Novartis/Gen Probe, produzidos nos Estados Unidos (Quadro 1). Alguns países europeus e os Estados Unidos contam com expressivos quantitativos de amostras testadas através do NAT, na casa de muitos milhões de doações. São raros os países que não obtiveram amostras NAT positivas com testes de triagem negativos, o que revela a existência de um ganho em relação a casos de transmissão não ocorridos, como pode ser observado no quadro a seguir.

O uso de amostras testadas de maneira individual tem sido relatado nos estudos publicados nos últimos três anos o que mostra uma tendência no uso de testes individuais, em substituição ao pool, devido a sua maior sensibilidade, principalmente nas áreas de maior prevalência e incidência. Analisando-se os artigos, verificou-se que apenas um estudo brasileiro foi publicado e se referiu à utilização de um teste de biologia molecular produzido *in house* e que utilizava um pequeno quantitativo de amostras procedente de um hospital privado. Nesse estudo brasileiro, somente foram publicados dados referentes às amostras testadas para a pesquisa de RNA-HIV (LEVI et al., 2007).

Quadro 1 – Revisão dos estudos publicados no período 1998 a 2013 na base de pesquisa de artigos - PUBMED, referente ao ganho (*yield*) do NAT nos países onde houve a implantação.

Referência	País	Período do Estudo	HCV NAT+ Anti-HCV-	HIV NAT+ Anti-HIV-	Doações analisadas HCV	Doações analisadas HIV	Fabricante HCV NAT	Fabricante HIV NAT	Tamanho do pool
Cardoso et al., 1998	Alemanha	1997	0	0	331.783	331.783	Roche	<i>In house</i>	96 amostras
Roth et al., 2000	Alemanha	1997-2000	3	1	1.078.940	1.078.940	Roche	<i>In house</i>	96 amostras
Japanese Red Cross, 2000.	Japão	1997-2000	1	0	2.140.207	2.140.207	Kit nacional multiplex	Kit nacional multiplex	500 amostras
Stramer, 2002	Estados Unidos	1999	62	4	16.300.000	12.600.000	Não informado	Não informado	Não informado
Tomono et al., 2002	Japão	2000	25	4	6.805.010	6.805.010	Kit nacional multiplex	Kit nacional multiplex	50 amostras

Roth et al., 2002	Europa Central	1997	6	2	3.600.000	3.600.000	Rojer	<i>In house</i>	96 amostras
Mine et al., 2003	Japão	2000-2002	46	6	16.012.175	16.012.175	Kit nacional multiplex	Kit nacional multiplex	50 amostras
Stramer et al., 2004	Estados Unidos	1999-2002	170	12	37.164.054	37.164.054	Roche	Roche	16-24 amostras
Offergeld et al., 2005	Alemanha	2000-2002	11	5	17.925.610	17.925.610	Roche	Roche	96 amostras
Alvarez et al., 2005	Espanha	1999 - 2003	8	0	3.374.807	3.374.807	Novartis Roche	Novartis Roche	Individual Pool 8 - 48 amostras
Solda et al., 2005	Reino Unido	1999-2002	0	0	431.748	431.748	Novartis	Novartis	Individual
Velati et al., 2005	Itália	2001-2003	12	4	3.894.894	2.186.468	Roche	Roche	Não informado
Pillonel et al., 2005	França	2001-2003	3	2	6.140.000	6.140.000	Roche	Roche	Não informado
O'Riordan et al., 2005	Escócia e Irlanda do Norte	1999-2004	0	0	861.967	431.748	Roche	Roche	8 amostras
O'Brien et al., 2007	Canadá	2001-2005	2	1	4.140.862	4.140.862	Roche	Roche	24 amostras
Levi et al., 2007	Brasil	2001-2006	NR	1	NR	102.469	<i>In house</i>	<i>In house</i>	24 amostras
Shan et al., 2007	China	2006-2008	3	0	89.647	89.647	Roche	Roche	16 amostras
Sgourou et al., 2007	Grécia	2005-2007	8	9	38.284	38.284	Roche	Roche	Individual
Makroo et al., 2008	Índia	2004-2005	1	2	12.240	12.240	Roche	Roche	Individual
Hourfar et al., 2008	Alemanha	1997-2005	23	7	31.324.371	31.324.371	Roche	Roche	96 amostras
Velati et al., 2008	Itália	2001-2006	27	14	10.776.288	7.932.430	Roche	Roche	Individual
Vermeleun, et al., 2009	África do Sul	2005	1	16	732.250	732.250	Novartis	Novartis	Individual
Phikulsold et al., 2009	Tailândia	2007	0	2	244.313	244.313	Novartis	Novartis	Individual Pool 6 amostras
			1	3	242.363	242.363	Roche	Roche	
Zou et al., 2010	EUA	1999 - 2008	244	32	66.000.000	66.000.000	Não informado	Não informado	Não informado
Kosan et al., 2010	Turquia	2007-2008	2	0	18.200	18.200	Novartis	Novartis	Individual
Al Shaerat al, 2012	Emirados Árabes	2004-2009	0	0	59.283	59.283	Não informado	Não informado	Não informado
Kalibatas & Kalibatiene, 2013	Lituânia	2005-2010	64	0	300.775	300.775	Roche	Roche	Individual
Pathak et al., 2013	Índia	2010-2012	37	1	73.898	73.898	Roche	Roche	Individual

Estudo realizado por ROTH e colaboradores e publicado em 2012, mostra o risco residual a cada milhão de doações, estimado para os países que adotaram a tecnologia NAT na triagem de doadores de sangue. Esse estudo é possível verificar que o cálculo do risco residual bruto (não ajustado pela janela diagnóstica e por pessoas/ano) é demonstrado por milhão de doações, indicando um risco muito reduzido esses países. Esse estudo os dados obtidos na América do Sul revelam o quantitativo de amostras testadas na rotina de doadores somente em serviços privados do Brasil (ROTH et al., 2012). Os dados obtidos esse estudo são observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Doações testadas e amostras detectadas como positivas com a utilização dos testes NAT, estratificadas por continente, no período de 1998 a 2008 (adaptado de ROTH et al., 2012).

Continente	Vírus	Doações testadas desde a implantação do NAT	NAT detectado (janela)	NAT /milhão de doações
África	HIV	2.202.295	81	36,78
	HCV	2.202.295	4	1,82
Ásia/ Pacífico	HIV	71.458.330	44	0,62
	HCV	71.458.330	169	2,37
Europa	HIV	110.860.111	73	0,66
	HCV	139.474.595	206	1,48
América do Norte	HIV	87.652.586	45	0,51
	HCV	89.652.687	299	3,34
América do Sul	HIV	347.374	1	2,88
	HCV	408.167	2	4,9
Total	HIV	272.520.696	244	0,9
	HCV	303.196.074	680	2,24

3.3.2 A Implantação do NAT – HIV/HCV na Hemorrede Nacional.

O Ministério da Saúde vem buscando, desde 2002 a utilização da tecnologia NAT na triagem do sangue doado na Hemorrede Pública Brasileira. Em fevereiro de 2002, surgiu a primeira portaria ministerial (Portaria 262/GM de 05 de fevereiro de 2002) que tornava obrigatório, no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos serviços de hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e nos serviços exclusivamente privados, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos - NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores (BRASIL, 2002^a). Essa portaria foi bastante polêmica, pois o país não estava preparado para a implantação da nova tecnologia, visto o elevado valor dos insumos diagnósticos, a falta de pessoal capacitado e a infraestrutura deficitária para que a tecnologia se tornasse usual. Esse documento já estava prevista a realização do NAT em modalidade de centralização, na qual seriam credenciados laboratórios a serem instalados em cada macrorregião brasileira.

Como no período de seis meses não foi possível a implantação, a Portaria GM/MS 1407 de 01 de agosto de 2002, prorrogou o prazo para mais seis meses (BRASIL, 2002^b). A Portaria nº 79 de 31 de janeiro de 2003, (BRASIL, 2003) substituiu a Portaria 1407, estabelecendo prazo diferente para a implantação. Devido as dificuldades de implantação existentes, o Ministério da Saúde observa a impossibilidade da implantação imediata e, na Portaria GM/112 em 29 de janeiro de 2004, determina que a mesma seja gradativa, não estabelecendo novo prazo para que a tecnologia fosse colocada em prática (BRASIL, 2004).

Segundo a Portaria GM/112 (BRASIL, 2004), os estudos desenvolvidos pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, no ano de 2003, mostraram a necessidade de se aplicar os recursos públicos com maior efetividade, tendo em vista o alto custo da implantação da metodologia para a Saúde Pública no Brasil. De acordo com a mesma Portaria, a introdução de novos métodos de triagem laboratorial do sangue implica na revisão da atual rotina laboratorial nos Serviços de Hemoterapia, não sendo possível a implantação simultânea e imediata dos testes NAT em todos os Serviços de Hemoterapia. As características sanitárias e epidemiológicas são variáveis nas diversas regiões do país, assim como as condições de transporte e as necessidades de abastecimento, devendo todas elas ser respeitadas (BRASIL, 2004).

Devido às questões apresentadas, além do alto custo da implantação dessa nova tecnologia, a Gerência Geral de Sangue, Tecidos e Órgãos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (GGSTO/ANVISA), por meio do ofício 519/GGSTO de 09 de junho de 2003, realizou consulta a Bio-Manguinhos – subárea de produção de reativos, vacinas e imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz – RJ, sobre a possibilidade de desenvolver uma tecnologia nacional para a produção dos testes NAT, atendendo aos requisitos apresentados pelo Ministério da Saúde na Portaria 112. Esta iniciativa recebeu o apoio da antiga Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde CPNSH/MS (atual CGSH/MS – Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde) e da ANVISA e com suporte também da recém-fundada HEMOBRÁS (Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia) responsável pelo fracionamento do plasma no Brasil (CGSH, 2009).

O início do desenvolvimento da plataforma NAT brasileira ocorreu devido às ações conjuntas do Departamento de Reativos de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, juntamente com o Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e o Instituto de Biotecnologia do Paraná (IBMP). Uma equipe formada por virologistas e biólogos moleculares destas instituições desenvolveu o kit diagnóstico e especificou os equipamentos necessários para a sua realização. Posteriormente esse produto, validado nos laboratórios de pesquisa, necessitava ser testado em um serviço de hemoterapia. Para esta finalidade, o Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC foi escolhido, devido a algumas características peculiares da instituição: informatização dos processos, centralização da triagem sorológica em um único laboratório situado em Florianópolis, devido a apresentar área física dedicada para o laboratório de biologia molecular e também pelas características epidemiológicas moleculares do HIV e do HCV encontrados no estado (CGSH, 2009).

O estudo piloto possibilitou a implantação de melhorias para utilização do kit e da plataforma NAT. Em etapa posterior, no Estudo Multicêntrico, ocorrido entre os anos de 2010 e 2011, que objetivou a avaliação do desempenho do NAT de Bio-Manguinhos, na rotina de trabalho dos hemocentros de Santa Catarina (HEMOSC), Pernambuco (HEMOPE), Rio de Janeiro (HEMORIO), Fundação Pró-Sangue de São Paulo (FPS), estes identificados como sítios testadores do NAT (SIT-NAT). Também participaram dessa etapa os hemocentros do Rio Grande do Sul (HEMORGS), Rio Grande do Norte (HEMONORTE), Paraíba (HEMOIBA), Espírito Santo (HEMOES) e Hemonúcleo de Santos

(HEMOSantos), como unidades referenciadoras e coletoras de amostras (respectivamente, URA e UCA). O estudo foi finalizado com 219.791 amostras (CGSH, 2012).

Em dezembro de 2010, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ obteve o registro do kit NAT aprovado pelo órgão regulador - ANVISA, sob o número 80142170025, possibilitando dessa forma a efetiva implantação do NAT nos serviços de hemoterapia públicos brasileiros. O Ministério da Saúde realizou um investimento de dois milhões de reais na produção de insumos na planta de produção construída no Instituto de Biotecnologia do Paraná (CGSH, 2012).

Após a finalização dos estudos, a rotina do NAT nos SIT-NAT continuou a ser executada, sendo implantadas plataformas nos hemocentros de Minas Gerais (HEMOMINAS), de Campinas (Hemocentro da UNICAMP) e da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB). Segundo dados não publicados da CGSH, até ao final de 2011 já haviam sido testadas na rede pública de serviços de hemoterapia mais 600.000 amostras de sangue de doadores com o NAT brasileiro. Em 2012 este total foi de aproximadamente 1.530.000 amostras (CGSH, 2012). A finalização da etapa de implantação ocorreu no início de 2013.

A instalação de quatorze Sítios Testadores do NAT (SIT-NAT), foi realizada por Bio-Manguinhos, obedecendo aos critérios a seguir relacionados, determinados pelo grupo gestor do projeto NAT brasileiro (EVANGELISTA & MELO, 2012):

- a) Expressivo quantitativo de amostras testadas em sua rede de Serviços de Hemoterapia;
- b) Maior estrutura da rede de serviços públicos no estado;
- c) Melhor logística e organização, principalmente em relação à centralização dos testes sorológicos no Hemocentro Coordenador.

Esses critérios foram escolhidos, visando a economia de recursos financeiros e o melhor aproveitamento dos *kits* produzidos por Bio-Manguinhos, já que os conjuntos de reagentes foram desenhados para a detecção de 552 amostras pelo “kit” composto por 96 reações, sendo que quatro reações são destinadas aos controles do fabricante e 92 reações sendo utilizadas para as amostras dos doadores (pool de seis amostras).

Caso o quantitativo de amostras testadas diariamente em um laboratório fosse inferior a este número, haveria o desperdício de *kits*, tornando inviável o custeio dos testes. Para a adequação da área física dos laboratórios, houve o investimento por parte do Ministério da Saúde na ordem de R\$ 590.000,00 (CGSH, 2013, dados não publicados).

A logística deveria permitir o envio de amostras de outros

estados em tempo hábil para a testagem e liberação dos resultados, sem prejudicar o fornecimento de sangue e hemocomponentes, e das demais atividades dos serviços de hemoterapia. Assim, a proposta logística ideal foi a de centralização da testagem NAT (EVANGELISTA & MELO, 2012).

Segundo dados não publicados pela Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (CGSH/MS), até o final de 2012 foram investidos pelo governo brasileiro R\$ 35.500.000,00 na implantação das plataformas, no desenvolvimento do projeto e na testagem das amostras (CGSH, 2012).

A instalação das plataformas NAT na Hemorrede Nacional ampliou a rede de cobertura para realização dos testes, objetivando que 100% das bolsas de sangue oriundas de doação voluntária nos serviços de hemoterapia públicos e privados contratados pelo SUS sejam testadas pela metodologia do NAT brasileiro, diminuindo assim o risco de transmissão do HIV e do HCV por transfusões de sangue (EVANGELISTA & MELO, 2012).

Finalmente, o Ministério da Saúde publicou a Portaria 2712 de 12 de Novembro de 2013, que redefine o regulamento técnico dos procedimentos hemoterápicos, na qual o NAT HIV e HCV tornou-se teste obrigatório a ser realizado em todas as amostras de doadores de sangue coletado no país (BRASIL, 2013).

É importante destacar os benefícios que o projeto NAT nacional trouxe para o país, dentre os quais: o avanço tecnológico - principalmente na área de biologia molecular e de desenvolvimento de novos produtos para diagnóstico, e a possibilidade de significativa redução dos custos que possibilitou a utilização dos testes NAT HIV/HCV na Hemorrede Pública Brasileira.

3.4 Tecnologias NAT utilizadas na triagem de doadores de sangue

No ano 2003, o valor cobrado pelos produtores internacionais de kits NAT era de aproximadamente US\$ 30,00 (trinta dólares) por amostra de bolsa de sangue testada (JACKSON et al., 2003). Esse fato inviabilizou a sua implementação no Brasil nos anos de 2002 a 2004. O elevado custo foi um dos motivos que gerou a demanda de um desenvolvimento nacional (kit NAT HIV/HCV-Brasileiro, produzido por Bio-Manguinhos) que fosse viável para a realidade da política pública nacional. O produto deveria suprir a demanda brasileira, agregando desenvolvimento e capacitação tecnológica, inovação e nacionalização de insumos. Este desenvolvimento possibilitou a produção de insumos

pelo custo atual de US\$ 4,30 (quatro dólares e trinta centavos de dólar) por amostra de bolsa de sangue, quando são testadas 552 amostras (BRASIL, 2013).

Atualmente existem três produtos NAT *multiplex* com registros aprovados pelo Ministério da Saúde do Brasil e que podem ser utilizados na triagem de doadores (Quadro 2). Dois deles são kits produzidos por empresas multinacionais e o outro é o kit NAT HIV/HCV produzido pela empresa nacional Bio-Manguinhos. O kit NAT fabricado pela empresa Gen-Probe (Novartis) utiliza a metodologia TMA (amplificação mediada por transcrição) e o produzido e comercializado pela empresa Roche utiliza a tecnologia PCR-RT (reação em cadeia da polimerase em tempo real) e ambos têm como características: a utilização de amostras em *pool* ou individuais, a pesquisa simultânea do genoma do HCV, HBV e HIV e do controle interno da reação e os resultados dos testes de triagem não serem discriminatórios, ou seja, há a necessidade de kits específicos para cada agente viral no caso de genoma detectável. A plataforma *Tigris* disponibilizada pela empresa Gen Probe-Novartis tem como vantagem uma maior automação.

Por sua vez, o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® apresenta-se em uma plataforma semi-automatizada, e tem como vantagem ser um kit *multiplex* discriminatório, sendo possível identificar o agente viral (HIV ou HCV), além do controle interno da reação e que utiliza como metodologia a PCR-RT com uma grande capacidade de trabalho (dois operadores capacitados podem realizar a testagem de 1.104 amostras em um turno de trabalho de 8 horas).

Os três fabricantes utilizam equipamentos que permitem a realização das técnicas de maneira semi-automatizada ou automatizada, o que é fundamental na triagem de doadores de sangue, devido à necessidade de testagem de um grande número de amostras nas rotinas. A plataforma *Tigris*® (Gen Probe-Novartis) é a única que pode ser considerada um sistema totalmente automatizado.

Quadro 2 – Kits comerciais NAT disponíveis com registro aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil.

Fabricante/País	Método de testagem	Nome Comercial	Registro no Ministério da Saúde	Sistema de testagem Individual ou <i>pool</i>
Gen-Probe Inc. Estados Unidos	TMA – transcrição mediada por amplificação	Procleix Ultrio Assay® HIV/HBV/HCV	10162410461	Amostras individuais <i>Pool</i> de tamanho variável
Roche Molecular Systems Inc. Estados Unidos	PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real	Cobas S201 TaqScreen MPX® HIV/HBV/HCV	10287411019	<i>Pool</i> de amostras (6) Amostras individuais
Fundação Oswaldo Cruz Brasil	PCR-RT – reação em cadeia de polimerase em tempo real	NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®	80142170025	<i>Pool</i> de amostras (6) Amostras individuais

As informações referentes aos produtos aprovados no Brasil foram obtidas do site da ANVISA, com o consulta ao banco de dados disponível para a consulta: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta_produto_detalle.asp.

3.5 Características da Plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®

Segundo as informações do manual do fabricante do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos (DIACM, 2012), o ensaio consiste na preparação de um *pool* ou conjunto de seis amostras juntamente com uma partícula calibradora biossegura, a extração automatizada de ácidos nucleicos e a sua purificação.

A partícula calibradora adicionada ao *pool* de amostras participa de todas as etapas do processo de testagem. Trata-se de um vírus HIV/HCV mimético, biosseguro que exerce a função de controlar as condições ideais da reação, funcionando como um controle intra-ensaio. Este calibrador interno possui mutações genômicas, o que o diferencia estruturalmente das características comuns do vírus selvagem tornando-o não infeccioso.

Na produção da partícula calibradora foi utilizado o plasmídeo NL4-3 o qual foi integrado ao genoma do HIV para a realização de

etapas de mutagênese: deleções do genoma com a inserção de um nucleotídeo no gene do envelope, o que causou alteração na fase de leitura. Assim houve a inativação do gene do envelope devido a não expressão das proteínas gp 41 e gp 120. A mutação é descrita como Z6Δnef, + Tgene env/HIV, gen int/HIV mutado.

Na produção do controle positivo foram realizadas primeiramente mutagêneses sítio dirigidas no genoma do HIV semelhantes as da partícula calibradora, porém houve a inserção da região 5'UTR do HCV no gene *nef* (Z6Δ5'UTR/HCV, + T gene env/HIV).

A obtenção dos vírus mutantes que são utilizados no kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® foi realizada através da utilização do isolado Z2Z6 (HIV-1, subtipo D) com genoma completo. Foi realizada a inserção do genoma Z2Z6 no plasmídeo PNL4-3. Os plasmídeos foram introduzidos em células bacterianas que por sua vez foram submetidas a cultura na qual milhões de bactérias foram produzidas. A partir da lise das bactérias, no sobrenadante do líquido de cultura são obtidos milhões de cópias do controle e da partícula calibradora.

A extração e purificação do RNA das amostras de doadores ocorrem através da lise dos RNA virais através do aquecimento das amostras do pool de doadores com a utilização de tampão, carreador de RNA e protease. Posteriormente ocorre a pipetagem do lisado em uma placa de coluna de sílica, posteriormente ocorre a lavagem do produto que não sofreu interação com a sílica e a eluição da amostra (60µL).

Os alvos genômicos do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® são: para o HIV a região *integrase* e para o HCV a região 5'UTR. Estas regiões foram escolhidas devido a serem muito conservadas com menor risco de perda da sensibilidade devido a variantes virais (genótipos e subtipos).

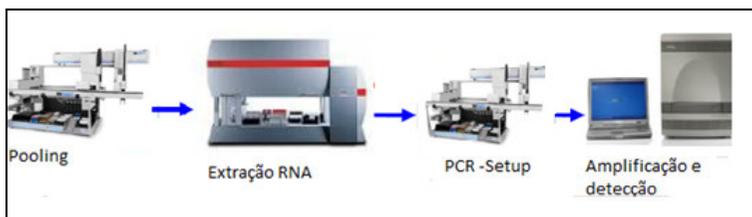
O material genético é amplificado quando reage com sondas marcadas (Taq-Man® Chemistry) com fluoróforos específicos: VIC para o HIV, FAM para o HCV e DYE3 para a partícula calibradora. O monitoramento do progresso da PCR ocorre à medida que ela acontece, ou seja, em tempo real com a leitura das intensidades da fluorescência a cada ciclo. As intensidades de fluorescência geradas são proporcionais ao número de *amplicons* (produtos de amplificação) gerados.

A plataforma NAT é constituída por três equipamentos integrados, que realizam etapas distintas na execução do teste, que estão descritos na figura 2.

- a) Preparo do *pool*: Janus® (Perkin Elmer);
- b) Extração e purificação do ácido nucléico: Biorobot MDX ® (Qiagen);
- c) Preparação e pipetagem da reação de PCR: Janus® (Perkin Elmer);

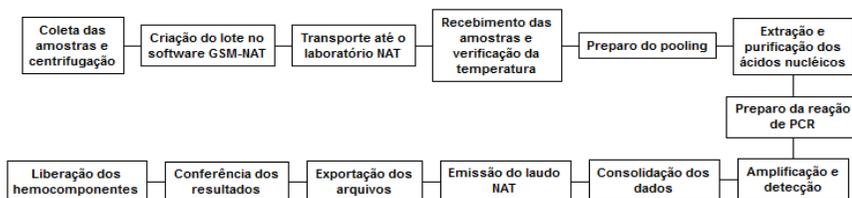
- d) Amplificação e detecção: termociclador ABI 7500® (Life Technologies);
 e) Processamento de dados e resultados: Janus® (Perkin Elmer).

Figura 2 – Equipamentos da Plataforma NAT e Etapas de realização dos testes NAT:



O tempo de execução dos testes no laboratório executor é de aproximadamente 8 horas e 30 minutos. Este é o tempo médio para a realização de 552 amostras (equivalente a 92 *pools* de seis amostras). O esquema abaixo demonstra de maneira sucinta o processo de realização do NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® nos Sítios Testadores das amostras.

Figura 3: Esquema de realização dos testes NAT na Plataforma Brasileira (CGSH, 2012).



A equipe de tecnologia da informação da CGSH, juntamente com o DATASUS do Ministério da Saúde desenvolveram o software gerenciador multicêntrico (GMS-NAT) na plataforma web, o que permite a comunicação de amostras encaminhadas pelas URAs ou UCAs com o lotes diários de envio ao SIT-NAT. O acesso a este site é restrito e a autorização de acesso somente é disponibilizada pela equipe de tecnologia da informação da CGSH.

3.6 Logística na Execução do NAT HIV/HCV

A logística associada ao NAT compreende a definição dos critérios de estabilidade das amostras e a utilização de controles de qualidade internos e lote a lote.

3.6.1 Necessidade de Definir os Critérios de Estabilidade das Amostras Submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®

Os kits NAT e as plataformas são disponibilizados aos Centros Executores constituídos por Unidades Hemoterápicas ligadas a Hemorrede Pública, como o objetivo de realizar a testagem das unidades de sangue e componentes transfundidas em pacientes usuários do Sistema Único de Saúde na Hemorrede Pública e nos serviços de hemoterapia contratados pelo SUS.

Devido ao elevado custo da implantação da tecnologia NAT, a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, optou por instalar as plataformas NAT em apenas quatorze sítios testadores no Brasil, definidos estrategicamente em algumas capitais e cidades, de acordo com número de amostras testadas/dia. Devido ao fato dos testes serem realizados em laboratórios centralizados, há a necessidade de enviar as amostras diariamente para os Sítios testadores.

O tempo de deslocamento até cada centro é variável, dependendo da distância entre o Hemocentro Executor em relação aos Hemocentros que encaminharão as amostras. Segundo definição da CGSH, a distribuição da rede NAT está descrita no Quadro 3, juntamente com a data de início da implantação da testagem das amostras. O estado da Paraíba não participa da rede de laboratórios NAT do Ministério da Saúde, devido a uma decisão da Secretaria Estadual de Saúde e do Hemocentro da Paraíba (HEMOIBA).

Quadro 3 – Distribuição da rede NAT no Hemorrede Pública Brasileira e ano de implantação da testagem:

SÍTIO TESTADOR	ESTADOS REFERENCIADORES DE AMOSTRAS	ANO DA IMPLANTAÇÃO
Florianópolis - Santa Catarina	Santa Catarina e Rio Grande do Sul	2010
Brasília - Distrito Federal	Brasília, Goiás e Tocantins	2011
Recife - Pernambuco	Rio Grande do Norte	2010
Rio de Janeiro - Rio de Janeiro	Rio de Janeiro e Espírito Santo	2010
Pró-Sangue – São Paulo	São Paulo	2010
Belo Horizonte - Minas Gerais	Minas Gerais	2011
Manaus - Amazonas	Amazonas, Roraima, Rondônia e Acre	2011
Belém - Pará	Pará, Piauí, Maranhão e Alagoas	2011
Campinas – São Paulo	São Paulo	2011
Ribeirão Preto – São Paulo	São Paulo	2012
Curitiba - Paraná	Paraná	2012
Cuiabá - Mato Grosso do Sul	Mato Grosso do Sul e Mato Grosso	2012
Salvador - Bahia	Bahia e Sergipe	2013

Devido às distâncias geográficas entre os estados e a complexidade da logística do transporte das amostras dos centros coletores até os sítios testadores, existe uma grande preocupação com a qualidade das amostras clínicas destinadas a testagem na plataforma NAT brasileira (fase pré-analítica).

A fase pré-analítica que engloba o tempo decorrente entre a coleta e a realização dos testes, bem como a temperatura de

armazenamento das amostras são fatores críticos para o sucesso dos testes de amplificação de ácidos nucleicos. Isto significa dizer que a integridade das amostras é um fator chave para a qualidade dos testes realizados no sangue doado (JOSE et al., 2005).

A manipulação, transporte e condições de estocagem das amostras clínicas são fatores que conhecidamente influenciam a estabilidade dos ácidos nucleicos virais. A degradação do RNA viral durante a rotina de processamento, estocagem e centrifugação pode causar falência na detecção (LEE et al, 2002). As amostras destinadas ao NAT na Hemorrede Pública são coletadas em tubos com gel separador *Vacutainer* PPT-K® (*Plasma Preparation Tube*), fabricados pela Becton-Dickson, e fornecidos pela FIOCRUZ a todos os centros coletadores (URA e UCA) de amostras e aos hemocentros que realizam o NAT. Após a coleta as amostras devem ser centrifugadas o mais brevemente possível, sendo as amostras armazenadas em refrigerador a temperatura de 2 a 8°C. Segundo as instruções do fabricante, a estabilidade dessas amostras está garantida até 72 horas após a coleta, nessas condições de estocagem. Para a realização dos testes em tempo superior, o fabricante recomenda que ocorra a retirada do plasma do tubo. Sendo a realização do NAT obrigatória no tubo primário, não é possível a separação do plasma e o posterior congelamento, para que os testes sejam realizados em tempo superior ao preconizado pelo fabricante. Analisando-se a rotina dos serviços de hemoterapia, não é possível constatar se estas condições ideias de armazenamento, centrifugação são cumpridas satisfatoriamente. Por isso a necessidade de validação do tempo de armazenamento dos tubos antes da realização dos testes.

Em condições normais, os serviços de hemoterapia necessitam realizar coletas externas as suas unidades, com o objetivo de facilitar o acesso aos doadores e possibilitar um incremento no estoque de componentes sanguíneos ofertados à população. Nessas coletas, as amostras não são centrifugadas imediatamente, sendo que este procedimento pode ocorrer em 24 horas após a coleta.

Durante essas coletas, a temperatura das amostras pode chegar a 29°C, conforme monitoramento realizado no Hemocentro de Florianópolis durante o período de verão, pela equipe do laboratório de sorologia/NAT. Com a utilização do software de monitoramento de temperatura *Kooltrak*® (Anexo III). Outro problema enfrentado é relacionado ao tempo entre a coleta e a execução dos testes. Devido a problemas como: quebra de equipamentos, dificuldades no transporte, as

amostras podem chegar ao sítio testador e serem submetidas ao NAT em período de até 120 horas após a coleta. Dessa forma, os fatores relacionados à temperatura de armazenamento, ao tempo entre a coleta e à realização dos testes devem ser estudados para garantir a qualidade dos resultados das amostras testadas na metodologia NAT.

3.6.2 Necessidade da Implementação do Controle de Qualidade Interno Positivo e Lote a Lote nos Laboratórios Testadores

A adaptação das técnicas de controle de qualidade da indústria, introduzida em 1950 por Levey-Jennings baseada na teoria de Shewhart deu início à utilização do *pool* de plasma congelado para controle de ensaios no laboratório clínico, conhecido hoje como controle interno. Nesse momento, foi aplicado o tratamento estatístico das dosagens em replicatas para definir os limites aceitáveis utilizando dois desvios padrões. Pouco tempo depois, Hery e Segalove utilizaram limites baseados em avaliações estatísticas em longo prazo, passando a aplicar três desvios como limite no gráfico de Levey-Jennings. Em 1977, Westgard e o grupo Uppsala apontaram que corridas estáveis poderiam ser rejeitadas sem necessidade. Então, em 1979, a teoria foi completamente esclarecida com a aplicação das funções-poder e foram adotadas as regras de Westgard (CAMARINHA et al., 2011).

O controle interno é realizado em conjunto com a rotina de análise de amostras de doadores de sangue e de pacientes, para validar os resultados produzidos após identificar que o sistema analítico está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos, especialmente a precisão do processo (reprodutibilidade). Para a sua aplicação dois pontos-chaves precisam ser analisados: o primeiro é a interpretação de dados de controle que deve ser baseada em procedimentos pré-definidos, critérios objetivos e em princípios estatísticos; e o segundo são os resultados das análises do controle que devem servir como indicadores do desempenho do sistema analítico e para identificar os erros associados com os resultados individuais. O uso de controle de qualidade interno, com concentração conhecida é responsável pelo monitoramento frequente da reprodutibilidade da fase analítica. O propósito do seu uso é o de manter a variabilidade inerente ao processo de testagem sob controle, identificando possíveis desvios para a eliminação das causas (CAMARINHA et al., 2011).

O tratamento dado ao controle de qualidade interno utilizado no NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® é de caráter quantitativo, apesar do

teste se apresentar como qualitativo, sendo que a obrigatoriedade na utilização de controles a cada rotina ocorre tanto para laboratórios clínicos (BRASIL, 2005), como para os laboratórios de triagem para doenças transmissíveis em hemoterapia que utilizam a metodologia NAT (BRASIL, 2013).

A Portaria nº 2712 de 13 de novembro de 2013 (BRASIL, 2013) inclui a utilização do controle de qualidade interno positivo para o NAT com a finalidade de evidenciar a perda da sensibilidade dos ensaios, identificar variações lote a lote/remessa, detectar erros aleatórios ou sistemáticos, dentre outros.

A Resolução RDC/ANVISA nº 302 de 13 de outubro de 2005 (BRASIL, 2005) recomenda o uso de controles comerciais, sempre que possível, porém no Brasil inexistem painéis de controle comerciais internos para o NAT. Dessa forma torna-se necessário que os laboratórios preparem o seu próprio controle, com a seleção de amostras com resultados conhecidos para HIV e HCV, bem como amostras negativas. As amostras controle a serem utilizadas na rotina, devem possuir as mesmas características das amostras a serem testadas.

Na triagem sorológica o controle fornecido pelo fabricante deve ser utilizado somente como critério de interpretação dos resultados das amostras e para validar o ensaio. Esse controle não deve ser utilizado para monitorar a variação lote a lote por, na maioria das vezes, apresentar alta reatividade e não permitir a detecção de erros pequenos na fase mais crítica do processo, em outras palavras, próximo ao valor de corte da técnica (FERREIRA et al., 1998).

Segundo Petersen et al (1996), o preparo de amostras a serem utilizadas para o controle de qualidade, requer que o laboratório realize uma seleção adequada das amostras, obtenha valores dentro do intervalo analítico, contendo valores de decisão e representativos da rotina, proceda a sua estabilização, eliminação e monitoração de interferentes e armazenamento adequado (para evitar precipitação, turbidez e alteração de concentração). O laboratório deve planejar a produção do controle interno em quantidade para atender a um bom período de tempo e que ocorra a estabilidade dos lotes de controle produzidos.

Em relação a produção do controle interno positivo e de lote a lote do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®, a Portaria 2712 de 12 de novembro de 2013 determina que o controle pode ser obtido com o diluições seriadas de plasma com resultados sorológicos e de NAT positivos para os marcadores empregados na detecção. Cabe ao

laboratório definir o valor de corte para o controle, considerando a diluição utilizada.

Segundo Camarinha et al., 2011, a etapa de planejamento de preparação do controle é baseada no desempenho do processo e na qualidade requerida para cada ensaio, com definição de quais regras de Westgard utilizar, seleção apropriada de materiais de controle e número de amostras do controle. Esta etapa consiste em estabelecer uma sistemática para selecionar o controle mais apropriado para o ensaio, baseado na avaliação do processo (equipamento, reagente etc.). Nesse planejamento devem-se determinar quais as melhores regras de decisão devem ser utilizadas e qual o número de níveis de controle e a frequência de utilização do controle.

No controle de qualidade interno aplicado no NAT, os resultados obtidos após a sua caracterização, devem passar por processo de valoração, no qual 20 determinações são necessárias para assim poder confeccionar o gráfico de controle, com o cálculo da média e do desvio padrão, da mesma forma que é realizado com os controles internos aplicados aos marcadores sorológicos (CURA & WENDEL 1994; FERREIRA et al., 1998).

Posteriormente, os resultados obtidos nas rotinas diárias podem ser plotados em gráficos de controle. Para rejeitar uma corrida NAT, pode-se realizar uma análise gráfica muito simples baseada no critério de aplicação de regra única (há rejeição quando uma medida de controle ultrapassa o intervalo de média $\pm 2DP$). Nesse caso a rotina deverá ser repetida. Para isso o gráfico deve conter a média esperada e o cálculo do desvio padrão obtido na caracterização (CURA & WENDEL 1994; FERREIRA et al., 1998). O monitoramento dos resultados do controle de qualidade interno positivo deve ser diário e apresentar critérios de validação quantitativos (baseados no CT). O coeficiente de variação (CV) para os resultados do controle interno positivo deve ser inferior a 10% (Brasil, 2013). Uma prática fundamental é a análise imediata do dado de controle com a utilização da representação gráfica, que naturalmente já demonstra o desempenho do processo ao longo do tempo e pode conduzir naturalmente à percepção de aumento de variação e surgimento de desvios (CAMARINHA et al., 2011).

Segundo portaria 2712 (BRASIL, 2013), os laboratórios que realizam a triagem de doenças infecciosas através do NAT em amostras de doadores de sangue devem realizar a inspeção dos conjuntos diagnósticos a cada lote for entregue pelo fornecedor. Cabe ao laboratório avaliar o aspecto dos reagentes, a integridade da embalagem,

bula, nome dos reagentes, condições de armazenamento e transporte, lote e validade e ainda utilizar amostras com genoma detectável ou não detectável antes da inserção desse determinado lote de produto na rotina.

Dessa forma, com a utilização de controles internos positivos e de controle lote a lote obtêm-se uma importante ferramenta na rotina do laboratório. Em uso conjunto com a participação em programas de ensaio de proficiência, promove uma adequada monitoração e controle da fase analítica, o que possibilita uma maior qualidade dos resultados da triagem de doadores gerados diariamente pelo laboratório, garantindo desta forma uma maior segurança dos produtos a serem transfundidos. (CAMARINHA et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Estão descritos nesse capítulo aspectos relativos à coleta de dados para a elaboração dos artigos referentes às questões epidemiológicas relacionadas à implantação do NAT.

a) População e amostra:

Trata-se de um estudo populacional, os dados foram obtidos em duas fontes de dados diferentes. A primeira parte da coleta de dados corresponde aos doadores de sangue que doaram no período de janeiro 2008 a junho de 2013 na Hemorrede de Santa Catarina. Este período foi escolhido devido ao fato da Hemorrede (composta pelos Hemocentros de Florianópolis, Blumenau, Chapecó, Criciúma, Joaçaba, Joinville, Lages e pelas Unidades de Coleta localizadas em Canoinhas, Jaraguá do Sul e Tubarão) estar totalmente informatizada a partir de 2008, no banco de dados único, localizado em Florianópolis. Devido ao número reduzido de amostras coletadas em Canoinhas, Jaraguá do Sul e Tubarão, os dados dessas unidades estão agrupados nos Hemocentros de Joaçaba, Joinville e Criciúma, respectivamente.

A segunda parte da coleta de dados foi obtida das planilhas mensais de acompanhamento do NAT que é compilada em Brasília-DF, na Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do MS. Os dados dessa planilha correspondem ao NAT realizado em todo o território brasileiro, no período de janeiro de 2011 a junho de 2013 e serviram para compor o segundo banco de dados.

b) Variáveis do estudo:

As variáveis do estudo foram obtidas do banco de dados (formato.xls) gerado no Sistema de Gerenciamento do Hemocentro – HEMOSIS, que contém todas as informações dos doadores que doaram na Hemorrede de Santa Catarina. Este sistema de informática é responsável pelo gerenciamento dos dados: cadastro do doador, triagem, coleta, testes laboratoriais, liberação e produção de hemocomponentes e transfusão de produtos sanguíneos em toda a Hemorrede HEMOSC.

Quadro 4 – Variáveis dependentes dos estudos epidemiológicos – HEMOSC 2007-2013:

Variáveis dependentes	
Variável	Categorização
Resultado dos testes sorológicos para anti-HCV – Prism Abbott	Reagente Não reagente Inconclusivo
Imunoblot para anti-HCV Innogenetics	Reagente Não reagente Inconclusivo
Resultados do NAT HCV Bio-Manguinhos	RNA detectado RNA não detectado
Resultado dos testes sorológicos para anti-HIV anticorpo Prism Abbott	Reagente Não reagente Inconclusivo
Resultado dos testes sorológicos para HIV 4ª geração (detecção de antígeno e anticorpo) Siemens (até agosto de 2011) e Architect Abbott	Reagente Não reagente Inconclusivo
Imunoblot Innogenetics para anti-HIV 1 e 2	Reagente Não reagente Inconclusivo
Resultados do NAT HIV – Bio-Manguinhos	RNA detectado RNA não detectado

Resultados reagentes para HIV são resultantes de duas situações: a combinação de dois testes sorológicos para anti-HIV reagentes mais *imunoblot* reagente e os resultados inconclusivos para anti-HIV com NAT RNA HIV detectável. Resultados inconclusivos são aqueles em que somente um dos testes sorológicos apresentou resultado reagente ou inconclusivo (o que pode ocorrer na soroconversão dos doadores). Para o HCV foram considerados somente os indivíduos com resultados para anti-HCV reagentes com *imunoblot* reagente. Em alguns casos onde não houve esta confirmação, os casos reagentes foram

aqueles em que a relação S/CO foi igual ou superior a 3,000 para o anti-HCV (ACAR et al., 2009; STRAMER et al., 2013).

Quadro 5 – Variáveis independentes dos estudos epidemiológicos - HEMOSC (2007 – 2013):

Variáveis independentes – Sócio Demográficas	
Variáveis	Categorização
Pessoa física do doador	Cadastro individual no HEMOSIS
Número da triagem	Cadastro individual da triagem no HEMOSIS
Data de nascimento – Faixa etária	18 a 24 anos 25 a 34 anos 35 a 44 anos Acima de 45 anos
Gênero	Masculino Feminino
Procedência	Hemocentro Coordenador de Florianópolis Hemocentro Regional de Lages Hemocentro Regional de Joaçaba Hemocentro Regional de Joinville Hemocentro Regional de Chapecó Hemocentro Regional de Blumenau Hemocentro Regional de Criciúma
Cor da pele	Branca Negra Outras
Escolaridade	Analfabeto Ensino fundamental Nível médio Nível superior Pós-graduação Ignorado

Quadro 6: Variáveis associadas às características da doação de sangue no HEMOSC- 2007 a 2013:

Características da doação de sangue	Categorização
Tipo de doação	Esporádica Repetição Primeira vez
Motivo de doação	Voluntária Reposição Autóloga
Datas das doações	Dia/Mês/Ano
Número de doações anteriores	0-1 2-5 6-8 Acima de 08 doações

Quadro 7: Variáveis relacionadas aos dados obtidos da Hemorrede Brasileira (2010-2013):

Dados da Hemorrede Brasileira
Estado Brasileiro – agrupado por região
Número de amostras testadas
Período da testagem
Número de amostras HCV NAT positivas, que apresentam testes sorológicos para anti-HCV reagentes
Número de amostras HCV NAT negativas, que apresentam testes sorológicos para anti-HCV reagentes
Número de amostras HCV NAT positivas, que apresentam testes sorológicos para anti-HCV não reagentes

Número de amostras HIV NAT positivas, que apresentam testes sorológicos para anti-HIV reagentes
Número de amostras HIV NAT negativas que apresentam testes sorológicos para anti-HIV reagentes
Número de amostras HIV NAT positivas que apresentam testes sorológicos para anti-HIV não reagentes

c) Critérios de exclusão: foram excluídos doadores com dados incompletos.

d) Análises estatísticas: para a análise foi utilizado o software Stata 11.0, sendo admitido o intervalo de confiança (IC) de 95%. Foram realizados os cálculos a seguir:

d.1) O cálculo da prevalência foi realizado da seguinte forma:

$$P_{(HIV, HCV)} = \frac{\text{doadores de primeira vez com resultado reagente para HIV ou HCV} * 100.000}{\text{Total de doadores do período}}$$

d.2) O cálculo da incidência foi realizado da seguinte forma:

$$I_{(HIV, HCV)} = \frac{\text{doadores de repetição e esporádicos com resultado reagente para HIV ou HCV}}{\text{Pessoas-ano}} * 100.000$$

d.3) O cálculo do risco residual (RRes) utilizado baseou-se na estimativa de risco de Schreiber et al. (1996). Segundo este método o risco residual para os vírus é o produto da taxa de incidência ajustada por pessoas/ano pela duração da janela:

$$\text{Rres} = (\text{Taxa de incidência} * \text{Duração da janela})$$

Onde: A taxa de incidência ajustada é expressa em fração 1 : número de doações necessárias para que uma doação seja contaminada por HIV ou HCV apesar dos testes de triagem laboratorial apresentarem resultados negativo. No período analisado antes da implantação do NAT entre 01 de janeiro de 2007 a 19 de julho de 2010, a duração das janelas foi de 17 dias para o HIV e 58,3 para o HCV, comparado com 9 dias para ambos vírus após a implementação do NAT entre 20 de julho de 2010 a 31 de julho de 2013.

A magnitude da efetividade da implantação do NAT na Hemorrede Pública brasileira foi calculada para os estados que implantaram o NAT na sua rotina de triagem de doadores de sangue. Foi realizada a comparação do risco residual calculado com ou sem a utilização da metodologia NAT, com a finalidade de medir o “ganho” na segurança transfusional após a sua implantação.

4.1 Questões éticas

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina sob o número **CAAE:** 173.16613.1.0000.0110. Em anexo (Anexo II) está o termo de consentimento aplicado nesse estudo.

PARTE II – RESULTADOS

ARTIGO I: Soroprevalência, incidência e risco residual dos vírus da imunodeficiência humana e da hepatite C em doadores de sangue no Sul do Brasil entre 2007 e 2013.

Autores: Kupek EJ¹, Petry A².

¹Departamento de Saúde Pública - UFSC

²Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC

Resumo

Estudos anteriores mostraram o alto risco residual de uma doação de sangue contaminada pelo vírus de imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite C (HCV) no Brasil, motivando o desenvolvimento da plataforma brasileira NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® com objetivo da utilização da técnica de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para detectar simultaneamente a presença de ambos os agentes virais. O objetivo desse estudo foi verificar a soroprevalência, a incidência e o risco residual antes e depois do NAT. Foram analisadas mais de 700.000 doações de sangue ocorridas em sete hemocentros da rede HEMOSC de Santa Catarina, no período de janeiro de 2007 a julho de 2013. Comparando-se os períodos antes versus após o NAT para o HIV, a soroprevalência aumentou de 1,38 para 1,58 por mil doadores e a incidência de 0,72 para 1,11 por mil doadores-ano, enquanto o risco residual diminuiu quase 2,5 vezes por causa da menor duração da janela diagnóstica com a utilização do NAT. Para o HCV, houve o aumento da soroprevalência de 1,22 para 1,58 por mil doadores e a diminuição da incidência de 0,12 para 0,06 por mil doadores-ano, com redução do risco residual de três vezes com NAT. Com a introdução do NAT, a redução da janela imunológica para detecção do HIV e do HCV diminuiu o risco residual aproximadamente 2,5 e 3 vezes, respectivamente.

Palavras-chave: HIV, HCV, doadores de sangue, prevalência, incidência, risco residual.

Abstract

Previous studies have shown high residual risk of transfusing a blood

donation contaminated by human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis C virus (HCV) in Brazil, motivating development of a Brazilian platform for simultaneous detection of both virus by nucleic acid amplification test (NAT) denominated “HIV/HCV Bio-Manguinhos/FIOCRUZ”. The objective of this study is to verify seroprevalence, incidence and residual risk for both viruses before and after the introduction of NAT. Over 700,000 blood donations from seven blood banks from HEMOSC - Santa Catarina state were analyzed during the period between January 2007 and July 2013. In comparison with the period preceding the NAT, HIV seroprevalence increased from 1.38 to 1.58 per 1000 donors, HIV incidence rate raised from 1.22 to 1.58 per 1000 donor-years, and HIV residual risk dropped almost 2.5 times during the NAT period. For HCV, seroprevalence increased from 1.22 to 1.58 per 1000 donors, incidence dropped from 0.12 to 0.06 per 1000 donor-years, and residual risk decreased more than 3 times after NAT was introduced. NAT reduced the duration of immunologic window for HIV and HCV and therefore reduced corresponding residual risk approximately 2.5 and 3 times, respectively.

Key-words: HIV, HCV, blood donors, prevalence, incidence, residual risk.

Introdução

A segurança do sangue doado depende da captação e recrutamento dos doadores, da triagem clínica que busca a exclusão de candidatos a doadores que apresentam fatores comportamentais de risco ou histórico médico indicativos de infecção para agentes infecciosos, e da triagem laboratorial, com a utilização de testes sorológicos e/ou de biologia moleculares cada vez mais sensíveis, que visam o descarte de unidades de hemocomponentes potencialmente infecciosos (MARESCH et al., 2008). Estimar o risco transfusional das doenças virais transmitidas pelo sangue é uma prática utilizada em estudos de diferentes países de todos os continentes (ROTH, 2012). No Brasil, os métodos de avaliação do risco residual foram divulgados em língua portuguesa no final da década de 1990 (CANUTTI JÚNIOR 1998; COVAS, 1998) e aplicados esporadicamente na década seguinte (KUPEK^{a,b}, 2001 e 2004; BARRETO et al., 2005; SPADA et al., 2005; MARESCH et al., 2008) mostrando de um modo geral a prevalência, a incidência e o risco residual consideravelmente mais altos quando comparados ao risco calculado nos EUA, Europa, Japão e Austrália. Consequentemente, ficou evidente a necessidade de avaliar estes parâmetros de uma forma sistemática para todo país e com urgência implementar medidas para reduzir o risco transfusional de transmissão de agentes infecciosos.

No final do ano de 2005, o Ministério da Saúde do Brasil começou a financiar o desenvolvimento de uma plataforma de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para detectar simultaneamente a presença do RNA dos vírus de imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite C (HCV) em “Bio-Manguinhos/FIOCRUZ”, seguindo as Diretrizes da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados que determina que o sangue transfundido no Brasil deva ser o mais seguro possível para os receptores. A plataforma brasileira foi testada com êxito, nos anos de 2008 e de 2010, em quatro hemocentros coordenadores dos estados de Santa Catarina, Pernambuco, Rio de Janeiro, e na Fundação Pró-Sangue de São Paulo. No período entre julho de 2010 e maio de 2011, cerca de 70% das amostras dos doadores do hemocentro coordenador de Santa Catarina (HEMOSC) foram testadas com esta metodologia. Em dezembro de 2011 o kit NAT já possuía registro junto aos órgãos reguladores do Ministério da Saúde e foi incorporado à rotina de triagem. No ano de 2009, houve duas transmissões de HIV através do sangue doado, ambas antes da introdução do NAT. Uma dessas transmissões foi publicada por Pinto e

colaboradores em 2012.

O objetivo desse estudo é de comparar as medidas de prevalência, incidência e risco residual antes e depois da introdução da tecnologia NAT no HEMOSC (Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina) de janeiro de 2007 a julho de 2013.

Material e Métodos

A população do estudo inclui todos os candidatos à doação do HEMOSC que atende uma população de aproximadamente seis milhões de habitantes e propicia 99,5% dos hemocomponentes que são transfundidos nos hospitais de Santa Catarina. O HEMOSC é composto por um Hemocentro Coordenador localizado na capital Florianópolis e por seis hemocentros regionais (Blumenau, Chapecó, Criciúma, Joaçaba, Joinville e Lages) e três unidades de coleta (Canoinhas, Jaraguá do Sul e Tubarão). A rede HEMOSC é uma das poucas hemorredes públicas 100% certificadas pela norma ISO 9001:2010. Em razão da necessidade de implementação do laboratório que realizaria testes de amplificação de ácidos nucléicos para os vírus da hepatite C e da imunodeficiência humana, no ano de 2007 ocorreu a centralização das atividades de triagem sorológica para marcadores infecciosos em Florianópolis, fato que ocorreu em paralelo com a informatização das unidades que compõem a rede.

O estudo foi realizado no HEMOSC, após a elaboração de um banco de dados composto pelas variáveis obtidas através do seu sistema de informática. Após cada doação, as amostras de sangue dos doadores foram submetidas aos testes de triagem para anti-HCV, dois testes para anti-HIV-1 e 2 (sendo um deles de quarta-geração), anti-*T.cruzi*, VDRL ou anti-*T.Pallidum*, anti-HTLV, HBsAg e anti-HBc, conforme as determinações legais brasileiras.

Os kits utilizados na triagem do HIV e do HCV e os seus respectivos períodos de utilização na rotina estão descritos no Quadro 1.

A rotina do NAT foi realizada em *minipools* de seis amostras. Quando o minipool apresentava RNA detectado, as amostras eram repetidas individualmente (abertura do pool) para a identificação da amostra positiva. Os casos reagentes ou inconclusivos nos testes sorológicos foram confirmados através dos testes *Imunoblot Innogenetics*® para o anti-HCV e para o anti-HIV.

A análise estatística utilizou os valores exatos da distribuição de Poisson para determinar os intervalos de confiança (IC) de 95% para os

numeradores da prevalência e da taxa de incidência. Para os doadores de repetição, o tempo de exposição para soroconverter ao HIV ou HCV foi estimado como a metade do período do intervalo de tempo entre a doação atual e a doação anterior não reagente por qualquer um dos testes sorológicos (SCHREIBER et al. 1996).

O risco residual foi calculado pelo método de Schreiber et al. (1996), ou seja, multiplicando-se a taxa de incidência pelo tempo da duração da janela imunológica. Foram considerados os seguintes valores da duração da janela: 22 dias para o kit anti-HIV, 17 dias para o HIV Enzygnost®, 14 dias para o HIV Combo Architect® e 58,3 dias para o anti-HCV (Barreto et al., 2005; Almeida Neto et al., 2013). Para o NAT, foram aplicados os valores da janela de nove dias para ambos os agentes virais. No período analisado antes da implantação do NAT entre 01 de janeiro de 2007 a 19 de julho de 2010, a duração das janelas foi de 17 dias para o HIV e 58,3 para o HCV e de 10 a 12 dias para ambos os vírus após a implementação do NAT no período entre 20 de julho de 2010 a 31 de julho de 2013.

Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do software estatístico Stata 11.0.

Resultados

No período total do estudo correspondente a seis anos, 293.725 candidatos à doação de sangue compareceram ao HEMOSC para realizar 719.223 doações que foram avaliadas com todos os testes laboratoriais previstos pelo protocolo vigente à época.

Devido ao número reduzido de coletas, os dados das Unidades de Coleta de Jaraguá do Sul, Canoinhas e Tubarão foram agrupados aos dados dos Hemocentros de Joinville, Joaçaba e Criciúma, respectivamente.

O perfil sócio demográfico dos doadores de sangue sofreu algumas alterações significativas no período após a introdução do NAT. Destacam-se o aumento de primodoadores de 69,7% para 91,6%, e das mulheres, de 38,1% para 44,6%, assim como a participação do hemocentro de Blumenau que subiu de 4,2% para 22% do total de doadores. Os doadores de repetição nos 12 meses anteriores diminuíram de 10,1% para 0,6%, enquanto a redução daqueles com intervalo maior entre duas últimas doações foi de 20,2% para 7,8%. Também houve um aumento de 31% para 34,8% dos jovens doadores entre 18 e 24 anos. A escolaridade, raça autodeclarada e a presença das outras infecções não tiveram alterações significativas antes versus depois do NAT. Os dados

relativos às características das doações realizadas no período do estudo sofreram a influência da criação do Hemocentro Regional de Blumenau em 2010, motivo pelo qual foi verificado o elevado percentual de doadores de primeira vez.

A prevalência do HIV por mil doadores foi 1,46 no período de 2007 a 2013, com valor de 1,38 no período antes do NAT e 1,58 após a sua implementação (Tabela 1). Os doadores de repetição tiveram a prevalência significativamente maior que os primodoadores, principalmente aqueles que doaram nos 12 meses anteriores. Os doadores do sexo masculino tiveram o dobro da prevalência do sexo feminino. Observa-se um aumento da prevalência associado a faixa etária (Figura 1). Baixa escolaridade (até 1º grau completo) também foi associada a aumento da prevalência, assim como a co-infecção por outro vírus, principalmente o da hepatite B. Os hemocentros de Florianópolis, Criciúma e Joinville tiveram as prevalências significativamente maiores que os de Blumenau, Chapecó e Joaçaba, com o hemocentro de Lages numa posição intermediária. Este aumento também pode estar associado não só a uma maior exposição dos doadores, como também a melhoria do desempenho dos testes diagnósticos.

Em relação ao HCV, a prevalência calculada por mil doadores foi 1,22 por 1.000 doadores antes da introdução do NAT e 1,35/1.000 doadores após a introdução do NAT, resultando na média ponderada de 1,28 (Tabela 2). Os primodoadores tiveram a prevalência significativamente mais alta que os de repetição, assim como os homens em comparação com as mulheres. Os hemocentros de Florianópolis e Criciúma mostraram uma significativa elevação da prevalência em comparação com os de Blumenau, Joaçaba e Joinville. O aumento da prevalência foi nítido com relação a maior faixa etária e baixa escolaridade, assim como na presença da outra infecção, principalmente a da hepatite B.

As taxas de incidência do HIV e HCV, que utilizaram o estimado tempo de exposição para doadores de repetição, refletiram aproximadamente os mesmos fatores de risco e as magnitudes semelhantes aquelas observadas com relação a prevalência. Para o HIV, a incidência por mil doadores-ano foi mais de dez vezes maior entre aqueles que doaram sangue nos 12 meses anteriores comparado com aqueles cuja doação anterior ocorreu num período mais distante. A incidência entre homens foi o dobro daquela em mulheres. A faixa etária com maior incidência foi a de 25 a 34 anos. A taxa de incidência foi a mais alta em Criciúma e entre os doadores com co-infecção.

Vale a pena destacar uma clara tendência temporal de aumento

da prevalência do HIV no período analisado entre os candidatos a doação de sangue do sexo masculino na faixa etária entre 16 e 24 anos (Figura 1). Embora as mulheres na mesma faixa etária apresentassem uma tendência semelhante até 2011, houve uma queda menor no ano seguinte, seguida por uma redução grande no próximo ano.

Houve um aumento de prevalência (14,5%) e incidência (54,2%) do HIV no período pré-NAT versus pós-NAT, porém este dado não foi significativo (Tabela 1). Já o risco residual diminuiu quase 2,5 vezes com a realização do NAT (Tabela 3). Para o HCV, o aumento de prevalência (29,5%) e a redução da incidência pela metade depois do NAT, tampouco foi significativo, embora o risco residual tenha diminuído mais de três vezes.

Discussão

O expressivo aumento da participação dos primodoadores (de quase 70% para mais de 90%) e das mulheres (de 38% para quase 45%), assim como a redução dos doadores de repetição nos 12 meses anteriores (de 10% para 0,6%) entre os doadores testados com NAT, podem ter influenciado as taxas de incidência do HIV e do HCV e, conseqüentemente, o risco residual. A interação desses fatores é complexa e merece uma discussão maior.

Publicações tem registrado maior soroprevalência das infecções transmitidas via sangue entre os primodoadores, inclusive no Brasil (KUPEK, 2001^{a,b} e 2004, BARRETO et al., 2005; MARESCH et al., 2008, SABINO et al., 2012), o que logicamente indica uma incidência maior. Porém, os dados do presente estudo mostram o contrário: as soroprevalências do HIV e do HCV foram aproximadamente três e dois vezes maiores em doadores de repetição no último ano, respectivamente, em comparação com os primodoadores. O aumento da prevalência do HIV no período analisado foi expressivamente maior entre homens na faixa etária entre 16 e 24 anos em comparação com qualquer outro segmento demográfico (Figuras 1 e 2), reforçando a hipótese de utilização da doação de sangue para verificar a existência da infecção por HIV em alguns candidatos a doação de sangue. As evidências desse comportamento foram verificadas em doadores de São Paulo, em estudo no qual estimaram em 9% os doadores que buscavam o teste para HIV no banco de sangue, e mostraram maior prevalência de comportamento sexual de risco neste grupo (GONÇALEZ et al., 2006 e 2010; SABINO et al., 2012). Em Santa Catarina, observou-se um aumento significativo da soroprevalência de HIV no início da década de 2000 após uma

consistente redução durante a década de 1990, possivelmente atribuível a mesma motivação de fazer o teste de HIV em vez de doar sangue por motivos altruísticos (KUPEK, 2004). A incidência do HIV por mil doadores de repetição que aumentou de 0,36 (IC 95% de 0,13 a 0,79) no fim da década de 1990 (KUPEK^b, 2001), para 0,86 (IC 95% de 0,73 a 1,00) entre 2007 e 2013 é preocupante e exige medidas adicionais para melhor selecionar os candidatos a doadores. Além disso, pode significar uma melhor sensibilidade dos testes sorológicos utilizados.

É importante lembrar que o número de soroconversões em doadores de repetição para cálculo do risco residual é tipicamente menor que para cálculo da taxa de incidência porque o primeiro exclui os indivíduos com qualquer teste sorológico reagente. Estes testes incluem os marcadores das doenças sexualmente transmissíveis, tais como hepatite B e sífilis e, portanto indicam comportamento sexual de risco. A exclusão desses indivíduos como potenciais doadores de sangue reduziu a incidência do HIV por mil doadores entre os doadores de repetição nos 12 meses anteriores de 6,25 (Tabela 1) para 1,91 e 1,80 (Tabela 3) nos períodos antes e depois da implementação do NAT, respectivamente. Com essa redução, a taxa de incidência para risco residual até diminuiu um pouco de um período para outro, apesar do aumento da soroprevalência em homens jovens no sentido contrário. Em resumo, não foi a mudança em incidência do HIV e sim a redução da janela diagnóstica após a introdução do NAT que reduziu risco residual pela metade esse grupo de doadores (Tabela 3). O risco entre os doadores de repetição com intervalo maior de 12 meses foi reduzido 2,62 vezes. Em todos doadores de repetição, o risco residual foi reduzido quase 2,5 vezes devido ao NAT.

A incidência do HCV no HEMOSC diminuiu pela metade depois da implementação do NAT. Embora não se apresente como estatisticamente significativa, essa diminuição contribuiu para redução do risco residual por mais de quatro vezes em doadores de repetição. Durante a década de 1990, já foi observada uma grande redução da incidência do HCV em doadores do HEMOSC para 0,51 por mil doadores de repetição (KUPEK^a, 2001). O presente estudo confirma a continuação dessa tendência, atingindo um nível cinco vezes menor. Por outro lado, a incidência foi vinte vezes maior em doadores de repetição nos 12 meses anteriores do que naqueles com doação prévia num período mais distante. Embora a transmissão sexual do HCV seja relativamente rara, a infecção é um marcador de comportamento de risco. Portanto, o tamanho desse efeito reforça a hipótese de busca do teste para HIV em alguns indivíduos que doam sangue nos intervalos

menores de um ano.

A semelhança entre os fatores de risco para soroprevalência e incidência, tanto do HIV quanto do HCV, reforça a noção de prevalência como incidência cumulativa e a validade de utilizá-la para estimar o risco de soroconversão em primodoadores (ZOU et al., 2008). De um modo geral, maior risco de infecção por HIV entre homens e entre as pessoas com baixa escolaridade já foi evidenciado na população geral do país (FONSECA e BASTOS, 2007) e em doadores de sangue (SABINO et al., 2012), assim como para capital Florianópolis com relação a demais regiões do estado (Rosini et al., 2003; Maresch et al., 2008). Chama atenção o alto risco da infecção por HIV e HCV nos doadores de Criciúma. Existem poucos estudos desse tipo para comparar os resultados obtidos. Em um deles, as capitais dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais juntas registraram a incidência do HCV de 3,11 por 100.000 doadores-ano, com risco residual de 0,5 por 100.000 em 2007 (ALMEIDA-NETO et al., 2013). Embora a incidência do HCV fosse significativamente maior esses estados em comparação com Santa Catarina, em todos eles foi registrada a tendência temporal de redução desse risco.

O aumento de incidência do HIV e HCV após a introdução do NAT é condizente com a maior sensibilidade desse teste para detectar doadores infectados, em comparação aos testes sorológicos. O aumento do risco da infecção por HIV em doadores de sangue também ficou evidenciado pela alta soroprevalência de 1,46 por mil doadores, um valor próximo a 1,51 por mil na África do Sul, mas consideravelmente mais alto que 0,23 nos países da Europa mediterrânea e central ou 0,34 no sudeste asiático, conforme relatado numa revisão recente de dados dos países que implementaram NAT como teste individual em doadores de sangue (BRUHN et al., 2013).

Vale a pena destacar que esse é o primeiro relato da efetividade da plataforma brasileira NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos, no país com maior número de doadores de sangue na América Latina. O risco residual de 2,51 por 100.000 doadores para HIV, observado no HEMOSC entre 2007 e 2013, é próximo as estimativas de 2 por 100.000 na virada do século (KUPEK^b, 2001 e 2004) na grande Florianópolis e em Lages (SPADA et al., 2005), porém menor que o risco de 3,82 estimado por Maresch et al. em 2008, no estado de Santa Catarina. Os dados compilados nos hemocentros de São Paulo, Belo Horizonte e Recife para período 2007-2008 apontaram o risco residual para HIV de 1,13 por 100.000 e projetaram sua redução com a introdução da triagem com NAT em torno de 1,66 vezes com uso de *minipool* de seis amostras

(janela diagnóstica de 9 dias) e 2,69 vezes com o uso de teste individual - janela diagnóstica de 5,6 dias (SABINO et al., 2012). O risco residual para HIV calculado, de 2,51 por 100.000 doadores de repetição no presente estudo encontra-se próximo a estas estimativas, assim como a sua redução pelo fator 2,49 após a introdução do NAT com *minipool* de 6 amostras.

As limitações do presente estudo incluem o foco no risco transfusional residual, ou seja, o risco de uma doação contaminada entrar no *pool* de transfusão, deixando de lado o risco de transmissão do receptor da sangue contaminado, que ainda depende da dose infectante e da reação imunológica do receptor. O risco de transmissão tem sido objeto dos estudos na área (VERMEULEN et al., 2009, BRUHN et al., 2013) e pode ser abordado no futuro com os dados do NAT brasileiro. Outra limitação é a baixa precisão das estimativas com base nas poucas soroconversões, principalmente nos agregados menores, tais como hemocentros regionais. Em função disso, as comparações geográficas ficaram prejudicadas, mas futuros dados podem reduzir este problema.

Apesar da expressiva redução do risco residual com implementação do NAT em Santa Catarina, a incidência em doadores de sangue de aproximadamente um por mil doadores-ano continua alta, ultrapassando a incidência dos países como França, Alemanha, EUA, Canadá e Austrália em quase cem vezes (GLYNN et al., 2000; DODD et al., 2002, CHIAVETTA et al., 2003; SEED et al., 2005; BUSCH et al., 2005 e PILLONEL et al., 2005). O resultado obtido ressalta a necessidade de implantar com urgência medidas preventivas efetivas na população geral para maiores reduções do risco transfusional no futuro (SABINO et al., 2012). Sem a redução do comportamento sexual de risco, os avanços tecnológicos como NAT, inclusive o teste individual, terão um efeito protetor ainda limitado. Portanto, a integração das políticas de saúde para sangue e hemoderivados e para prevenção das doenças sexualmente transmissíveis deverá dominar a pauta de planejamento das ações futuras nessa área.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe de informática do HEMOSC, Monica Nunes e Luana Pereira, pela execução do banco de dados que propiciou a análise dos dados desse estudo. A Dr^a Denise Gerent, Dr. Rodolfo Ramos e a Farmacêutica Patrícia Carsten pela autorização na utilização dos dados.

Referências bibliográficas

ALMEIDA-NETO C, SABINO EC, LIU J, BLATYTA PF, MENDRONE-JUNIOR A, SALLES NA, LEÃO SC, WRIGHT DJ, BASQUES FV, FERREIRA JE, BUSCH MP, MURPHY EL. Prevalence of serological markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion* 2013; 53:827-834.

BARRETO CC, SABINO EC, GONÇALES TT, LAYCOCK ME, PAPPALARDO BL, SALLES NA, WRIGHT DJ, CHAMONE DF, BUSCH MP. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus community and replacement first-time blood donors in São Paulo, Brazil. *Transfusion*, 2005; 45:1709-1714.

BRUHN R, LELIE N, CUSTER B et al.: Prevalence of human immunodeficiency virus RNA and antibody in first-time, lapsed and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenarios. *Transfusion* 2013; *in press*.

BUSCH MP, GLYNN SA, STRAMER SL, STRONG DM, CAGLIOTI S, WRIGHT DJ, PAPPALARDO B, KLEINMAN SH, NHLBI-REDS NAT Study Group. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 2005; 45:254-64.

CANUTTI JÚNIOR V. Risco transfusional: Metodologia e estudo. *Atualização em Hemoterapia* 1998; 5:90-99.

CHIAVETTA JA, ESCOBAR M, NEWMAN A, HE Y, DRIEZEN P, DEEKS S, HONE DE, O'BRIEN SF, SHER G. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. *CMAJ* 2003; 169:767-73.

COVAS DT. Risco de transmissão do HIV-1 pelas transfusões de sangue. *Atualização em Hemoterapia* 1998; 5:100-106.

DODD RY, NOTARI EP, STRAMER SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion*

2002;42:975-9.

FONSECA MG, BASTOS FI. Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. *Cad Saude Pública* 2007; 23(Suppl. 3): S333-S344.

GLYNN SA, KLEINMAN SH, SCHREIBER GB, BUSCH MP, WRIGHT DJ, SMITH JW, NASS CC, WILLIAMS AE. Trends in incidence and prevalence of major transfusion-transmissible viral infections in US blood donors, 1991 to 1996. *Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS)*. *JAMA* 2000; 284:229-35.

GONZALEZ M, REGINE V, PICCININI V, GIAMPAOLO A, HASSAN HJ. Residual risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis C virus and hepatitis B virus infections in Italy. *Transfusion* 2005; 45:1670-1675.

KUPEK E. Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(3):236-240.

KUPEK^A EJ. Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991-1999. *Journal of Viral Hepatitis* 2001; 8:89-82.

KUPEK^B EJ. The reduction of HIV reduction of HIV transfusion risk in southern Brazil in the 1990s. *Transfusion Medicine* 2001;11:75-78.

MARESCH C, SCHLUTER PJ, WILSON AD, SLEIGH A. Residual infectious disease risk in screened blood transfusion from a high-prevalence population: Santa Catarina, Brazil. *Transfusion* 2008; 48:273-281.

PILLONEL J, LE MARREC N, GIRAULT A, DAVID D, LAPERCHE S. Epidemiological surveillance of blood donors and residual risk of blood-borne infections in France, 2001 to 2003. *Transfus Clin Biol* 2005;12:239-46.

PINTO AR, PETRY A, GRAEF T, VANDRESEN R, KUPEK EJ. Case report of haemovigilance investigation using phylogenetic analysis of HIV-1 in Brazil. *Transfusion Medicine*, 2012, 22:57-62.

ROSINI N, MOUSSE D, SPADA C, TREITINGER A. Seroprevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2003;7(4):262-267.

ROTH WK, BUSCH MP, SCHULLER A, et al.: International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang* 2012; 102:82-90.

SABINO EC, GONÇALEZ TT, CARNEIRO-PROIETTI AB, SARR M, FERREIRA JE, SAMPAIO DA, SALLES NA, WRIGHT DJ, CUSTER B, BUSCH M and for the NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Human immunodeficiency virus prevalence, incidence, and residual risk of transmission by transfusions at Retrovirus Epidemiology Donor Study-II blood centers in Brazil. *Transfusion* 2012, 52: 870–879.

SCHREIBER GB, BUSCH MP, KLEINMAN SH, KORELITZ JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *New England Journal of Medicine* 1996; 334:1685-1690.

SEED CR, KIELY P, KELLER AJ. Residual risk of transfusion transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and human T lymphotropic virus. *Intern Med J* 2005; 35:592-8.

SPADA C, SOUZA MA, TREITINGER A. Estimation of the Residual Risk for the Transmission of HIV in Blood Donors from the Mountain region of Santa Catarina. *BJID* 2005; 9(6): 489-493.

VERMEULEN M, LELIE N, SYKES W, et al.: Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. *Transfusion* 2009; 49:1115-1125.

ZOU S, DORSEY KA, NOTARI EP, et al.: Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion* 2010; 50:1495-1504.

Quadro 1 – Tecnologias utilizadas para detecção de HIV e HCV em doadores de sangue, por período do estudo (2007 a 2013).

Período	Kit para detecção de anti-HIV	Kit para detecção de anti-HIV Ag/Ab	Anti-HCV	NAT HIV/HCV
Janeiro de 2007 a junho de 2010	Anti-HIV 1, 2 O Prism Abbott Laboratories Wiesbaden Alemanha -	Anti-HIV 4ª geração Enzygnost Integral II Siemens – Marburg Alemanha	Anti-HCV Prism Abbott Laboratories Wiesbaden Alemanha -	Não utilizado
Julho de 2010 a julho de 2013	Anti-HIV 1, 2 O Prism Abbott Laboratories Wiesbaden Alemanha -	Anti-HIV Combo Architect Laboratories Wiesbaden – Alemanha	Anti-HCV Prism Abbott Laboratories Wiesbaden Alemanha -	NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos FIOCRUZ - RJ

Tabela 1. Soroprevalência e incidência do HIV associado aos fatores de risco na Hemorrede de Santa Catarina, no período de 2007 a 2013.

Variável	Categoria	n	Casos HIV+	Prevalência (IC 95%) ^a	Casos incidentes	Incidência (IC 95%) ^b
Todos ^c		293.696	430	1,46 (1,33-1,61)	163	0,86 (0,73-1,00)
Período	Pré-NAT	168.318	232	1,38 (1,20-1,55)	86	0,72 (0,57-0,89)
	NAT	125.378	198	1,58 (1,36-1,80)	77	1,11 (0,87-1,38)
Tipo de doador	Primodoador	232.240	267	1,15 (1,02-1,30)	-	-
	Repetição nos últimos 12 meses	17.711	62	3,50 (2,63-4,37)	62	6,25 (4,80-8,02)
	Repetição no período >12 meses	43.745	101	2,31 (1,86-2,76)	101	0,56 (0,46-0,68)
Gênero	Masculino	173.774	322	1,85 (1,66-2,07)	133	1,02 (0,86-1,21)
	Feminino	119.950	108	0,90 (0,74-1,09)	30	0,51 (0,34-0,72)
Faixa etária	16-24	95.797	117	1,22 (1,01-1,46)	45	0,28 (0,20-0,37)
	25-34	97.659	168	1,72 (1,47-2,00)	71	0,92 (0,72-1,15)
	35-44	59.091	86	1,45 (1,16-1,80)	30	0,54 (0,36-0,76)
	45-65	41.177	59	1,43 (1,09-1,85)	17	0,43 (0,25-0,69)
Hemocentro	Blumenau	34.771	26	0,86 (0,58-1,23)	4	0,83 (0,22-2,12)
	Chapecô	36.991	24	0,84 (0,57-1,19)	7	0,22 (0,09-4,56)
	Criciúma	45.199	59	1,90 (1,52-2,35)	27	1,53 (1,01-2,23)
	Florianópolis	71.852	69	1,99 (1,68-2,34)	74	0,83 (0,65-1,04)
	Joaçaba	25.284	13	0,59 (0,33-0,98)	2	0,56 (0,07-2,02)
	Joinville	58.869	59	1,65 (1,34-2,01)	38	0,80 (0,57-1,09)
	Lages	20.758	17	1,35 (0,90-1,95)	11	0,47 (0,23-0,84)
Escolaridade	Analfabeto	401	2	4,99 (0,60-17,9)	0	0
	1º incompleto	36.289	69	1,90 (1,48-2,41)	16	0,63 (0,36-1,01)
	1º completo	29.035	68	2,34 (1,82-2,97)	21	1,00 (0,62-1,53)
	2º incompleto	20.390	36	1,77 (1,24-2,44)	17	1,51 (0,88-2,41)
	2º completo	110210	148	1,34 (1,13-1,58)	67	0,94 (0,73-1,19)
	3º incompleto	44.344	58	1,31 (0,99-1,69)	20	1,09 (0,67-1,69)
	3º completo	42.481	37	0,87 (0,61-1,20)	19	0,54 (0,33-0,85)
	Pós-graduação	754	0	0	0	-
	Ignorado	9.820	160	1,33 (1,13-1,56)	3	0,90 (0,71-1,14)
Co-infecção ^d	Ausente	277.368	373	1,35 (1,21-1,49)	156	0,83 (0,70-0,97)
	Presente	16.356	57	3,40 (2,58-4,40)	7	5,57 (2,24-11,47)

^a por 1000 doadores ^b por 1000 doadores de repetição por ano ^c excluindo os resultados inconclusivos ^d por HBV, HCV, HTLV, *T.pallidum* ou *T.cruzi*

Tabela 2. Soroprevalência e incidência do HCV associado aos fatores de risco na Hemorrede de Santa Catarina no período de 2007 a 2013.

Variável	Categoria	n	Casos HCV (+)	Prevalência (IC 95%) ^a	Casos incidentes	Incidência (IC 95%) ^b
Todos ^c		293.510	375	1,28 (1,15-1,41)	19	0,10 (0,06-0,15)
Período	Pré-NAT	168.229	206	1,22 (1,06-1,39)	15	0,12 (0,07-0,21)
	NAT	125.310	169	1,35 (1,14-1,55)	4	0,06 (0,02-0,15)
Tipo de doador	Primodoador	232.127	356	1,53 (1,38-1,70)	-	-
	Repetição nos últimos 12 meses	17.688	10	0,73 (0,29-1,51)	10	1,01 (0,48-1,85)
	Repetição no período >12 meses	43.724	9	0,07 (0,03-0,14)	9	0,05 (0,02-0,09)
Gênero	Masculino	173.651	252	1,45 (1,28-1,64)	12	0,09 (0,04-0,16)
	Feminino	119.888	123	1,02 (0,85-1,22)	7	0,12 (0,05-0,24)
Faixa etária	16-24	95.787	46	0,48 (0,35-0,64)	1	0,06 (0,00-0,33)
	25-34	97.586	91	0,93 (0,75-1,15)	3	0,04 (0,00-0,12)
	35-44	59.046	125	2,12 (1,76-2,52)	10	0,18 (0,08-0,33)
	45-65	41.120	113	2,75 (2,26-3,30)	5	0,13 (0,04-0,29)
Hemocentro	Blumenau	37.767	17	0,49 (0,28-0,78)	0	0
	Chapecó	36.980	22	0,59 (0,37-0,90)	0	0
	Criciúma	45.166	99	2,19 (1,78-2,68)	4	0,22 (0,06-0,58)
	Florianópolis	71.797	132	1,83 (1,53-2,18)	6	0,07 (0,02-0,15)
	Joaçaba	25.270	20	0,79 (0,48-1,22)	2	0,56 (0,07-2,02)
	Joinville	58.815	57	0,97 (0,73-1,25)	3	0,06 (0,01-0,18)
	Lages	20.744	28	1,35 (0,90-1,95)	4	0,17 (0,04-0,43)
Escolaridade	Analfabeto	401	4	9,97 (2,72-25,34)	0	0
	1º incompleto	36.260	80	2,20 (1,75-2,74)	9	0,35 (0,16-0,67)
	1º completo	29.018	59	2,03 (1,55-2,62)	0	0
	2º incompleto	20.376	31	1,52 (1,03-2,16)	1	0,09 (0,00-0,49)
	2º completo	110156	123	1,12 (0,93-1,33)	6	0,08 (0,03-0,18)
	3º incompleto	44.315	34	0,76 (0,53-1,07)	2	0,11 (0,01-0,39)
	3º completo	42.457	34	0,80 (0,55-1,18)	1	0,03 (0,00-0,15)
	Pós-graduação	754	0	0	0	0
	Ignorado	9.802	133	1,11 (0,93-1,31)	0	0,07 (0,02- 0,17)
Co-infecção ^d	Ausente	276.719	303	1,09 (0,97-1,22)	0	0,10 (0,06-0,15)
	Presente	16.820	72	4,28 (3,35-5,39)	19	0,63 (0,02-3,53)

^a por 1000 doadores; ^b por 1000 doadores de repetição por ano; ^c excluindo os resultados inconclusivos; ^d por HBV, HIV, HTLV, *T.pallidum* ou *T.cruzi*

Tabela 3. Risco residual antes e depois da implementação do NAT associado ao tipo de doador

Vírus	Tipo de doador	Período	Rendimento do NAT			Risco residual		
			n ^a	Pessoa-ano	Incidência (IC 95%) ^b	RR (IC 95%) ^c	por 100.000 doadores	Fator de redução
HIV	Repetição nos últimos 12 meses	Pré-NAT	34	17.811	1,91 (1,32-2,67)	1:11.242 (1:8042, 1:16267)	8,89 (6,15-12,43)	2,00
		NAT	28	15.644	1,80 (1,19-2,59)	1:22.529 (1:15657, 1:34677)	4,44 (2,88-6,39)	
	Repetição no período >12 meses	Pré-NAT	52	142.510	0,36 (0,27-0,48)	1:59.547 (1:44735, 1:79530)	1,68 (1,26-2,23)	2,62
		NAT	40	150.94	0,26 (0,19-0,36)	1:155.967 (1:112643, 1:213429)	0,64 (0,47-0,89)	
	Todos de repetição	Pré-NAT	86	160.320	0,54 (0,43-0,66)	1:39.765 (1:32535, 1:52373)	2,51 (2,00-3,07)	2,48
		NAT	68	166.586	0,41 (0,32-0,52)	1:98.906 (1:77984, 1:126723)	1,01 (0,79-1,28)	
HCV	Repetição nos últimos 12 meses	Pré-NAT	39	18.091	2,16 (1,53-2,95)	1:5.183 (1:3795, 1:7318)	19,29 (13,66-26,35)	4,26
		NAT	2	1.080	1,85 (0,22-6,69)	1:22.099 (1:6061, 1:155967)	4,56 (0,54-16,50)	
	Repetição no período >12 meses	Pré-NAT	47	132.630	0,35 (0,26-0,47)	1:31.989 (1:23822, 1:43063)	3,13 (2,32-4,20)	4,53
		NAT	1	3.589	0,28 (0,01-1,55)	1:144.827 (1:26162, 1:4055150)	0,69 (0,02-3,82)	
	Todos de repetição	Pré-NAT	66	122.244	0,54 (0,42-0,69)	1:20.727 (1:16221, 1:26.658)	4,82 (3,75-6,16)	3,06
		NAT	3	4.668	0,64 (0,13-1,88)	1:63.362 (1:21570, 1:311934)	1,58 (0,32-4,64)	

^a Número de soroconversões por vírus analisado sem resultado reagente nos outros testes sorológicos

^b Incidência por mil pessoas-ano

^c Risco residual com intervalo de confiança de 95%, assumindo a duração da janela imunológica para HIV de 17 e 9 dias antes e depois da implementação do NAT, respectivamente, e de 32,6 e 9 dias para HCV, na mesma ordem.

Figura 1. Proporção de homens doadores de repetição infectados por HIV, por faixa etária na Hemorrede de Santa Catarina, no período de 2007 a 2013.

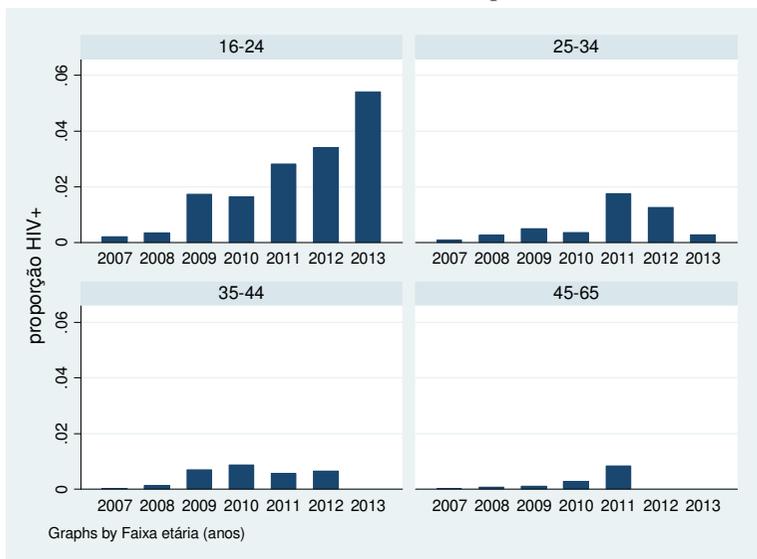
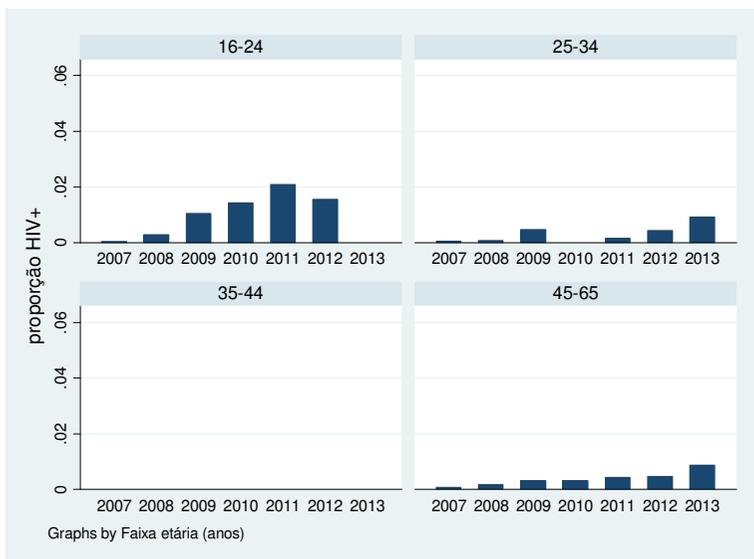


Figura 2. Proporção de mulheres doadoras de repetição infectadas por HIV, por faixa etária na Hemorrede de Santa Catarina no período de 2007 a 2013.



ARTIGO II – Ganho do NAT na detecção do vírus da imunodeficiência humana e hepatite C em doadores de sangue brasileiros: resultados preliminares.

Autores:

Petry A¹, Kupek EJ², Genovez G³, Martins, JT^{1,3} Evangelista, GBB³

¹ Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC

² Departamento de Saúde Pública – UFSC

³ Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde – Brasil

Resumo

O propósito desse estudo é de demonstrar os primeiros resultados relacionados aos doadores de sangue do Brasil, que foram submetidos à triagem pelo NAT. O estudo inclui aproximadamente três milhões de doações testadas em 14 serviços de hemoterapia com a plataforma brasileira NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® (metodologia PCR – *multiplex*). A taxa de ganho ou *yield* por milhão de doações foi de 4,38 para HIV e 1,01 para HCV. Para o HIV o ganho com a utilização do NAT variou de zero na região Centro-Oeste a cinco na região Sudeste. O rendimento do NAT brasileiro foi similar aos estudos publicados com resultados da Europa Mediterrânea e de países do Sudeste Asiático enquanto que para o HCV foi menor do que o esperado.

Palavras-chaves: doadores de sangue, NAT, ganho, HIV, HCV, prevalência, Brasil.

Abstract

The purpose of this study is to demonstrate the first results of blood donors in Brazil screening by NAT. The study includes approximately 3 million donations tested in 14 hemothrapy services through the platform Brazilian NAT HIV / HCV Bio-Manguinhos ® (PCR methodology - *multiplex*). The rate of yield or yield per million donations for HIV was 4.38 and 1.01 for HCV. HIV yield ranged from zero in the Midwest to five in the Southeast. The yield of NAT Brazilian

was similar to published studies with results of Mediterranean Europe and Southeast Asian countries while HCV was lower than expected.

Key-words: blood donors, NAT, *yield*, HIV, HCV, prevalence, Brazil.

Introdução

No ano de 2010, teve início no Brasil a implementação do teste de triagem utilizando a técnica de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) na triagem de doadores de sangue para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (HCV). O kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® foi registrado nos órgãos reguladores brasileiros e utiliza a metodologia PCR em tempo real, *multiplex*, sendo discriminatório para o HIV e HCV. Este kit foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores virologistas e biólogos moleculares e está sendo produzido e distribuído por Bio-Manguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro) com o apoio financeiro do Ministério da Saúde. Este kit foi aprovado para utilização na triagem de doadores em 27 de dezembro de 2010. O número de laboratórios de triagem NAT instalados em hemocentros chegou a 14 em 2013, cobrindo todas as principais regiões geográficas do país. O objetivo desse comunicado breve é de fornecer os primeiros resultados do rendimento da utilização do NAT na triagem sorológica de doadores de sangue no Brasil.

Material/Métodos

O início da implantação do NAT ocorreu em 2010, em quatro hemocentros: HEMOSC (Santa Catarina), Fundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo, HEMORIO (Rio de Janeiro) e HEMOPE (Pernambuco). A implantação foi gradualmente expandida para outros hemocentros e foi concluída em 2013. Os laboratórios de testagem são conhecidos como SIT-NAT e foram distribuídos estrategicamente no Brasil, para facilitar o transporte das amostras, já que o país apresenta extensão continental. Os dados foram coletados entre maio de 2011 a julho de 2013.

As plataformas NAT são compostas por um conjunto de equipamentos, insumos e reagentes e são disponibilizados gratuitamente pelo Ministério da Saúde para quatorze centros de testagem NAT distribuídos no Brasil. Estes serviços centralizam a realização de mais de três milhões de testes em amostras de doadores de sangue provenientes de serviços integrados ao SUS (Sistema Único de Saúde),

mantido pelo governo federal. O SUS preconiza o acesso universal aos serviços de atenção a saúde no Brasil. Os kits de diagnóstico de NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® são fornecidos sob a forma de 96 reações (quatro controles e 92 reações para serem utilizadas em minipool de seis amostras) e utilizados para a detecção simultânea de HIV e HCV nos serviços de hemoterapia, a fim de reduzir o risco de transmissão desses agentes com a transfusão.

A metodologia da plataforma brasileira HIV/HCV é *multiplex*, e baseia-se na técnica de PCR em tempo real. A tecnologia NAT foi desenvolvida com o objetivo de detecção do ácido nucleico viral no período que precede a produção sistêmica de anticorpos, denominado período de janela diagnóstica. A sensibilidade do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® corresponde a 1.800 UI/ml (em *minipool* de seis amostras - MP6) e 300 UI/ml nas amostras individuais. A reação de amplificação requer a etapa de transcrição reversa, uma vez que os vírus apresentam seu genoma composto por RNA.

O fluxo da rotina consiste na preparação do MP6, na etapa de extração e purificação do RNA extraído, na amplificação e detecção do produto amplificado com a técnica de PCR em tempo real e disponibilização dos resultados.

De acordo com a legislação brasileira, em serviços de hemoterapia devem ser utilizados testes sorológicos de alta sensibilidade (quimiluminescência e/ou testes imunoenzimáticos) na triagem de doadores de sangue (Brasil, 2011), ou seja, os serviços realizavam dois testes de triagem para anti-HIV (3^a e 4^a geração) e um teste de triagem para o teste anti-HCV (3^a ou 4^a geração) durante o período da coleta de dados.

Os resultados apresentados incluem dados de prevalência obtidos dos relatórios fornecidos pelos laboratórios NAT e encaminhados a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde mensalmente. Estes dados incluem: número de amostras testadas no período, o número de amostras com resultados sorológicos, e os resultados dos testes de NAT com resultados sorológicos não reagentes. Para descrever as estimativas de prevalência e a variação do rendimento (*yield*) da implantação do NAT foi utilizada a técnica de distribuição binomial de Poisson, com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Aproximadamente três milhões de doações de sangue foram triadas para HIV e HCV pela plataforma *multiplex* brasileira, entre os anos 2011 e 2013. Nesse período foram observados 13 casos nos quais os testes sorológicos se apresentaram não reagentes, porém com NAT-RNA detectável para HIV e três casos com este mesmo perfil para o HCV (Tabela 1). As taxas de rendimento de NAT total por milhão de doações foram de 4,38 para o HIV e de 1,01 para o HCV. Em todas as regiões geográficas analisadas, o rendimento de HIV foi proporcional à prevalência da infecção. Em relação ao HCV, devido ao número de casos muito reduzido, não foi possível definir esta relação. As prevalências do HIV e do HCV foram de magnitude semelhante entre as regiões analisadas, com a maior prevalência de HIV observada na região Norte (Amazônia) e a maior prevalência do HCV relatada na região Centro-Oeste, sendo que estes dados podem ser observados na tabela 1.

Discussão

Estes são os primeiros resultados da introdução da plataforma *multiplex* HIV/HCV NAT na triagem de doadores de sangue no maior país da América Latina. O rendimento do HIV NAT de 4,38 por milhão de doações de sangue observado no Brasil está próximo de 4,8 relatado no Sudeste Asiático e consideravelmente maior do que 0,5 relatado para o período de 1999-2008 nos Estados Unidos (Zou et al., 2010) e no Norte da Europa Central (Bruhn et al., 2013). No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao rendimento do HIV NAT de 2,5 por milhão para a Europa Mediterrânea (Bruhn e al, 2013) de acordo com a análise do intervalo de confiança de 95% no presente estudo.

Apenas o rendimento Sul Africano do HIV NAT de 38,2 por milhão se destaca como o maior valor relatado até agora (Bruhn et al., 2013). No entanto, outro estudo recente utilizando dados do período 2005-2010 no mesmo país mostrou um número consideravelmente menor de 3,08 por milhão, uma vez foram excluídos casos de amostras com o antígeno p24 presente ou reagente (Cable et al., 2013).

Vale a pena destacar que a variação do ganho da utilização do NAT nas diferentes regiões do Brasil é quase tão grande como a relatada entre países que utilizam o teste NAT individual para a triagem de doadores de sangue (Bruhn et al., 2013). O rendimento do 1,01 por milhão do HCV NAT, no Brasil foi semelhante ao relatado na África do

Sul, de 1,37 (Vermeulen et al., 2009), mas inferior do que 3,7 nos EUA (Zou et al., 2010), 2,5 na Itália (Velati et al., 2009), 2,38 na Espanha (Alvarez et al., 2005) e 2,25 na Alemanha (Nübling et al., 2009), embora fosse superior a 0,5 verificado no Canadá (O'Brien, et al 2007).

As limitações desse estudo derivam principalmente do fato de que o número de doações do período do estudo é relativamente pequeno para análise de eventos raros, como é o caso do ganho da implantação do NAT, o que possibilita grandes estimativas de variância. Além disso, a implementação parcial de triagem NAT no Brasil nos impede de verificar a cobertura da população total com os dados que estão disponíveis neste momento. Porém essa incerteza é atenuada pela representação de dados de todas as regiões geográficas brasileiras.

Como conclusão, verifica-se que os resultados preliminares do NAT brasileiro na triagem de doadores de sangue mostram um rendimento por milhão de doações semelhante ao obtido no Sudeste da Ásia e em países mediterrâneos da Europa em relação ao HIV, enquanto para o HCV o rendimento foi menor do que na maioria dos outros países onde esta tecnologia está implantada há mais tempo.

O acompanhamento sistemático do ganho do NAT em relação aos testes sorológicos é essencial para auxiliar no desenvolvimento de medidas adicionais para melhorar a segurança do sangue no Brasil e contribuir para esses esforços em todo o mundo como a seleção e recrutamento de doadores (Roth et al., 2013).

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Grupo de Assessoramento NAT e aos quatorze Sítios Testadores, pelo envio dos dados a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde.

Referências Bibliográficas

ALVAREZ DO BARRIO M, GONZÁLEZ DÍEZ R, HERNÁNDEZ SÁNCHEZ JM, et al.: Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. *Euro Surveill* 2005;10:20-22.

BRUHN R, LELIE N, CUSTER B et al.: Prevalence of human immunodeficiency virus RNA and antibody in first-time, lapsed and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenarios. *Transfusion* 2013;

CABLE R, LELIE N, BIRD A: Reduction of the risk of transfusion-transmitted viral infection by nucleic acid amplification testing in the Western Cape of South Africa: a 5-year review. *Vox Sang* 2013; 104:93-99.

NÜBLING CM, HEIDEN M, CHUDY M, et al.: Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion* 2009; 49:1850-1858.

O'BRIEN SF, YI QL, FAN W, et al.: Current incidence and estimated residual risk of transfusion-transmitted infections in donations made to Canadian Blood Services. *Transfusion* 2007; 47:316-325.

ROTH WK, BUSCH MP, SCHULLER A, et al.: International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang* 2012; 102:82-90.

VELATI C, ROMANÒ L, FOMIATTI L, et al.: Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. *Transfusion* 2008; 48:2205-2213

VERMEULEN M, LELIE N, SYKES W, et al.: Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. *Transfusion* 2009; 49:1115-1125.

ZOU S, DORSEY KA, NOTARI EP, et al.: Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion* 2010; 50:1495-1504.

Tabela 1. Prevalência do HIV e HCV e rendimento (*yield*) do NAT no Brasil, 2010-2013.

Região do Brasil	Número de doações de sangue testadas	HIV				HCV			
		Prevalência ^a		NAT yield ^b		Prevalência ^a		NAT yield ^b	
		n ^c	IC 95%	N ^d	IC 95%	n ^c	IC 95%	N ^d	IC 95%
Sudeste	1672845	639	38.20 (35.29-41.28)	5	2.99 (0.97-6.98)	793	47.40 (44.16-50.82)	2	1.20 (0.14-4.32)
Sul	466645	285	61.07 (54.19-68.59)	2	4.29 (0.52-15.50)	196	42.00 (36.33-48.31)	1	2.14 (0.05-11.90)
Norte	166529	292	175.34 (155.81-196.65)	4	24.00 (6.54-61.50)	116	69.66 (57.56-83.55)	0	0.00 (0.00-22.20)
Nordeste	472775	271	57.32 (50.70-64.57)	2	4.23 (0.51-15.30)	281	59.44 (52.69-66.81)	0	0.00 (0.00-7.80)
Centro-Oeste	188381	245	130.06 (114.28-147.40)	0	0.00 (0.00-19.60)	229	121.56 (106.33-138.37)	0	0.00 (0.00-19.60)
Total	2967175	1732	58.37 (55.66-61.19)	13	4.38 (2.33-7.49)	161	54.43 (51.81-57.15)	3	1.01 (0.21-29.50)

^a por 100.000 doações ^b por milhão de doações ^c o número de casos positivos por NAT e testes sorológicos

^d o número de casos NAT-positivos e testes sorológicos não reagentes (*yield*)

ARTIGO III - Experiência do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – Brasil, na utilização da plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos/FIOCRUZ na triagem de doadores de sangue.

Autores: Petry A¹, Kupek, EJ²;

¹ Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC

² Departamento de Saúde Pública - UFSC

Resumo

O teste NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® é uma plataforma utilizada na triagem de doadores de sangue da Hemorrede Pública do Brasil, sendo que a rede de testagem é composta por 14 laboratórios instalados em Hemocentros. A triagem com a metodologia de amplificação de ácidos nucléicos teve início em 2011 no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina. No período compreendido entre maio de 2011 a setembro de 2013 foram testadas 424.125 amostras de doadores de sangue, sendo que 305.855 procedentes de Santa Catarina e 118.270 oriundas do estado do Rio Grande do Sul. O percentual de concordância entre o NAT e testes sorológicos reagentes foi de 83,19% para o HCV e de 94,63% para o HIV. Foi detectada uma amostra em período de janela para HCV e duas amostras para HIV (1/424.125 doações para o HCV e de 1/212.062 doações para o HIV). Estes dados mostram que a plataforma NAT Bio-Manguinhos-FIOCRUZ apresenta um bom desempenho operacional aplicado à rotina de triagem de doadores de sangue.

Palavras-chave: NAT, HIV, HCV, doadores de sangue, Santa Catarina, rendimento.

Abstract

The NAT testing HIV / HCV Bio-Manguinhos ® is a platform used in screening blood donors from public blood bank of Brazil, where the network consists of 14 testing laboratories installed in this transfusion centers. The screening through the methodology of nucleic acid amplification began in 2011 at the Center for Hematology of Santa Catarina. In the period from May 2011 to September 2013 were tested 424,125 samples of blood donors, 305,855 were from Santa Catarina state and 118,270 of the Rio Grande do Sul state. The percentage of agreement between tests and serological NAT reagents was 83.19 % to 94.63 % of HCV and HIV. Was detected in a sample in window period for HCV and two samples for HCV (1/424.125 donations for HCV and HIV 1/212.062 donations). These data show that the platform NAT Bio-Manguinhos/FIOCRUZ has good operating performance in screening of blood donors.

Key-words: NAT, HIV, HCV, blood donors, Santa Catarina, yield.

Introdução

O Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC foi o primeiro serviço hemoterápico a utilizar a plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem de doadores de sangue, utilizando técnicas de biologia molecular, com a participação no estudo piloto para a avaliação do desempenho desse conjunto diagnóstico.

O início do desenvolvimento da plataforma NAT brasileira ocorreu devido a uma demanda do Ministério da Saúde brasileiro e da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados devido ao elevado custo a ser pago pelo NAT comercial. Com as ações conjuntas do Departamento de Reativos de Bio-Manguinhos, juntamente com o Departamento de Virologia da UFRJ, e o Instituto de Biotecnologia do Paraná (IBMP), a equipe de virologistas e biólogos moleculares desenvolveu o kit diagnóstico e especificou os equipamentos necessários para a sua realização (CGSH, 2012).

Posteriormente esse produto, foi testado no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC devido a algumas características peculiares: informatização dos processos, centralização da triagem sorológica em um único laboratório situado no Hemocentro Coordenador de Florianópolis, por apresentar área física dedicada para o laboratório de biologia molecular e também pelas características epidemiológicas dos vírus HIV e HCV circulantes no estado (CGSH, 2009). Depois de concluída esta fase do projeto, o HEMOSC foi incluído no estudo multicêntrico, nos anos de 2010 e 2011, com o objetivo de avaliar o desempenho da plataforma NAT juntamente com os hemocentros de Pernambuco (HEMOPE), Rio de Janeiro (HEMORIO), Fundação Pró-Sangue de São Paulo (FPS), estes identificados como sítios testadores do NAT (SIT-NAT), além dos hemocentros do Rio Grande do Sul (HEMORGS), Rio Grande do Norte (HEMONORTE), Paraíba (HEMOIBA), Espírito Santo (HEMOES) e Hemonúcleo de Santos (HEMOSantos), como unidades referenciadoras e coletoras de amostras. O estudo foi finalizado com 219.791 amostras testadas (CGSH, 2012).

Devido à política de centralização da realização do NAT, a rede de laboratórios NAT compreende 14 serviços centralizados no Brasil, localizados em regiões estratégicas os quais foram definidos pelo Ministério da Saúde, com a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, conforme descrito na figura 1.

O ensaio NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® – FIOCRUZ

consiste na preparação de um *pool* ou conjunto de seis amostras (MP6) juntamente com uma partícula calibradora biossegura, a extração automatizada de ácidos nucleicos, sua purificação, amplificação e detecção com a técnica de PCR em tempo real. A apresentação do kit compreende 552 amostras (96 reações), sendo possível realizar na mesma reação amostras em minipool de seis amostras (MP6) e amostras individuais (DIACM, 2011). Para a realização de duas rotinas com 552 amostras são necessários apenas dois técnicos capacitados em uma jornada de 08 horas de trabalho.

O objetivo desse estudo foi de compilar os dados referentes às amostras detectadas para RNA HIV e HCV em período de janela, a concordância entre os resultados sorológicos para os testes anti-HCV e anti-HIV e NAT, e questões logísticas como: o tempo de liberação dos testes e as repetições da rotina: reações inválidas e rotinas perdidas.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no período de 02 de maio de 2011 a 30 de setembro de 2013. Este período foi escolhido devido ao fato de ser o início da utilização do NAT em 100% das doações realizadas em Santa Catarina no HEMOSC (Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina). O HEMOSC é composto por sete Hemocentros (Florianópolis, Blumenau, Criciúma, Chapecó, Lages, Joaçaba e Joinville) e três Unidades de Coleta localizadas em Canoinhas, Jaraguá do Sul e Tubarão. Devido ao número pouco expressivo de doações, os dados das Unidades de Coleta foram agregados aos dados dos hemocentros regionais de Joaçaba, Joinville e Criciúma respectivamente.

De acordo com o processo de centralização, o laboratório NAT localizado em Santa Catarina (HEMOSC) realiza os testes dos serviços de hemoterapia da rede pública do estado do Rio Grande do Sul e de serviços contratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como pode ser observado na figura 1, na qual estão marcados todos os laboratórios NAT do Brasil, incluindo informações referentes à data de início da realização das rotinas de triagem em doadores de sangue.

A conferência das amostras e a disponibilização dos resultados a estas unidades hemoterápicas ocorrem com a utilização do sistema web GSM-NAT (Sistema de Gerenciamento Multicêntrico, disponível através do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - DATASUS).

As informações referentes a estas doações foram obtidas do

sistema informatizado de gerenciamento de dados do hemocentro (HEMOSIS) já que todas as unidades da rede de Santa Catarina são integradas, e os dados das unidades referenciadoras do Rio Grande do Sul (três serviços em Porto Alegre e nove Serviços no interior do estado) foram obtidos do GSM-NAT.

Na triagem de doadores de sangue são utilizados no HEMOSC os testes laboratoriais apresentados no quadro 1. São realizados na rotina de triagem de doadores dois testes simultâneos para HIV (sendo um teste de quarta geração) e um teste que pesquisa de anticorpos para o HCV. Os testes de triagem utilizam metodologias de quimioluminescência (CMIA e CHLIA).

Devido ao elevado número de resultados falso-positivos inerentes a atividade de triagem de doadores para as doenças transmissíveis, houve a necessidade de caracterização dos casos de HIV e HCV reagente ou inconclusivos. Os casos de HIV foram classificados como inconclusivos quando um dos testes de triagem para anti-HIV apresentou resultado reagente ou inconclusivo e o outro teste apresentou resultado não reagente. Para o HCV foi utilizado o critério de valores de S/CO superiores a 3,0 como reagentes (ACAR ET AL., 2010; STRAMER et al 2012).

Os dados referentes às rotinas perdidas, repetições por resultados inválidos e falso-positivos foram obtidos dos formulários diários de registro das rotinas realizadas no laboratório NAT do HEMOSC.

O laboratório NAT do HEMOSC recebe as amostras procedentes da coleta de 16 serviços do estado do Rio Grande do Sul, devido à política de centralização do NAT em 14 laboratórios no país. Devido a dificuldades na obtenção de informações, dados referentes aos resultados sorológicos das amostras desse estado não foram obtidos. Somente o número total de amostras submetidas ao NAT e as janelas detectadas estão compilados esse estudo.

Resultados e Discussão

Entre maio de 2011 a setembro de 2013, foram testadas 424.125 amostras de doadores de sangue, sendo que 305.855 foram de Santa Catarina e 118.270 do estado do Rio Grande do Sul.

Em relação ao tempo de liberação dos resultados para as unidades que encaminham amostras, verifica-se que no caso das amostras de Santa Catarina e da capital do Rio Grande do Sul (Porto Alegre), estas amostras chegam entre 21:30 h e 4:30h. A rotina tem

início as 6:30 h da manhã, sendo disponibilizados os resultados até as 14:30h (correspondendo a cerca de 8:30h de trabalho). As amostras oriundas do interior do estado do Rio Grande do Sul chegam ao laboratório entre 08:30 h e 09:00h da manhã, sendo os resultados disponibilizados as 16:30 h.

Na tabela 1 verifica-se o desempenho operacional das rotinas realizadas no período de maio de 2011 a setembro de 2013. Foi observado que 1,15% das rotinas testadas foram consideradas inválidas devido a falhas nos controles do fabricante, ou nos equipamentos. Estudo publicado por pesquisadores franceses (ASSAL, et al., 2009), no qual foi realizado um comparativo entre as plataformas Tigris® e Cobas S201®, obteve uma taxa de baterias ou rotinas inválidas de 8,51 e 8,74% respectivamente.

Em relação ao número de amostras inválidas devido a falhas no calibrador interno (tabela 2), este mesmo estudo mostrou uma taxa de 0,41% para o Tigris® e 1,22% para o Cobas S201®. Já para o kit NAT Bio-Manguinhos este percentual foi de 0,79%. Coste e cols (2003) em outro estudo mostram que para a plataforma Procleix a taxa de corridas inválidas variou de 1 a 4%, para a plataforma Roche de 0,1 a 6% e para ensaios “*in house*” de 0 a 1,6%. Na Austrália, foi testada a plataforma Procleix para ensaios individuais e em *pool*. Nesse estudo foi obtido para os ensaios individuais, uma taxa de corridas inválidas de 2,9% e para os ensaios em *pool* de 4,2% (MISON et al., 2003).

O percentual de aproveitamento das placas de 96 reações (552 amostras) foi de 69% denotando que o laboratório ainda tem capacidade de processamento de amostras e que 31% das amostras estavam sendo testadas individualmente e não em MP6. Esse período foram testadas em média 930 amostras/dia (tabela 2). Este índice de aproveitamento precisa ser melhorado para um percentual de 80 a 90% já que este fato tem impacto sobre o custo dos testes realizados.

Nas tabelas 3 e 4 estão descritos os resultados obtidos para o NAT e na triagem com testes sorológicos. Verifica-se um grande número de amostras inconclusivas para HIV e HCV devido aos resultados falso-positivos associados a elevada sensibilidade das técnicas. Resultados inconclusivos correspondem a aproximadamente duas vezes mais casos do que os confirmados como reagentes (PHIKULSOD et al., 2009; STRAMER et al 2012). Os hemocentros com baixa frequência de casos reagentes como Joaçaba e Lages, apresentam um percentual significativo de resultados inconclusivos.

Até o momento foram identificadas três amostras com RNA viral detectado e com testes sorológicos negativos: uma para HCV em

Santa Catarina e duas para HIV no estado do Rio Grande do Sul (tabela 5), com um rendimento de 1/424.125 doações para o HCV e de 1/212.062 doações para o HIV. No estudo publicado com dados dos Estados Unidos e do Canadá, logo após a implantação do NAT, o ganho para o HCV é de 1/260.000 doações e para o HIV de 1/3150.000 para os dois países (STRAMER et al., 2000). Nota-se que não há semelhança entre o rendimento do NAT para HCV entre o Sul do país e os dados dos países da América do Norte.

Cabe ressaltar que houve três casos nos quais, houve resultados reagentes no teste anti-HIV Combo Architect com NAT reagente (com valores de S/CO < 2,0) e teste anti-HIV Prism não reagente. Se fosse utilizado na rotina de triagem de doadores somente um kit sorológico para a pesquisa exclusiva de anticorpos no período do estudo, em Santa Catarina o rendimento para o NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos seria de 1/101.952 doações o que denotaria um ganho expressivo.

O percentual de resultados concordantes entre sorologia e NAT (tabela 6) para as amostras de Santa Catarina foram de 83,19% para o HCV e de 94,63% para o HIV. No estudo publicado por Roth e colaboradores em 2012, mostrando os resultados da implantação do NAT em todos os continentes mostra que a taxa de resultados concordantes (NAT x Sorologia) varia muito para o HCV, correspondendo ao intervalo de 53,2 a 70,43%. Para o HIV, no entanto varia de 86,59 a 94,81%. Percebe-se que existe uma excelente concordância entre os resultados sorológicos e NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® quando os dados do laboratório são comparados aos da literatura.

Como limitação do estudo, pode-se citar a falta de dados das unidades hemoterápicas do estado do Rio Grande do Sul, que encaminham amostras ao laboratório NAT do HEMOSC, no que se refere à concordância com os testes sorológicos e NAT. Caso estes dados estivessem disponibilizados, poderia haver diferenças nos percentuais de concordância do NAT e sorologia.

Conclusão

Através dos resultados obtidos verifica-se que a plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® apresenta excelente desempenho na rotina, quando os resultados são comparados a estudos publicados referentes a outros sistemas de testagem comerciais e disponíveis para a utilização em serviços de hemoterapia. Cabe salientar o elevado percentual de concordância entre os testes sorológicos e NAT obtido em

Santa Catarina. Este desempenho confere ao sangue triado e transfundido em pacientes atendidos pelo SUS (Sistema Único de Saúde), maior segurança em relação quanto ao risco de transmissão do HIV e HCV.

Referências

ACAR A, KEMAHLI S, ALTUNAY H et al. The significance of repeat testing in Turkish blood donors screened with HBV, HCV and HIV immunoassays and the importance of S/CO ratios in the interpretation of HCV/HIV screening test results and as a determinant for further confirmatory testing. *Transfusion Medicine*, 2010 20: 152–159.

AZZEDINE A, et al. Comparison of the analytical and operational performance of two viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and Cobas S201. *Transfusion*, 2009, 49; 289-300.

CGSH, Ministério da Saúde. Projeto Multicêntrico: Avaliação da plataforma brasileira dos testes NAT *multiplex* HIV/HCV e seus processos na Hemorrede Oficial. Brasília, 2012 (dados não publicados).

CGSH, Ministério da Saúde. Projeto Piloto – Avaliação preliminar da plataforma brasileira de *multiplex* HIV/HCV e seus processos na rotina de um laboratório da Hemorrede Oficial. Brasília, 2009 (dados não publicados).

COSTE J, REESINK W, ENGLÉNRIET CP, LAPERCHE S. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sanguinis*, 2005: 88:285-303.

MISON L, SEED CR, MARGARITIS AR, HYLAND C AND THE ARCBS NAT Study Group. Nucleic acid technology screening of Australian blood donors for hepatitis C and human immunodeficiency virus-1 RNA comparison of two high-throughput testing strategies. *Vox Sanguinis* 2003 84:11-19.

PHIKULSOD, S et al. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Thai blood donations. *Transfusion*, 2009, 49: 1126–1135.

ROTH, WK ET AL. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis*, n. 102, p. 82–90, 2012.

STRAMER SL, CAGLIOTI S, STRONG, DM. NAT of the United States and Canadian blood supply. *Transfusion* 2000;40:1165-1163.

STRAMER SL, DODD RY, BRODSKY JP. The value of screening signal-to-cutoff ratios for hepatitis C virus antibody confirmation. *Transfusion*, 2013,53: 1497–1500.

VERMEULEN M, et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. *Transfusion*. 2009.Jun;49(6):1115-25.

Quadro 1 – Conjuntos de kits para diagnóstico utilizados no laboratório de sorologia do HEMOSC durante o período do estudo.

Kit para detecção de anti-HIV	Kit para detecção de HIV Ag/Ab	Kit para detecção de Anti-HCV	Confirmatórios
Anti-HIV 1, 2 O Prism Abbott Laboratories Wiesbaden, Alemanha	HIV Combo Architect Abbott Laboratories Wiesbaden Alemanha	Anti-HCV Prism Abbott Laboratories Wiesbaden, Alemanha	Anti-HIV Inno-Lia Score Anti-HCV Inno-Lia Score

Figura 1 – Hemocentros onde estão instalados os laboratórios NAT, mês e ano do início da realização das rotinas e localização geográfica (CGSH, 2013).

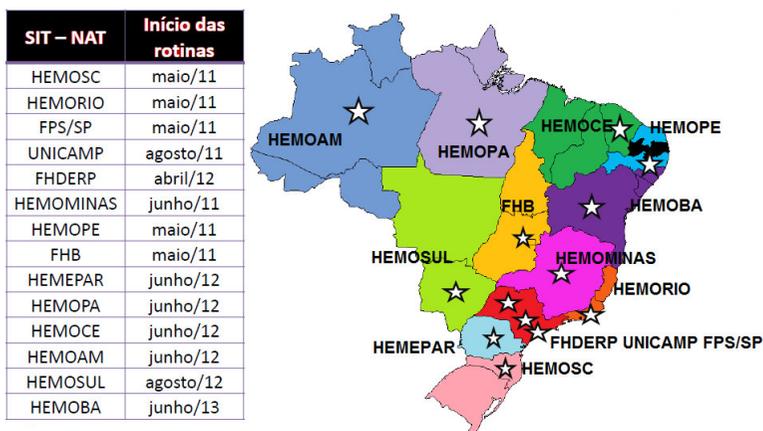


Tabela 1 – Desempenho das rotinas realizadas na plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos no período de maio de 2011 a setembro de 2013.

Características da rotina	Rotinas	Percentual
Total de rotinas realizadas	1.133	100%
Rotinas válidas	1.120	98,85%
Rotinas Inválidas	13	1,15%
Falhas nos controles	10	0,88%
Falhas nos equipamentos	3	0,27%

Tabela 2 – Desempenho da plataforma NAT em relação à repetição de amostras devido a ocorrência de problemas técnicos ou resultados falso-positivos no período de 2011-2013.

Repetições	Amostras	Percentual
Amostras testadas	424.125	100,00%
Repetição devido a resultados falsos positivos	649	0,15%
Repetições devido à partícula calibradora (Controle interno) inválido	3.365	0,79%
Média de amostras/ rotina realizada	379	-
Aproveitamento das placas/kits de reação	-	69%
Percentual de amostras testadas individualmente	-	31%

Tabela 3 - Resultados obtidos nas amostras de doadores submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® para o HIV.

Local	Amostras	HIV Reagente	%	HIV Inconclusivo	%	HIV NAT +	%
Florianópolis	47.917	43	0,09	77	0,16	41	0,09
Blumenau	38.478	20	0,05	50	0,13	18	0,05
Chapecó	45.319	54	0,12	62	0,14	50	0,11
Criciúma	70.678	76	0,11	105	0,15	74	0,10
Joaçaba	26.826	12	0,04	53	0,20	13	0,05
Joinville	54.591	66	0,12	86	0,16	67	0,12
Lages	22.046	13	0,06	30	0,14	14	0,06
Total	305.855	284	0,09	463	0,15	277	0,09

Tabela 4 – Resultados obtidos nas amostras de doadores submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® para o HCV.

Local	Amostras	HCV Reagente	%	HCV Inconclusivo	%	HCV NAT +	%
Florianópolis	47.917	23	0,05	43	0,11	20	0,04
Blumenau	38.478	15	0,04	39	0,09	14	0,04
Chapecó	45.319	56	0,12	38	0,05	53	0,12
Criciúma	70.678	82	0,12	61	0,23	82	0,12
Joaçaba	26.826	8	0,03	22	0,04	8	0,03
Joinville	54.591	22	0,04	49	0,22	18	0,03
Lages	22.046	18	0,08	18	0,01	19	0,09
Total	305.855	224	0,07	270	0,09	214	0,07

Tabela 5 – Janelas detectadas nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2013, utilizando a triagem com a plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos.

Estado	Amostras	HCV	Yield/doações	HIV	Yield/doações
Santa Catarina	305.855	1	1:305.855	0	-
Rio Grande do Sul	118.270	0	-	2	1:59.135
Total	424.125	1	1:424.125	2	1:212.062

Tabela 6 – Percentual de concordância entre o NAT, testes sorológicos e testes confirmatórios para o HCV e HIV.

Vírus	Sorologia Reagente	Imunoblot Reagente	NAT		Concordância
			Detectável	Não detectável	
HCV	119	119	99	20	83,19%
HIV	149	149	141	08	94,63%

ARTIGO IV - Estudo da estabilidade do RNA viral das amostras de doadores de sangue submetidas ao teste de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) na plataforma brasileira NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos-FIOCRUZ®.

Autores: Petry A¹, Kupek EJ², Ferreira E³, Baptista, PA³

¹ Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

² Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Saúde Pública

³ FIOCRUZ - Bio-Manguinhos – Laboratório de Desenvolvimento de Reativos

Resumo

A metodologia de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) utilizada na triagem de doadores de sangue para os vírus da hepatite C (HCV) e da imunodeficiência humana (HIV) apresenta a vantagem de redução no tempo de detecção destes agentes virais, proporcionando maior segurança às transfusões sanguíneas. Apesar da sensibilidade da técnica, fatores pré-analíticos podem interferir no resultado final, devido às características relacionadas à logística de transporte das amostras e a metodologia NAT empregada. O objetivo desse estudo foi avaliar a estabilidade das amostras de sangue doado, submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®. A implantação de uma plataforma de testagem com tecnologia nacional trouxe benefícios para o Brasil, como: o desenvolvimento tecnológico, a autonomia brasileira com a produção de um kit nacional e a redução nos custos dos testes. Na realização desse estudo foram verificadas as seguintes condições: tempo entre a centrifugação dos tubos e a realização dos testes associada à temperatura de acondicionamento das amostras. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as amostras de doadores de sangue e componentes submetidas ao NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® devem ser acondicionadas em temperaturas inferiores a 22°C por um período máximo de 168 horas (correspondente a sete dias) e centrifugadas até 144 horas (seis dias) após a coleta.

Palavras-chave: estabilidade, RNA, NAT, HIV, HCV, doadores de sangue, Brasil.

Abstract

The method of nucleic acid amplification (NAT) used in screening blood donors for hepatitis C and human immunodeficiency virus has the advantage of reducing the diagnostic window of time for these viral agents, providing greater safety to blood transfusions. Despite the sensitivity of the technique, pre-analytical factors can interfere with the final result, due to the characteristics related to the logistics of transporting the samples and methodology employed NAT. The aim of this study was to evaluate the stability of the samples of blood donors who underwent testing NAT HIV / HCV Bio-Manguinhos®. The implementation of a platform for testing with national technology brought benefits to Brazil, as technological development, the Brazilian autonomy with the production of a national kit and the reduction in testing costs. In this study were checked the following conditions: time between centrifugation tubes and test procedures associated with temperature sample packaging. According to the results, it was found that samples of blood donors tested for NAT HIV / HCV Bio-Manguinhos® should be conditioned at temperatures below 22°C for a maximum 168 hours (corresponding to seven days) and centrifuged up to 144 hours (six days) after the collection.

Key-words: stability, HIV, HCV, NAT, RNA, blood donors Brazil.

Introdução

A implantação do NAT (teste de amplificação de ácidos nucléicos) para a detecção dos vírus da hepatite C (HCV) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) nas Unidades Hemoterápicas Públicas do território brasileiro, foi concebida utilizando o processo de centralização da execução dos testes em 14 laboratórios instalados esses Hemocentros. Os laboratórios de testagem estão localizados em regiões geográficas estratégicas, segundo regulamentação do Ministério da Saúde Brasileiro. Com esta centralização, as amostras coletadas nos serviços de hemoterapia, destinadas ao NAT são encaminhadas aos centros de testagem (SIT-NAT) diariamente, para que os resultados dos testes sejam disponibilizados em tempo hábil para a liberação dos hemocomponentes.

A testagem das amostras é realizada com a plataforma NAT brasileira, utilizando o *kit* NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® (Rio de Janeiro, FIOCRUZ, Ministério da Saúde). Os kits NAT foram

desenvolvidos pela UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) em parceria com a FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e IBMP (Instituto de Biotecnologia do Paraná) e contaram com recursos financeiros disponibilizados pelo Ministério da Saúde com a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH). A implantação da triagem de doadores para o HCV e o HIV com a tecnologia desenvolvida nacionalmente trouxe um grande benefício tecnológico para o Brasil, com a produção nacional de insumos para testes de biologia molecular. Além disso, esta implantação proporcionou um custo menor na execução dos testes quando comparados com os custos dos kits comerciais licenciados e existentes no mercado internacional. O custo reduzido permitiu a implantação da tecnologia NAT na triagem dos doadores de componentes sanguíneos que serão transfundidos nos pacientes do Sistema Único de Saúde brasileiro. O kit produzido por Bio-Manguinhos apresenta registro de produto pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) do Ministério da Saúde Brasileiro, sendo que este registro somente foi concedido após ter sido avaliado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com o mesmo rigor dos protocolos aplicados aos kits comerciais NAT das empresas Novartis e Roche.

Sabe-se que um fator importante associado ao bom desempenho e a sensibilidade do NAT é a estabilidade do RNA viral presente nas amostras de sangue a serem testadas (JOSE et al., 2004). No Brasil o transporte das amostras é uma atividade crítica, já que o país tem dimensões continentais e variações no tempo de transporte e na temperatura ambiente são comuns entre as regiões brasileiras. Na região Amazônica, por exemplo, as amostras são transportadas com o transporte fluvial ou aéreo. A distância entre o SIT-NAT e as Unidades Coletadoras de Amostras (UCAs) ou Unidades Referenciadoras de Amostras (URAs) pode chegar a mais de 1.200 quilômetros em alguns estados brasileiros, sendo que o tempo entre o envio e a chegada das amostras pode ser superior a 24 horas.

Existe a preocupação dos serviços de hemoterapia e da CGSH, com a estabilidade do RNA dos vírus da hepatite C e da imunodeficiência humana adquirida nas amostras dos doadores de sangue, submetidas aos testes de amplificação de ácidos nucléicos. Advém dessa preocupação a realização desse estudo de estabilidade das amostras submetidas ao NAT no território brasileiro.

As amostras dos doadores de sangue utilizadas no NAT são coletadas em tubos PPT-K® (*Plasma Preparation Tube – BD Preanalytical Systems, Franklin Lake, NJ*), contendo K₂EDTA como

anticoagulante e gel separador composto por poliéster inerte, são centrifugadas em cada Serviço de Hemoterapia que realiza a coleta de sangue ou componentes por aférese, sendo manipuladas somente no laboratório NAT.

Estudos já foram realizados na tentativa de determinar a estabilidade do RNA das amostras. Para o HCV foram publicados os estudos de HALFON et al., 1996, DAMEN et al., 1998, CARDOSO et al., 1999, MOREAU DE GERBEHAYE, et al., 2002, JOSE et al., 2003. Para o HIV os estudos de BRUSTEIN et al., 1997, DICKOVER et al., 1998, GINOCCHIO et al., 1997, SEBIRE, et al., 1998, foram publicados. Estudos relacionados aos serviços de hemoterapia foram descritos por vários grupos de pesquisadores (LEE et al., em 2002, GESSONI et al em 2004, JOSE et al., 2004 e mais recentemente SCHULZE et al., em 2011). Este é o primeiro estudo brasileiro realizado nas condições da rotina com a utilização da técnica de amplificação de ácidos nucléicos utilizada na rotina dos hemocentros da rede pública.

A metodologia NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® é caracterizada como um teste qualitativo, sendo que os resultados das amostras com RNA detectável para HIV e/ou HCV, os controles positivos e a partícula calibradora (PC), em outras palavras o controle interno da reação, são expressos em *Cycle Threshold* (CT).

Material e Métodos

Nesse estudo foram coletadas 28 amostras de sangue total de dois indivíduos saudáveis e voluntários, correspondendo a 4,5 mL de sangue venoso em cada um dos 28 tubos PPT-K® com gel separador no laboratório NAT do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

Antes da punção venosa dos voluntários, foram preparados 192 tubos plásticos de extração do tipo *Falcon*® (15 mL), utilizados na realização da rotina NAT nos sítios testadores. Nesses tubos identificados, foram pipetados 500 µL de plasma comprovadamente negativo, caracterizado nos testes sorológicos e NAT, e 10 µL da partícula calibradora (controle interno) do kit NAT. Imediatamente estes tubos foram acondicionados em freezer a -80°C até o momento da retirada das alíquotas das amostras. Estes tubos, juntamente com as alíquotas de 100 µL retiradas das amostras-teste compuseram o *minipool* de 600 µL que foi utilizado na extração do RNA.

Após a coleta do sangue dos voluntários, as amostras de sangue

coletadas nos tubos PPT-K foram individualmente inoculadas com 10 µL de plasma HIV-1 + HCV preparado com a mistura entre uma bolsa de plasma HCV positivo e outra bolsa de plasma HIV positivo. A amostra HCV positiva foi caracterizada com a pesquisa de anti-HCV (*Prism Abbott Diagnostics* fabricado em *Wiesbaden*, Alemanha) e confirmada com imunoblot (*Inno-Lia HCV Score - Innogenetics* fabricado em *Gent*, Bélgica) e RNA detectável pelo kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®. A outra unidade que compôs o plasma positivo apresentou resultado anti-HIV reagente com as técnicas de triagem anti-HIV-1 e 2 *Prism* e Anti-HIV Combo *Architect* (*Abbott Diagnostics* fabricado em *Wiesbaden*, Alemanha), confirmada através do ensaio Imunoblot (*Inno-Lia HIV 1 e 2 Score - Innogenetics*, *Gent*, Bélgica) que se apresentou reagente e RNA detectável pelo kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®). Cada tubo de sangue coletado foi cuidadosamente homogeneizado com a inversão dos mesmos durante aproximadamente 15 segundos.

Os tubos PPT-K® foram separados em dois grupos: o primeiro grupo foi utilizado para determinar qual é a influência da temperatura de acondicionamento e do tempo de realização dos testes após a coleta em relação à estabilidade do RNA viral e o segundo grupo de amostras foi utilizado para verificar qual a influência do contato do plasma com células sanguíneas (centrifugação) e a temperatura de acondicionamento com a viabilidade do RNA viral. As amostras foram infectadas com os dois agentes virais, para a verificação da estabilidade do RNA dos vírus HIV e HCV simultaneamente.

Como controles da estabilidade do RNA viral (tempo=0), foram utilizados dois tubos de amostras imediatamente centrifugados após a inoculação com o plasma duplamente infectado. Para seu acondicionamento foi retirada uma alíquota de 200 µL de plasma e acondicionados 100 µL respectivamente em dois tubos de extração (*Falcon*®), sendo acrescentados aos 500 µL de plasma negativo previamente congelado a -80°C. Os tubos de extração após receberem a alíquota de 100 µL foram imediatamente acondicionados em freezer a -80°C.

Os 28 tubos foram separados em dois grupos: o primeiro formado por quatro tubos constituiu o grupo para estudo da influência do tempo entre a coleta das amostras, a temperatura de acondicionamento e a realização do teste e o segundo grupo formado por 24 tubos, no qual foi estudada a influência da centrifugação e da temperatura na realização do NAT.

a) Influência do tempo entre a coleta das amostras, a temperatura de armazenamento das amostras e a realização dos testes:

Foram separados quatro tubos PPT-K de amostras de cada voluntário, os quais foram imediatamente centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Um conjunto composto por um tubo de amostra de cada voluntário foi acondicionado em refrigerador de amostras (2 a 8°C), outro conjunto de tubos foi armazenado a temperatura ambiente (17 a 22°C) e os demais tubos restantes foram armazenados em estufa a 30°C. A temperatura de cada local de armazenamento dos tubos foi monitorada através do sistema de monitoramento de temperatura *Kooltrak*® (Kiedrich, Alemanha), durante todo o período de tempo do estudo em cada uma das condições estabelecidas para o acondicionamento das amostras.

O objetivo da utilização de alíquotas de 100 µL em 500 µL de plasma negativo foi o de simular a preparação do *minipool* de seis amostras (MP6) utilizado na rotina de execução do NAT.

A cada tempo (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas) após a coleta das amostras e a inoculação do plasma infectado, alíquotas de 100 µL foram retiradas e pipetadas nos tubos de extração como anteriormente descrito. A figura 1 descreve o desenho do estudo realizado.

b) Influência do tempo entre a separação das células do plasma e a temperatura de acondicionamento antes da realização do NAT.

Esta etapa do estudo de estabilidade foi realizada simultaneamente com o teste anterior, porém esse caso as amostras não foram centrifugadas. As 24 amostras de cada voluntário foram divididas em três grupos e acondicionadas em refrigerador, temperatura ambiente e estufa, conforme descrito anteriormente. Após cada tempo determinado (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a coleta), as amostras foram centrifugadas e delas foram retiradas duas alíquotas de 100 µL, que foram pipetadas nos respectivos tubos de extração. O desenho dessa etapa do estudo está detalhado na figura 2.

Todas as amostras foram testadas na plataforma NAT Bio-Manguinhos seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Os testes foram realizados após o descongelamento completo dos tubos de

extração.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do software *Stata* 12.0, sendo utilizada a técnica de regressão linear, ajustando os resultados pela temperatura de acondicionamento das amostras e pelo tempo entre a coleta e a realização dos testes.

Questões éticas

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina sob o número **CAAE:** 173.16613.1.0000.0110.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados através do fornecimento de kits NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos/FIOCRUZ® para a realização dos testes de estabilidade.

Resultados

A plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® não permite a quantificação da carga viral das amostras, por tratar-se de um teste qualitativo onde os resultados obtidos são expressos em CT (*Threshold Cycle* - “Ciclo Threshold”). O CT é definido como o ciclo no qual a fluorescência detectada de uma determinada amostra intercepta a linha de *threshold* acima do *background* de fluorescência, ou seja, onde tem início a fase exponencial. Este ponto permite a detecção exata e reproduzível do material amplificado. Cabe ressaltar que o valor do CT é inversamente proporcional à concentração de RNA das amostras.

A temperatura do acondicionamento das amostras, obtida com a utilização de dispositivos de monitoramento e do software *Kooltrak*® demonstraram que as amostras acondicionadas em refrigerador ficaram a uma temperatura entre 2-8°C, as amostras que ficaram a temperatura ambiente se mantiveram entre 17-22°C e as amostras em estufa foram conservadas à temperatura entre 27- 32°C.

Todas as amostras coletadas de cada voluntário e submetidas ao teste NAT apresentaram resultados detectáveis após a amplificação e os resultados das partículas calibradoras foram satisfatórios e validados, significando que não houve testes falhos.

Estabilidade do RNA do HCV

Na tabela 1 e na figura 3 estão demonstrados os resultados das amostras submetidas ao teste NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos. Em relação à influência do tempo entre a realização dos testes após a centrifugação das amostras, verifica-se que o CT do RNA do HCV se mantém muito semelhante (variação pouco significativa $\pm 2,47$) até 168 horas após a coleta das amostras, quando os resultados são comparados com o tubo controle.

No intervalo compreendido entre 0 hora e 192 horas, observa-se que houve um aumento significativo do CT do RNA-HCV em relação ao tubo controle, principalmente na temperatura de 30°C (8 CTs). Quando o valor do CT do tubo controle foi comparado com as deferentes temperaturas de acondicionamento das amostras: 2 a 8 °C, 17 a 22 °C e 30°C verifica-se que não existe significativa variação estatística ($p>0,01$), apesar de ser evidenciado que a temperatura ambiente apresenta resultados semelhantes aos obtidos nas amostras acondicionadas em refrigerador.

Quando analisados os resultados das amostras centrifugadas após o tempo de acondicionamento (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas), observa-se o mesmo comportamento frente à temperatura de armazenamento, porém a concentração do RNA sofre um decréscimo a partir da 144 horas de acondicionamento (figura 3), quando comparada com o tubo controle (tempo 0). Na tabela 1, nas amostras não centrifugadas, a maior variação de CT observada para o RNA do HCV foi de 8,15 CT (30,25 para 39,40 CT) para as amostras não centrifugadas e acondicionadas a 30°C durante o intervalo de 168 a 192 horas após a coleta.

Estabilidade do RNA do HIV

Na tabela 2 estão descritos os resultados obtidos para o RNA do HIV. Observa-se que, em comparação ao tubo controle, que é centrifugado imediatamente após a coleta, o RNA viral se manteve estável até 168 horas (Figura 1). Para as amostras não centrifugadas, observou-se uma pequena redução na concentração do RNA, no intervalo entre 144 e 168 horas após a coleta, quando se compara com o tubo controle (Figura 4). A diferença entre o CT da amostra controle e das médias das amostras acondicionadas a 30°C por até 192 horas foi de 33,42 a 34,54 correspondendo a uma diferença de 1,38 CT. Este

comportamento foi diferente do observado com o HCV onde a variação foi maior. Na figura 4, pode-se observar que em relação à temperatura de acondicionamento das amostras imediatamente centrifugadas, a temperatura de acondicionamento de 30°C parece causar um decréscimo na concentração de RNA do HIV, quando comparada ao CT do tubo controle. Quanto a estabilidade das amostras que foram centrifugadas nos diferentes tempos de acondicionamento, a temperatura e o tempo de acondicionamento para o HIV sofre uma pequena variação quando as amostras são centrifugadas até 168 horas após a coleta e se as mesmas estiverem mantidas na temperatura ambiente (17 a 22°C).

Discussão

O objetivo principal desse estudo foi de encontrar as condições pré-analíticas ideais para serem adotadas pelos laboratórios de testagem NAT e as unidades de coleta e de referenciamento das amostras, que utilizam o kit NAT HIV-HCV Bio-Manguinhos® no que se refere à centrifugação, transporte e acondicionamento das amostras destinadas aos testes de amplificação de ácidos nucleicos para HIV e HCV.

Este estudo foi realizado de forma a tentar simular as condições reais, mais semelhantes às condições da rotina de testagem das amostras de doadores de sangue, com o *minipool* de seis amostras (MP6) e utilização de controle interno de amplificação. A utilização de amostras duplamente infectadas (HIV+ HCV+) foi escolhida para tentar simular condições mais extremas onde dois RNAs virais estão na mesma amostra.

Os estudos realizados em 2011 por Schultze e colaboradores, utilizaram grupos de amostras separadamente para HIV e HCV, nos quais foram empregados métodos de triagem NAT que diferiam para cada um dos vírus. Esse estudo utilizaram-se tubos sem gel separador com anticoagulante EDTA. Os pesquisadores evidenciaram que as condições e que as amostras que se mantêm ideais para a realização dos testes são aquelas em que o plasma é removido do contato com as células sanguíneas e quando a temperatura de armazenamento é de 5°C. O uso de tubos com gel separador, como os utilizados na rotina dos SIT-NAT brasileiros, possibilita a separação das células, conseqüentemente mantendo o RNA mais estável (HOLODNIY et al., 2000, FERNANDES et al., 2009).

Os resultados obtidos comprovam que condições pré-analíticas (temperatura, centrifugação e tempo decorrido entre a coleta e a realização do NAT) podem interferir no resultado final da técnica,

quando se utiliza o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®.

Em relação ao aspecto visual das amostras, as que foram mantidas sem centrifugação em estufa a 30°C por até 144 horas apresentaram hemólise verificada após a centrifugação. Esta hemólise foi pouco significativa e não comprometeu o resultado final dos testes realizados.

Como uma das limitações do estudo, o número reduzido de amostras é um fator a ser considerado, porém os custos envolvidos na realização dos testes e as várias etapas na realização do estudo foram fatores que impossibilitaram um quantitativo maior de amostras a serem analisadas. Porém para o estudo de estabilidade este número de amostras parece ser significativo. O fato das alíquotas das amostras terem sido congeladas antes da realização dos testes não interferiu no desempenho dos testes, devido a estabilidade do RNA do plasma congelado como demonstrado por Jose et al., em 2004 e Baleriola e colaboradores em 2011. Outra limitação pode ser o uso de amostras co-infectadas simultaneamente com HIV e HCV.

As condições ideais nas quais os RNA do HCV e do HIV das amostras estão mais preservados são aquelas nas quais as amostras podem ser mantidas (transportadas e acondicionadas) em temperatura inferior a 22°C por 168 horas (correspondente a sete dias) e centrifugadas até 144 horas (seis dias) após a coleta.

Estar atento às condições ambientais de temperatura de acondicionamento, tempo entre a realização dos testes e o tempo até a separação do plasma das células com a centrifugação, tornam muito seguros os processos de transporte e centralização da realização do NAT, mesmo em longas distâncias e com variações de temperatura ambiente, garantindo a confiabilidade dos resultados dos testes realizados nas amostras.

Referências Bibliográficas

BALERIOLA C, JOHAL H, JACKA B, CHAVEROT S, BOWDEN S, LACEY S, RAWLINSON W. Stability of hepatitis C virus, HIV and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. *Journal Clinical Microbiology*, (2011):3163-3167.

FERNANDES, H, RAMANATHAN S, MOROSYUK TDO, RAINEN L. Evaluation of the effect of specimen handling conditions in BD Vacuotainer PPT on the stability of HIV-1 viral load using Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV test. *Annual Meeting of the Association for Molecular Pathology*, November 2009.

GERBEHAYE AIM, BODEUS M, ROBERT A, HORSMANS Y, GOUBAU P. Stable hepatitis C RNA detection by RT-PCR during four days storage. *BMC Infections Diseases*, 2002 ,2-22.

GESSIONI G, BARIN P, VALVERDE S, GIACOMINI A, DI NATALE C, ORLANDINI E, ARREGHINI N, DE FUSCO G, FRIGATO A, FEZZI M, ANTICO F, MARCHIORI G. Biological qualification of blood units. Considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfusion and Apheresis Science*, 2004(30):197-203.

GOMPERTS, ED. Gammagard® and reported hepatitis C virus episodes. *Clinical Therapeutics*, 1996(18):3-8.

GRANT PR, KITCHEN A, HEWITT JAJ, HEWITT P, SIMS CM, GARSON JA, TEDDER RS. Effects of handling and storage of blood on the stability of hepatitis C virus RNA: implications for NAT testing in transfusion practice. *Vox Sanguinis*, 2000(78):137-142.

HALFON P, KHIRI H, GEROLAMI V, BOURLIERE M, FERYN JM, REYNER P, GAUTHIER A, CARTOUZOU G. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *Journal of Hepatology*, 1996(25):307-311.

HOLODNIY M, RAINEN L, HERMAN S, YEN-LIEBERMAN B. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in *Vacuotainer PPT Plasma Preparation Tubes* during overnight shipment. *Journal Clinical Microbiology*, 2000 (38):1:323.

JOSE M, GAJARDO R, JORQUERA JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals*, 2005 (33):9-16.

LEE DH, LI L, ANDRUS L, PRINCE AM. Stabilized viral nucleic acids in plasma as an alternative shipping method for NAT. *Transfusion*, 2002(42): 409-413.

MEYER T, POLYWKA S, WULFF B, EDLER C, SCHRODER AS, WILKEMEYER I, KALUS U, PRUSS A. virus NAT for HIV, HBV and HCV in Post- Mortal Blood Specimens over 48h after death of infected patients – first results. *Transfusion Medicine Hemotherapie*, 2012(38):376-380.

SCHULTZE TJ, WEIB JL, BROCKMANN SG, HENNING H. Preanalytical stability of HIV-1 and HCV RNA: impact of storage and plasma separation from cells on blood donation testing by NAT. *Transfusion Medicine*, 2011(2):99-106.

Figura 1 – Desenho do estudo relativo à influência do tempo entre a coleta e a realização dos testes.

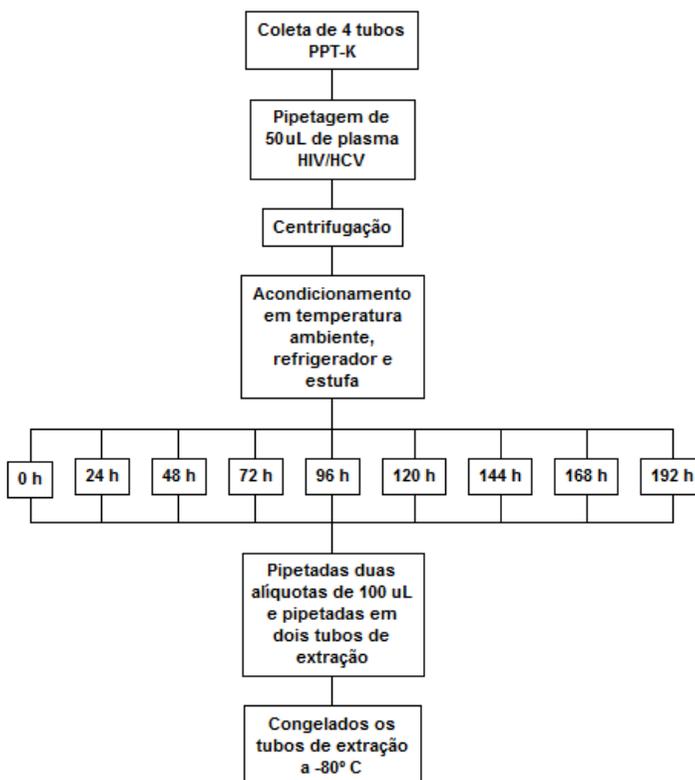


Figura 2 – Desenho do estudo da influência do tempo entre a separação das células e da temperatura de acondicionamento.

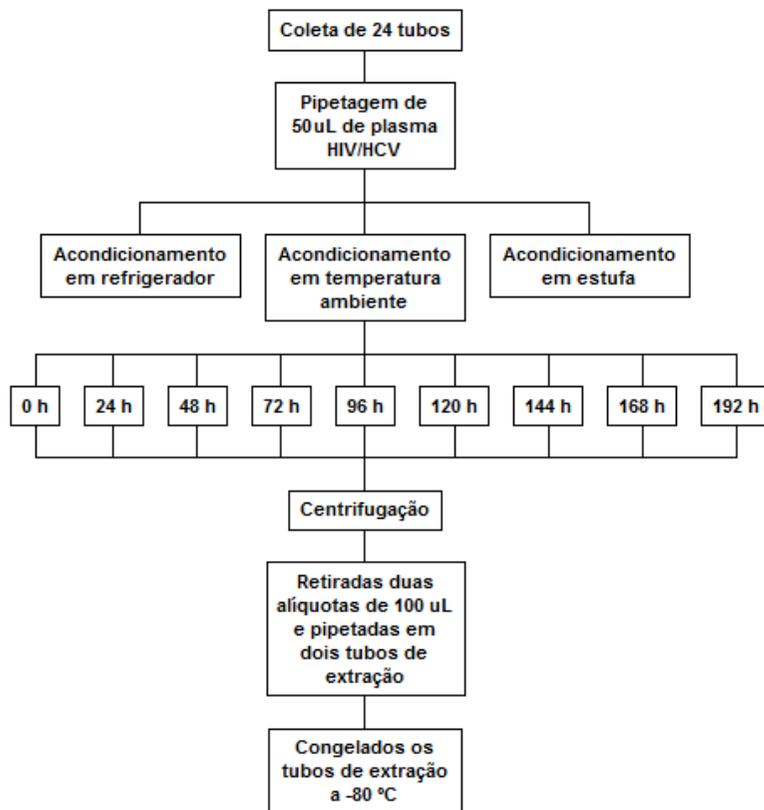


Figura 3 – Estabilidade do RNA do HCV em relação ao tempo de realização dos testes, a centrifugação e a temperatura de armazenamento das amostras. Comparativo entre amostras centrifugadas após a coleta em relação as não centrifugadas.

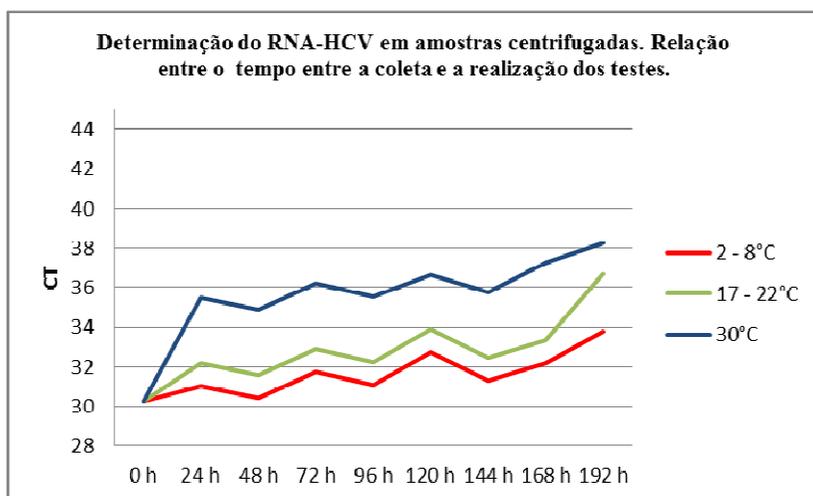
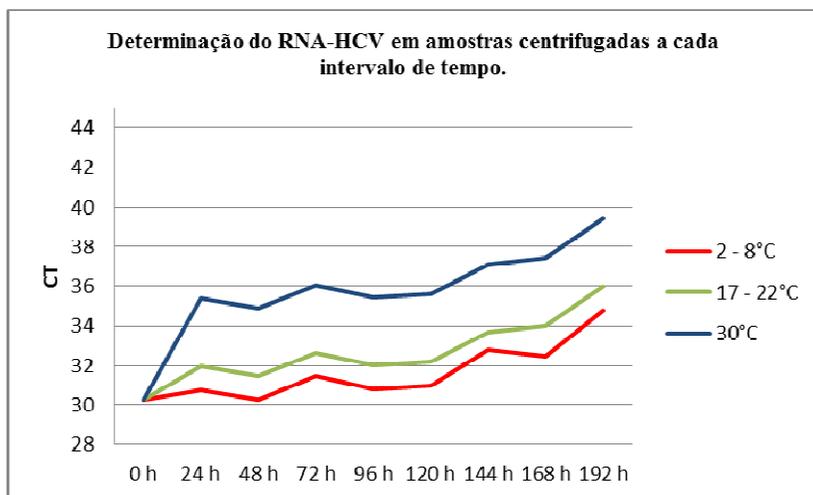


Figura 4 - Estabilidade do RNA do HIV em relação ao tempo de realização dos testes, a centrifugação e a temperatura de armazenamento das amostras. Comparativo entre amostras centrifugadas após a coleta em relação as não centrifugadas.

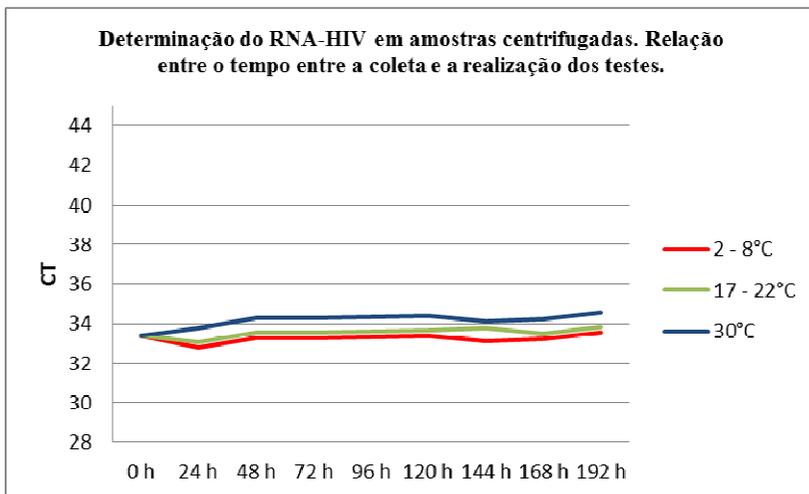
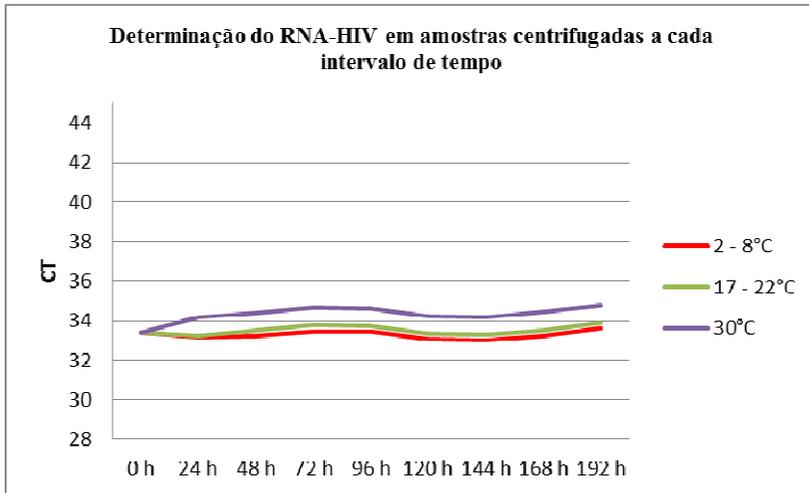


Tabela 1 – Resultados obtidos nas amostras, referentes à estabilidade do RNA viral do HCV expressos em CT com intervalo de confiança de 95%.

Temperatura de acondicionamento das amostras	2 a 8 °C				17 a 22 °C				30°C			
	Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação		Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação		Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação	
Tempo de armazenamento	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)
0	30,25	29,00 – 32,92	30,25	29,00 – 32,92	30,25	29,00 – 32,92	30,25	29,00 – 32,92	30,25	29,00 – 32,92	30,25	29,00 – 32,92
24	30,76	29,03 – 32,48	31,00	29,72 – 32,27	31,95	30,23 – 33,68	32,16	30,88 – 33,43	35,38	33,63-37,11	35,48	34,16 – 36,80
48	30,27	28,54 – 31,99	30,43	29,18 – 31,67	31,46	29,74 – 33,19	31,59	30,35 – 32,83	34,89	33,15 – 36,63	34,91	33,66 – 36,17
72	31,45	29,62 – 33,28	31,75	30,51 – 33,00	32,64	30,82 – 34,47	32,91	31,67 – 34,16	36,07	34,12 – 38,01	36,24	34,98 – 37,49
96	30,79	29,07 – 32,52	31,06	29,82 – 32,30	32,00	30,27 – 33,72	32,22	30,98 – 33,46	35,42	33,68 – 37,16	35,54	34,28 – 36,80
120	30,96	29,19 – 32,73	32,76	31,49 – 34,04	32,16	30,39 – 33,93	33,92	32,64 – 35,20	35,58	33,74 – 37,42	36,68	35,36 – 38,00
144	32,47	30,78 – 34,15	31,30	30,06 – 32,55	33,67	32,02 – 35,31	32,46	31,22 – 34,63	37,09	35,60 – 39,26	35,78	35,36 – 38,00
168	32,81	31,04 – 34,58	32,20	30,95 – 33,48	34,00	32,24 – 35,78	33,36	33,71 – 36,14	37,43	35,60 – 39,26	37,25	35,92 – 38,57
192	34,77	33,05 – 36,50	33,76	32,52 – 35,00	35,97	34,25 – 37,69	36,73	34,57 – 38,90	39,40	37,66 – 41,13	38,25	36,96 – 39,54

Tabela 2 – Resultados obtidos nas amostras, referentes à estabilidade do RNA viral do HIV expressos em CT (IC 95%).

Temperatura de acondicionamento das amostras	2 a 8 °C				17 a 22 °C				30°C			
	Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação		Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação		Amostras não centrifugadas		Amostras centrifugadas após a inoculação	
Tempo de armazenamento	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)	CT	CT (IC 95%)
0	33,42	32,81 – 34,03	33,42	32,81 – 34,03	33,42	32,81 – 34,03	33,42	32,81 – 34,03	33,42	32,81 – 34,03	33,42	32,81 – 34,03
24	33,20	33,79 – 33,58	32,78	32,36 – 33,19	33,26	32,87 – 33,66	33,06	32,64 – 33,48	34,16	33,77 – 34,56	33,76	33,34 – 34,19
48	33,23	32,84 – 33,63	33,31	32,91 – 33,72	33,51	33,12 – 33,91	33,59	33,19 – 34,00	34,41	34,01 – 34,81	34,30	33,89 – 34,71
72	33,48	33,06 – 33,90	33,29	32,89 – 33,70	33,76	33,34 – 34,18	33,57	33,17 – 33,98	34,66	34,22 – 35,10	34,28	33,90 – 34,71
96	33,46	33,06 – 33,86	33,35	32,95 – 33,76	33,73	33,34 – 34,13	33,63	33,22 – 34,10	34,63	34,24 – 35,03	34,33	33,87 – 34,68
120	33,05	32,66 – 33,45	33,42	33,02 – 33,83	33,33	32,94 – 33,73	33,70	33,29 – 34,10	34,23	33,84 – 34,63	34,41	34,00 – 34,81
144	32,99	32,59 – 33,40	33,10	32,71 – 33,51	33,27	32,87 – 33,68	33,78	33,48 – 34,23	34,17	33,76 – 34,59	34,09	33,68 – 34,49
168	33,63	33,23 – 34,02	33,56	33,15 – 33,96	33,91	33,51 – 34,30	33,83	33,43 – 34,24	34,80	34,41 – 35,2	34,54	34,14 – 34,95
192	33,24	32,85 – 33,62	33,25	32,86 – 33,65	33,52	33,14 – 33,89	33,53	33,15 – 33,92	34,42	34,03 – 34,81	34,25	33,84 – 34,63

ARTIGO V - Avaliação do Desempenho da Plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ na triagem de doadores de sangue: uso de controle de qualidade interno e inspeção lote a lote.

Autores: Petry A¹, Kupek EJ ², Oliveira MB³

¹ Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC

² Departamento de Saúde Pública – UFSC

³ Fundação Hemocentro de Minas Gerais - HEMOMINAS

Resumo

A utilização de controles de qualidade internos e lote a lote em reagentes utilizados na triagem de doadores para doenças infecciosas é uma obrigação descrita nas normas regulamentadoras da atividade hemoterápica brasileira. O objetivo desse estudo foi o de elaborar um protocolo de produção de painel de desempenho lote a lote ou remessa dos kits NAT HIV HCV Bio-Manguinhos® e controle de qualidade interno. Este protocolo de produção é importante para os laboratórios que executam o NAT, pois a utilização desses controles é uma exigência legal. No controle de qualidade interno foram utilizadas amostras em *pool*, para simular o mais aproximadamente a rotina de realização desses testes. Já o controle lote a lote foi preparado com a utilização de amostras diluídas em plasma com testes sorológicos não reagentes. Com o uso dos controles por um período de nove meses foi possível verificar que os mesmos apresentam grande estabilidade quando armazenados a temperatura de -80°C. A análise dos resultados dos 12 lotes recebidos no período de janeiro a setembro de 2013 permitiu verificar que os kits NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® apresentam excelente reprodutibilidade entre os mesmos, e que o controle de qualidade interno utilizado a cada uma das rotinas apresentou um coeficiente de variação médio para o HIV de 1,23% e para o HCV de 2,36%. A utilização desses controles assegura maior confiabilidade nos resultados dos testes executados nos laboratórios de testagem.

Palavras-chave: controle de qualidade, doadores de sangue, NAT, HIV, HCV

Abstract

The use of internal quality control and batch to batch reagents used in donor screening for infectious diseases is an obligation described in regulatory standards activity hemotherapy in Brazil. The aim of this study was to develop a protocol panel production performance batch to batch or shipment of kits NAT HCV HIV Bio-Manguinhos ® and external quality control (customer). This production protocol is important for laboratories that perform NAT assays, since the use of these controls is a legal requirement. In quality control extern samples were used in pool, to simulate more about the routine of performing these tests. But the control batch to batch was prepared by use of plasma samples diluted in negative. Through the use of controls for a period of nine months was possible to verify that they have great stability when stored at -80°C. Was verified by the results of the 12 lots received in the period January-September 2013. The kits NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® show excellent reproducibility between them, and that the internal quality control used for each of the routines presented a coefficient of variation for HIV and 1.23% to 2.36% of HCV. The use of these controls ensures greater reliability in the results of tests performed in the laboratory testing.

Palavras-chaves: quality control, HCV, HIV, NAT, blood donors.

Introdução

O uso de ferramentas de inspeção a cada recebimento de novo lote ou remessa do fornecedor e de controle interno das rotinas antes da disponibilização dos resultados nos laboratórios de testagem para doenças infecciosas em hemoterapia (sorologia e testes e amplificação de ácidos nucléicos - NAT) são requisitos legais e obrigatórios da legislação brasileira que regulamenta a atividade hemoterápica no país (BRASIL, 2013). A implantação desses controles de qualidade é um desafio, principalmente para os laboratórios responsáveis pela realização do NAT devido ao fato de inexistirem manuais ou normas que descrevem as práticas de produção, forma de utilização dos controles, interpretação dos resultados obtidos com estes controles a cada lote ou remessa ou na validação das rotinas.

Este artigo procura descrever de maneira prática um processo alternativo de preparação e implantação de painéis de desempenho lote a lote e de controles internos diários aplicados à plataforma NAT – Bio-

Manguinhos® disponibilizada aos serviços da Hemorrede pública brasileira, e que pode ser também uma opção para os serviços que utilizam outros fornecedores de kits NAT em sua prática diária. O kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® foi desenvolvido com o uma demanda do Ministério da Saúde brasileiro com o uma parceira formada pela UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro), pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e pelo IBMP (Instituto de Biotecnologia do Paraná) e contaram com recursos financeiros disponibilizados pelo governo brasileiro com a CGSH - Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH, 2009).

As plataformas são formadas por um conjunto de equipamentos, insumos e reagentes e são disponibilizados gratuitamente pelo Ministério da Saúde a quatorze centros de testagem distribuídos no território brasileiro. Estes laboratórios centralizam a realização de mais de 3.000.000 testes em amostras de doadores de sangue procedentes de serviços integrados ao SUS (Sistema Único de Saúde). Este sistema de saúde proporciona o acesso universal aos serviços de saúde no território brasileiro. Os laboratórios de testagem conhecidos como SIT-NAT estão distribuídos de forma geograficamente estratégica com o objetivo de facilitar o transporte das amostras, já que o Brasil é um país com extensão territorial continental e há a necessidade de realização dos testes de maneira o mais rápida possível a devido ao prazo de validade dos hemocomponentes, principalmente das unidades de concentrado de plaquetas, cuja validade está entre 3 e 5 dias (CGSH, 2012).

Os kits diagnósticos NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®, são fornecidos no formato de 96 reações, sendo empregados para a detecção simultânea do HIV (vírus da imunodeficiência humana adquirida) e HCV (vírus da hepatite C) a ser utilizado exclusivamente em serviços de hemoterapia, visando reduzir o risco transfusional de transmissão desses agentes. A metodologia NAT da plataforma brasileira é *multiplex*, a qual combina a detecção simultânea do HIV e HCV, e tem como base a técnica de PCR em tempo real. O NAT foi desenvolvido para a detecção do ácido nucleico viral no período que precede a produção sistêmica de anticorpos, sendo que a reação de amplificação é baseada em alvos RNA e requer a etapa de transcrição reversa, já que os vírus apresentam genoma RNA. O fluxo metodológico consiste no preparo das amostras em *minipool* composto por seis amostras ou individual, pela etapa de extração e purificação de RNA e pelas etapas de amplificação e detecção com a técnica de PCR em tempo real (DIACM, Bio-Manguinhos, 2011).

A legislação brasileira (Brasil, 2013) determina que os laboratórios que realizam triagem para doenças infecciosas em doadores

de sangue, a cada lote recebido pelo laboratório ou a cada nota de remessa do fornecedor os kits sejam submetidos a testes antes de sua utilização na rotina. Uma das funções do uso do controle de qualidade lote a lote ou a cada remessa de kit NAT, é a de avaliar se as condições de transporte dos kits foram obedecidas e que sua integridade foi mantida até a chegada ao laboratório que realizará os testes.

O controle interno, com concentração conhecida é responsável pelo monitoramento frequente da reprodutibilidade de um ensaio analítico. Seu objetivo é de verificar se a variabilidade do processo está controlado, identificando desvios para a eliminação de causas. É uma oportunidade para que ocorra o aprimoramento das atividades executadas no laboratório, buscando sempre a melhoria da qualidade dos serviços prestados (OLIVEIRA e MENDES, 2011).

O objetivo da utilização do controle de qualidade interno é de avaliar diariamente a ocorrência de erros laboratoriais, uma possível perda de sensibilidade dos testes e avaliar o desempenho dos equipamentos utilizados na rotina dos testes laboratoriais (FERREIRA, et al 1998; BRASIL, 2005; BRASIL, 2013). Além disso, seu uso assegura o cumprimento de todos os procedimentos estabelecidos para a rotina do laboratório e o monitoramento da precisão dos resultados com a construção de gráficos de controle (figura 3), com o propósito de corrigir eventuais erros que possam ocorrer (CURA e WENDEL, 1994).

Material e Métodos

O kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® apresenta como característica principal a de ser um reagente para diagnóstico, que detecta simultaneamente e de maneira discriminatória o HIV, o HCV e o controle interno da reação representado pela partícula calibradora (PCA) responsável por validar cada reação e que acompanha todas as etapas de execução da técnica. Os equipamentos que compõe a plataforma brasileira NAT estão descritos no Quadro 01.

A apresentação do kit é composta por três módulos: controles, amplificação e extração, sendo possível a realização de no máximo 552 amostras (92 *pools* de seis amostras). Cada módulo apresenta diferentes formas de conservação: o módulo de controle é armazenado na faixa de temperatura de -80°C a -60°C, o módulo de amplificação é mantido de -30°C a -10°C e o módulo de extração é armazenado entre 15 e 25°C.

A cada rotina são utilizados quatro controles do fabricante: dois negativos e dois controles positivos (HIV e HCV) que são responsáveis pela validação da rotina. A partícula calibradora que valida cada reação é

adicionada a cada *minipool* de amostras. Este controle apresenta-se quantificado (10.000 cópias/mL) e é responsável pela validação individual de cada uma das reações.

As amostras dos doadores de sangue utilizadas no NAT são coletadas em tubos *BD Vacutainer PPT-K®* com gel separador composto por material inerte e são centrifugadas em cada Serviço de Hemoterapia que realiza a coleta de sangue ou componentes por aférese e são manipuladas somente nos laboratórios NAT.

A metodologia NAT é caracterizada como um teste qualitativo, sendo que os resultados das amostras com RNA detectável para HIV e/ou HCV, os controles positivos e a partícula calibradora (PCA), são expressos em *Cycle Threshold* (CT).

Preparo e utilização do painel de desempenho lote a lote

Na produção dos painéis de desempenho foram utilizados duas unidades de plasma fresco congelado previamente testado e negativo para todos os testes sorológicos e NAT e destinado a transfusão, uma unidade de plasma NAT HIV RNA detectado (teste *Prism Abbott®* reagente, teste *Architect Abbot®t* reagente e *Inno-Lia Innogenetics®* anti-HIV 1 e 2 reagente) e uma unidade NAT HCV RNA detectado (*Prism – Abbott®* reagente, *Architect Abbott®* reagente e *Inno-Lia anti-HCV Innogenetics®* reagente).

No preparo inicial dos controles as duas unidades positivas (HIV e HCV) foram misturadas em quantidades iguais já que seria necessário que a solução-mãe fosse composta por ambos os agentes virais, já que o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® tem a capacidade de diferenciar a presença dos dois vírus. As duas bolsas apresentavam um CT inicial correspondente a 23,4 para o HIV e 24,2 para o HCV.

Após a mistura e homogeneização do controle o mesmo foi submetido ao NAT em diluições seriadas com plasma negativo variando de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 e 1/640 com o objetivo de determinar o valor do CT correspondente a cada diluição. Estes testes foram realizados em triplicada para cada diluição e foram testadas individualmente e a diluição foi realizada com as unidades de plasma negativo selecionadas previamente com o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® lote 120NT031Z. Os valores obtidos em cada réplica estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Para efeito de praticidade, foram escolhidas seis diluições das amostras para serem utilizadas na preparação dos painéis, visto que as rotinas necessitam de amostras em múltiplos de seis. Após a realização

dos testes, a partir da solução mãe foram realizadas as diluições seriadas escolhidas. Foram preparados 40 mL de cada diluição, obedecendo aos cuidados de preparo e homogeneização e posteriormente foram alicotados 1000 uL em tubos novos PPT-K previamente identificados com a diluição respectiva para a constituição do painel. Antes do armazenamento uma amostra do painel foi submetida novamente ao NAT para verificar se a diluição estava correta. Estando os valores de CT dentro do esperado, as alíquotas dos painéis foram congeladas em freezer a temperatura de -80°C .

A cada lote novo de kit que chega ao laboratório, um painel é descongelado e incluído na rotina em duplicada, com o objetivo de avaliar o desempenho do lote a ser utilizado. Para a análise do desempenho dos lotes, foi criada uma planilha de controle e nela são digitados os valores obtidos do CT para os vírus e para cada diluição respectiva, sendo calculada a média das duas determinações de cada diluição e de cada um dos vírus.

Preparo do controle de qualidade interno

O controle de qualidade interno foi preparado utilizando a matriz produzida com as duas unidades de plasma (HIV e HCV), ambas reagentes nos testes de triagem, confirmatórios e no NAT que foram descritas previamente, na produção do controle lote a lote.

Para caracterização do controle interno, foram utilizadas as diluições 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320. Diferente do painel de desempenho, as amostras do controle de qualidade interno devem seguir todas as etapas de execução do NAT. Para isso foram preparados tubos PPT-K® contendo 500 uL de plasma negativo, para que juntamente com as diluições escolhidas, fizesse parte da composição de um *pool* de amostras. Dessa forma cada diluição foi testada em *pool*, juntamente com 05 tubos de plasma negativo. As diluições submetidas ao teste (em *pool*), em duplicata, apresentaram os seguintes resultados: 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160 e 1/320 de acordo com as tabelas 3 e 4.

Entre os resultados obtidos, foi selecionada a diluição correspondente a 1/40 devido a sua maior proximidade com os resultados da partícula calibradora do kit ($33 \pm 2,46$ CT).

Resultados e Discussão

Uso do controle de qualidade lote a lote

A implantação do controle lote a lote ocorreu em janeiro de 2013 e até setembro de 2013, 12 diferentes lotes foram inspecionados. Os resultados obtidos nos lotes podem ser visualizados nas figuras 1, para o HIV e na figura 2 para o HCV. Existe uma grande reprodutibilidade entre os lotes analisados (em vermelho está representado o lote novo e a linha azul o painel validado).

De acordo com os resultados obtidos nas figuras 1 e 2, pode-se evidenciar que os lotes do kit NAT Bio-Manguinhos demonstraram excelente reprodutibilidade quando diferentes lotes foram submetidos ao mesmo lote de painel de desempenho, para ambos os vírus. Por se tratar de um produto diagnóstico novo, este é um fato que denota que o produto tem excelente padrão de qualidade.

A utilização de amostras diluídas e a apresentação gráfica dos resultados obtidos pode auxiliar o laboratório no momento da análise e aprovação de um novo lote antes de sua utilização na rotina. Em relação ao painel de desempenho e o armazenamento a -80°C durante os nove meses desse estudo não prejudicaram o desempenho dos mesmos.

Uso do controle de qualidade interno

A implantação do controle de qualidade interno ocorreu em janeiro de 2013, no mesmo período da implantação do controle interno. Todas as rotinas nas quais o controle interno foi utilizado foram validadas pelo critério, de mais ou menos dois desvios padrões em relação à média obtida na caracterização do controle interno (figura 3). Estes resultados demonstram que com o uso do controle interno produzido no laboratório mostram que o sistema de testagem é estável e que há grande reprodutibilidade entre as rotinas realizadas.

Em todas as rotinas os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica com o objetivo da construção de gráfico de controle semelhante ao utilizado para os laboratórios de sorologia (FERREIRA et al., 1998; CURA & WENDEL, 1994). O coeficiente de variação (%) foi calculado através do coeficiente entre desvio padrão e média dos resultados, sendo obtido um valor de para o HIV durante o período de janeiro a setembro de 2013 de 1,23% e de 2,36% para o HCV. Este coeficiente mostra que o desempenho do kit entre as rotinas é bastante estável. Dessa forma é possível evidenciar a reprodutibilidade e precisão do teste. O estudo publicado por Coste et al em 2003, mostrou que alguns países utilizavam os chamados “controles de qualidade da corrida

externos”, que na maioria eram variou de 0 a 3,24%.

É possível verificar na figura 3, no gráfico do controle positivo do fabricante que houve uma alteração na concentração no final do mês de janeiro de 2013, a qual foi informada por Bio-Manguinhos a todos os usuários do kit com o comunicado aos clientes.

A utilização de amostra duplamente infectada para HIV e HCV, no caso do controle de qualidade pode ser uma limitação do estudo, visto que, em tubos separados, seria possível a verificação da pipetagem individual para os vírus. Outra limitação seria a necessidade de quantificação da carga viral das amostras controle, pois, segundo recomendações do “*Guideline*” Europeu, recomenda que este controle apresente um valor três vezes maior do que o limite de detecção da técnica utilizada. Apesar dessa recomendação, verifica-se que a maioria dos países da Europa, Ásia e América do Norte utilizavam valores mais altos (COSTE et al., 2003). No caso do kit NAT Bio-Manguinhos os controles internos deveriam apresentar a concentração de 1800 UI/mL or amostra.

Conclui-se com este estudo que os laboratórios usuários do kit NAT Bio-Manguinhos podem fazer uso desse método de preparo de painéis de desempenho de lote e de controle de qualidade interno e que os mesmos podem ser eficazes, viáveis economicamente e que podem ser uma alternativa a ser utilizada no monitoramento diário das rotinas e a cada lote ou remessa de kits recebidos.

Referências Bibliográficas

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 302. Brasília, Diário Oficial da União, 14 de outubro de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RDC 57, Brasília, Diário Oficial da União, 16 de dezembro de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria 2.712, Brasília, Diário Oficial da União, 13 de novembro de 2013.

CAMARINHA GC, MEDEIROS JUNIO N, LOPES RM. In: OLIVEIRA CA, MENDES ME (org.). Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1 ed. Rio de Janeiro, 2011, v. 2, pp 97-126.

CGSH, Ministério da Saúde. Projeto Multicêntrico: Avaliação da plataforma brasileira de testes NAT *multiplex* HIV/HCV e seus processos na Hemorrede Oficial. Brasília, 2012 (dados não publicados).

CGSH, Ministério da Saúde. Projeto Piloto – Avaliação preliminar da plataforma brasileira de testes NAT *multiplex* HIV/HCV e seus processos na rotina de um laboratório da Hemorrede Oficial. Brasília, 2009 (dados não publicados).

COSTE J, REESINK W, ENGELFRIET CP, LAPERCHE S. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sanguinis*, 88:285-303, 2005.

CURA E, WENDEL S. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para Los Laboratorios de Serologia de Los Bancos de Sangre. *Organizacion Panamericana de La Salud*, pp 30-33, 1994.

DIACM, Bio-Manguinhos – FIOCRUZ. Manual de Treinamento NAT. 3ª Versão, pp 25-35, 2011.

FERREIRA, AGP et al. Controle de Qualidade Interno de Testes Sorológicos. TELELAB. Brasília, Ministério da Saúde, 1998.

Quadro 1 – Equipamentos que compõe a plataforma NAT – HIV/HCV Bio-Manguinhos® - FIOCRUZ: etapas e tempo de execução.

Equipamento - Fabricante	Etapa	Tempo de execução
Janus® – Perkin Elmer	Pipetagem das amostras e da partícula calibradora	2 horas
MDX® – Qiagen	Extração e purificação de RNA	2 horas e 40 min
Janus® – Perkin Elmer	Pipetagem do PCR setup	30 minutos
ABI 7500®- Life-Thermo	Amplificação e detecção	2 horas e 30 min

Tabela 1 – Valores de CT obtidos nas diluições seriadas para o RNA do HIV:

Diluição	Réplica 1 HIV	Réplica 2 HIV	Réplica 3 HIV	Réplica 4 HIV	Média HIV
1/10	26,60	26,40	26,50	26,40	26,50
1/20	27,70	27,40	27,20	27,70	27,50
1/40	28,40	27,90	28,70	28,50	28,40
1/80	30,70	29,60	29,40	29,10	29,40
1/160	30,40	30,50	30,10	30,70	30,40
1/320	31,40	31,30	30,50	31,70	31,20
1/640	32,50	32,70	32,20	32,30	32,40

Tabela 2 – Valores de CT obtidos nas diluições seriadas para o RNA do HCV:

Diluição	Réplica 1 HCV	Réplica 2 HCV	Réplica 3 HCV	Réplica 4 HCV	Média HCV
1/10	26,50	26,00	27,00	26,50	26,50
1/20	27,00	27,10	26,90	27,10	27,00
1/40	28,20	27,60	27,90	28,90	28,20
1/80	29,00	30,50	29,20	29,00	29,40
1/160	30,20	30,20	30,40	29,90	30,10
1/320	30,90	30,90	30,60	30,30	31,00
1/640	31,40	31,30	31,10	31,00	31,20

Tabela 3 – Valores de CT obtidos nas diluições seriadas em pool de seis amostras para o RNA do HIV.

Diluição	Réplica 1 HIV	Réplica 2 HIV	Réplica 3 HIV	Réplica 4 HIV	Média HIV
1/10	29,1	29,5	28,1	30,1	29,2
1/20	30,2	30,1	30,5	30,0	30,2
1/40	32,4	32,7	31,9	32,4	32,3
1/80	35,6	35,8	35,7	35,8	35,7
1/160	38,7	37,6	37,6	38,1	38,0
1/320	42,0	41,5	40,4	40,1	41,0

Tabela 4 – Valores de CT obtidos nas diluições seriadas em pool de seis amostras para o RNA do HCV.

Diluição	Réplica1 HCV	Réplica 2 HCV	Réplica3 HCV	Réplica 4 HCV	Média HCV
1/10	28,7	28,6	28,1	29,1	28,6
1/20	29,2	29,7	29,4	29,5	29,4
1/40	31,4	31,5	31,8	31,0	31,4
1/80	35,6	36,5	37,1	35,0	36,1
1/160	38,7	38,4	38,1	38,2	38,3
1/320	41,5	41,4	40,3	40,4	40,9

Figura 1 - Gráficos de desempenho do controle de qualidade lote a lote dos kits NAT HIV HCV Bio-Manguinhos® para o HIV (em vermelho está representado o novo lote e em azul o resultado esperado).

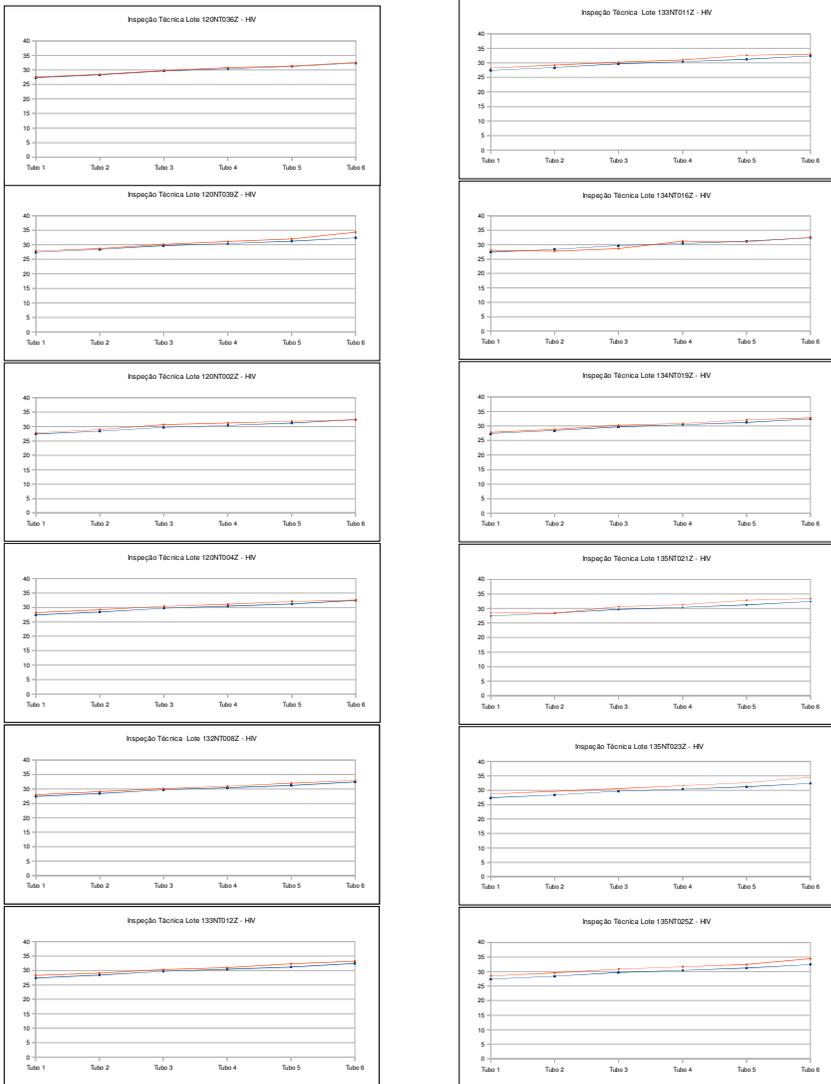


Figura 2 - Gráficos de desempenho do controle de qualidade lote a lote dos kits NAT HIV HCV Bio-Manguinhos® para o HCV (em vermelho está representado o novo lote e em azul o resultado esperado).

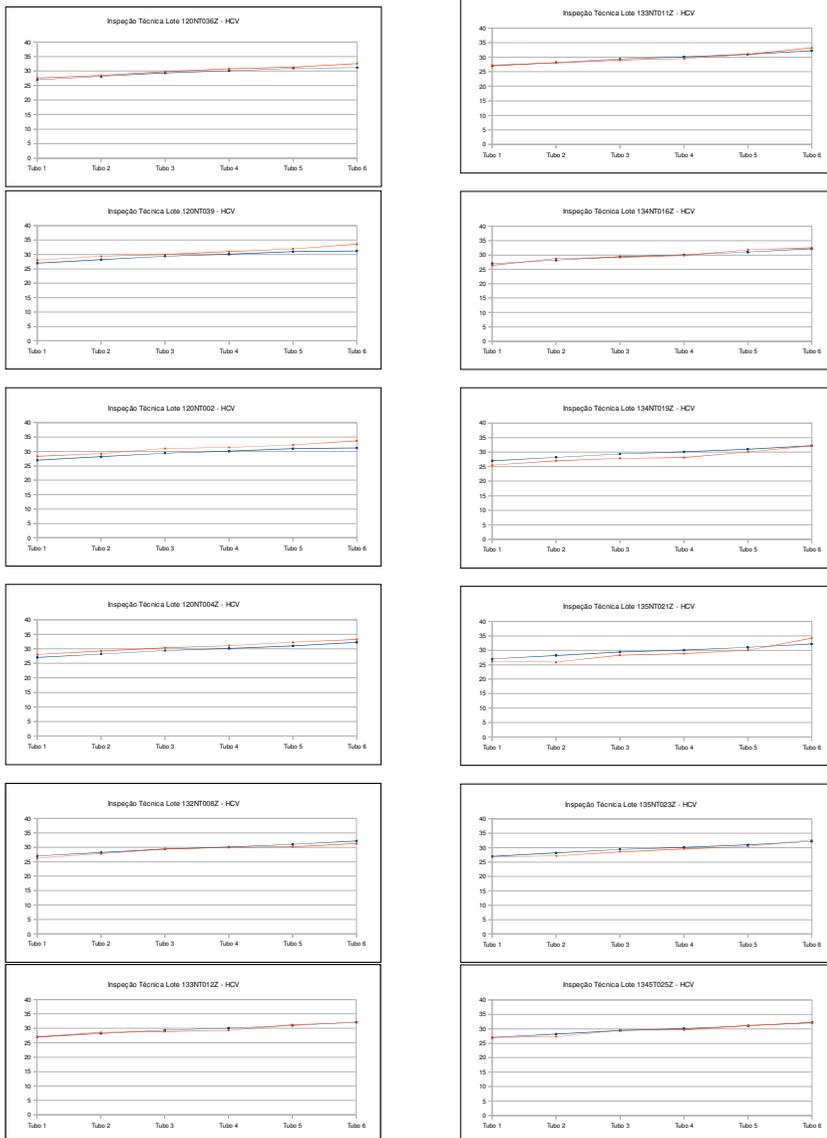
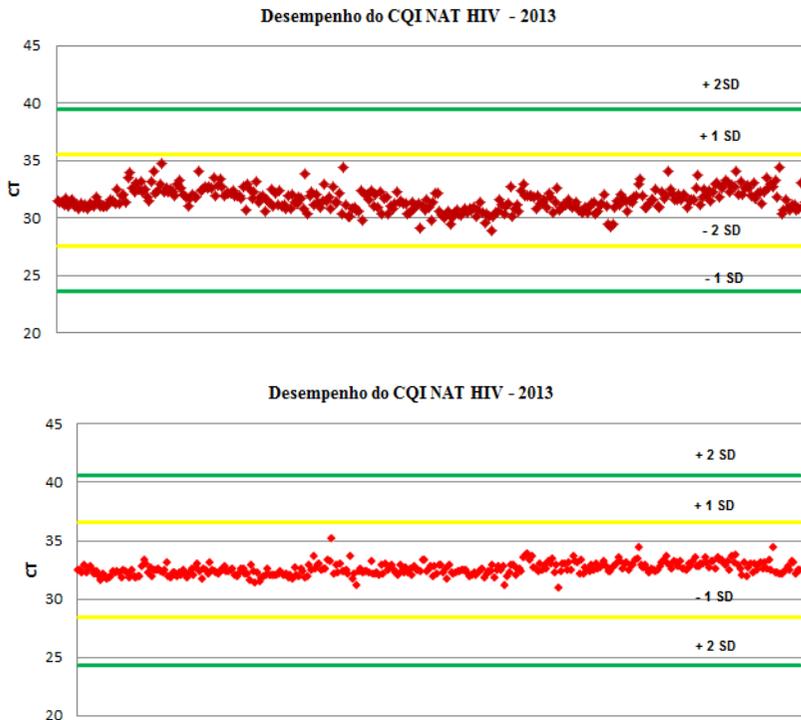


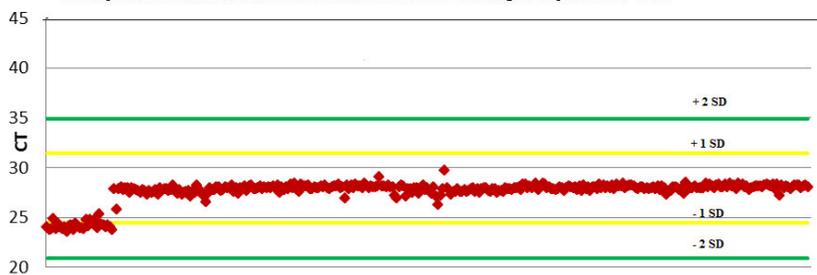
Figura 3 – Apresentação gráfica dos resultados obtidos em relação ao controle de qualidade interno para os vírus HIV e HCV submetidos ao kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®, dos controles positivos do fabricante e da partícula calibradora do controle negativo, no ano de 2013, no laboratório NAT do HEMOSC.



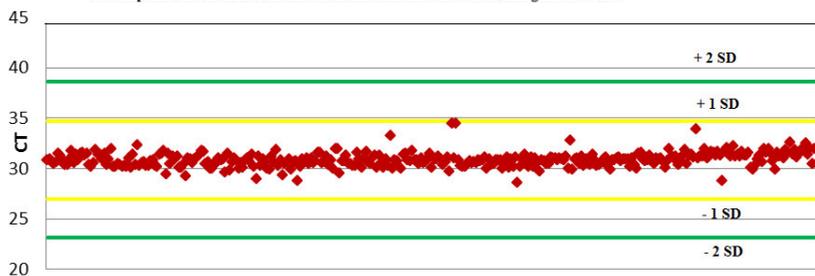
Desempenho do Controle do Fabricante do Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos para o HIV - 2013



Desempenho do Controle do Fabricante do Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos para o HCV - 2013



Desempenho da Partícula Calibradora do Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos - 2013



III - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses anos de desenvolvimento, implantação e utilização na rotina dos serviços de hemoterapia, o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® sofreu descrédito por parte de alguns segmentos da sociedade, que não acreditavam no seu desempenho, nem na sua aplicabilidade na rotina dos Hemocentros. Porém a Hemorrede Brasileira sempre acreditou esse produto e na sua efetiva implantação e utilização na rotina de triagem de doadores de sangue.

Verificaram-se vários aspectos relacionados à implantação e utilização na rotina dos testes de amplificação de ácidos nucléicos na triagem para o HIV e HCV em doadores de sangue: em relação às questões epidemiológicas verificou-se a redução do risco residual, a prevalência e a incidência para o HIV e HCV antes e após a implantação do NAT e a experiência do laboratório SIT-NAT do HEMOSC na utilização do kit na sua rotina de triagem. Também foram discutidos aspectos logísticos relacionados à fase pré-analítica, como a estabilidade das amostras, e relacionados à fase analítica, como o preparo e utilização do controle de qualidade. Evidenciou-se a importância do NAT para o Brasil, os esforços do Ministério da Saúde para que o sangue doado no território brasileiro tenha menor risco de transmissão de HIV e HCV aos receptores. Cabe ressaltar ainda o ganho do país em termos tecnológicos e na redução de custos de triagem das amostras, quando se compara os custos do NAT brasileiro com os valores dos testes que são praticados no mercado internacional.

O kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos® pode ser considerado um marco em relação ao diagnóstico e triagem laboratoriais para doenças infecciosas no Brasil, devido a dois aspectos principais: a constatação que houve aumento na segurança do sangue e componentes transfundidos em relação ao HIV e HCV, e também devido ao desenvolvimento tecnológico que retirou o país da posição de refém absoluto de grupos internacionais produtores de kits diagnósticos nessa área. Os avanços tecnológicos obtidos com a implantação do NAT com certeza poderão ser aplicados a outros segmentos nos serviços de saúde vinculados ao SUS, que visam à melhoria da saúde da população e podem ser voltados para as ações preventivas na área diagnóstica. Infelizmente o Brasil ainda não detém a tecnologia voltada ao desenvolvimento de equipamentos para a área diagnóstica.

Observou-se que 13 transmissões de HIV e três de HCV foram evitadas no período do estudo (2011-2013), o que já justifica a implantação dessa tecnologia nos serviços de hemoterapia, bem como o investimento financeiro realizado pelo Ministério da Saúde. Mesmo com este ganho, ainda podem ocorrer casos em que o NAT não detecta o agente viral, como o descrito no artigo publicado (Anexo I), que trata do relato de um caso onde a transmissão do HIV ocorreu em fase de janela diagnóstica, que pode ser confirmada com o uso de técnicas de sequenciamento do genoma viral, sendo realizada a análise comparativa entre os vírus do doador e receptor.

Cabe ressaltar ainda que, por se tratar de novo produto para diagnóstico, o kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®-FIOCRUZ está sujeito a processos de melhorias, um dos quais se refere ao aumento da sensibilidade do teste. Outra mudança que ocorrerá em um futuro próximo, e que está em fase de desenvolvimento é a possibilidade de detecção dos vírus da hepatite B e dengue nas amostras de doadores, com este mesmo conjunto diagnóstico.

Outro aspecto a ser destacado é a publicação da portaria 2.712 de 13 de novembro de 2013, a qual torna obrigatória a triagem NAT para o HCV e o HIV na totalidade das bolsas de sangue coletadas no território brasileiro pelos serviços hemoterápicos o que torna o sangue transfundido mais seguro para os receptores.

Em relação aos aspectos logísticos, foi possível estabelecer o período máximo para que as amostras sejam centrifugadas e processadas após a coleta, bem como a temperatura ideal para o armazenamento dos tubos de coleta.

Foi possível demonstrar a produção e utilização do controle de qualidade interno e do controle lote a lote, os quais apresentam custo baixo, são de fácil execução e pode ser preparados em todos os laboratórios que utilizam a plataforma NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos®. Além disso, pode ser constatada grande reprodutibilidade entre os lotes recebidos tanto para a detecção do HIV quanto para o HCV.

Espera-se que novos estudos possam ser realizados em continuidade ao que foi desenvolvido nesta tese, principalmente associados ao rendimento do NAT HIV/HCV e cálculo do risco residual para toda a Hemorrede Pública, pois é de grande importância a divulgação de dados referentes à segurança transfusional para a comunidade médica e científica mundial.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR A et al. The significance of repeat testing in Turkish blood donors screened with HBV, HCV and HIV immunoassays and the importance of S/CO ratios in the interpretation of HCV/HIV screening test results and as a determinant for further confirmatory testing. **Transfusion Medicine**, n.20, pp.152–159, 2010.

AL SHAER L et al. Trends in prevalence, incidence, and residual risk of major transfusion-transmissible viral infections in United Arab Emirates blood donors: impact of individual-donation nucleic acid testing, 2004 through 2009. **Transfusion**, v.52, n.11, p.230-9, nov, 2012.

ALMEIDA-NETO C et al. Prevalence of serological markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. **Transfusion**, n. 53, p. 827-834, 2013.

ALTUGLU I et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. **International Journal of Infectious Diseases**, n.12, p.9-44, 2008.

ALVAREZ DO BARRIO M et al. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. **Euro Surveillance**, v.10, n.2, p. 20-2, 2005.

ANVISA, O teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) e as demais estratégias para detecção dos vírus HIV-1 e HCV na triagem do sangue doado. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias de Saúde**, ano II, n.3, nov, 2007.

AUBUCHON JP, BIRKMEYER JD, BUSCH MP. Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. **Ann Intern Medicine**,n.127, p.904-909, 1997.

BARBARA, JAJ. NAT: perspectives of cellular components, **Biologicals**, n.27, p.333-336, 1999.

BARRETO CC et al. Prevalence, incidence and residual risk of human immunodeficiency virus among community and replacement first-time

blood donors in São Paulo, Brazil. **Transfusion**, n.45, p.1709-14, 2005.

BEER, N et al. Accuracy of hepatitis C virus core antigen testing in pools among seroconverters. **Transfusion**, n.46, p.1822-8, 2006.

BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAT) para Detecção dos Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da Hepatite C (HCV) - Relatório nº 26, de 2013. Disponível em <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Relatorio_NAT_Final.pdf.> Acesso em 25 set. 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue, 2004, p.19.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC** nº 302, de 13 de outubro de 2005, Brasília, 14 out. 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 262**, publicada em DOU em 06 de fevereiro de 2002 (Disponível online <http://e-legis.anvisa.gov.br>). Acesso em 10.10.2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 1407**, publicada em DOU em 01 de agosto de 2002 (Disponível online <http://e-legis.anvisa.gov.br>). Acesso em 10.10.2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 79**, publicada em DOU em 31 de janeiro de 2003 (Disponível online <http://e-legis.anvisa.gov.br>). Acesso em 10.10.2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 112**, publicada em DOU em 30 de janeiro de 2004 (Disponível online <http://e-legis.anvisa.gov.br>). Acesso em 10.10.2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria 2.712**, publicada em DOU em 13 de novembro de 2013 (Disponível online <http://e-legis.anvisa.gov.br>). Acesso em 10.12.2013.

BUSCH MP, et al. Time course of detection of viral and serological

markers preceding HIV-1 seroconversion; implications for blood and tissue donor screening. **Transfusion**, n.35, p. 91-97, 1995.

BUSCH MP. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. **Transfusion**, n.40, p.143-149, 2000.

CABLE R, LELIE N, BIRD A. Reduction of the risk of transfusion-transmitted viral infection by nucleic acid amplification testing in the Western Cape of South Africa: a 5-year review. **Vox Sang**, fev, v.104, n.2, p.93-9, 2013.

CAMARINHA GC; MEDEIROS JUNIO N, LOPES RM. IN: OLIVEIRA, CA; MENDES, ME (org.). **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. 1ªed. Rio de Janeiro, 2011, v. 2, p. 97-126

CANDOTTI D, ALLAIN JP. Molecular virology in transfusion medicine laboratory. **Blood Transfusion**, n. 11, p. 203-16, 2013.

CARDOSO MS, KOERNER K, KUBANEK B. Minipool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV: preliminary results. **Transfusion**, n.38, p.905-7, 1998.

CGSH, Ministério da Saúde. **Projeto Multicêntrico: Avaliação da plataforma brasileira de testes NAT *multiplex* HIV/HCV e seus processos na Hemorrede Oficial**. Brasília, 2012 (dados não publicados).

CGSH, Ministério da Saúde. **Projeto Piloto – Avaliação preliminar da plataforma brasileira de testes NAT *multiplex* HIV/HCV e seus processos na rotina de um laboratório da Hemorrede Oficial**. Brasília, 2009. (dados não publicados).

COSTE J et al. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. **Vox Sanguinis**, n.88,. 285-303, 2005.

CORNET JK, KIRN TJ. Laboratory diagnosis HIV in adults: a review

of current methods. **Clinical Infection Diseases**, n. 57, v 5, p 712-18.2013

CURA E, WENDEL S. **Manual de Procedimientos de Control de Calidad para Los Laboratorios de Serologia de Los Bancos de Sangre**. Organizacion Panamericana de La Salud, p. 30-33, 1994.

DAWSON, GJ. HCV core antigen and combination antigen/antibody assays for the detection of early seroconversion. **Journal of Medical Virology**, v.9, p S54–S58, 2007.

DE ALMEIDA-NETO C et al. Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. **Transfusion**, n.53, pp.827–834, 2013.

DELWART E, KUHNS MC, BUSCH MP. Surveillance of the Genetic Variation in Incident HIV, HCV, and HBV Infections in Blood and Plasma Donors: Implications for Blood Safety, Diagnostics, Treatment, and Molecular Epidemiology. **Journal of Medical Virology**, v. 9, n.78, pp.S30–S35, 2006.

DIACM, FIOCRUZ. **Manual de Treinamento NAT**, 2011.

DWYRE DM, FERNANDO LP, HOLLAND PV. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. **Vox Sanguinis**, n.100, pp.92-98, 2011.

EVANGELISTA GBB; MELO HT. **Manual operacional para o processo de implantação e rotina dos testes de ácidos nucléicos (NAT) em serviços de hemoterapia (MOP-NAT)**. Brasília, 2012.

FERREIRA AGP. et al. **Controle de Qualidade Interno de Testes Sorológicos**. TELELAB, 1998.

FIEBIG EW et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, n.17, pp.1871-9, 2003.

FLANAGAN P, SNAPE T. Nucleic acid technology (NAT) testing and the transfusion service: a rationale for implementation of minipool

testing (editorial). **Transfusion Medicine**, n. 8, p. 9-13, 1998.

GAMPERTS ED. Gammagard® and reported hepatitis C virus episodes. **Clinical Therapeutics**, v 8, supl. B, p. 3-9, 1996.

GLYNN SA, et al. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. **Transfusion**, n.45, p.994-1002, 2005.

HOURFAR MK, et al. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. **Transfusion**, v.48, n.8, p.1558-66, ago, 2008.

JACKSON BR, ET al. The cost-effectiveness of NAT for HCV, HIV and HBV in whole-blood donations. **Transfusion**, n.43, p.721-9, 2003.

JAPANESE RED CROSS NAT SCREENING RESEARCH GROUP. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors. **Japanese Journal of Infection Diseases**, v.53, n.53, p.116-23, jun. 2000. Erratum in: **Japanese Journal of Infection Diseases**, v.53, n.5, p.219, out, 2000.

JARVIS LM et al. Detection of HCV and HIV-1 antibody negative infections in Scottish and Northern Ireland blood donations by nucleic acid amplification testing. **Vox Sanguinis**, v.89, n.3, p.128-34, out. 2005.

JOSE M, GAJARDO R, JORQUERA JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. **Biologicals**, n.33, p.9-16, 2005.

KALIBATAS V, KALIBATIENĖ L. The results of nucleic acid testing in remunerated and non-remunerated blood donors in Lithuania. **Blood Transfusion**, v.25, p.1-5, jul.2013.

KALIBATAS V. The results of nucleic acid testing for viruses in individual donor test and its importance for the safety of blood]. **Medicina (Kaunas)**, v.44, n.10, p.791-8, 2008. Lithuanian. (acesso ao

abstract)

KANDATHIL, AJ et al. Molecular epidemiology of HIV. **Indian J Med Res**, n.121, p.333-44, 2005.

KLEIN HG. How safe is blood, really? **Biologicals**, n.38, p.100-104, 2010.

KLEINMAN SH, LELIE N, BUSCH MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. **Transfusion**, n.49, p.2454-2489, 2009.

KOSAN E, et al. Can the nucleic acid amplification test (NAT) be an alternative to the serologic tests? A prospective study, the results of 18,200 blood donors from the Turkish Red Crescent. **Transfusion Apherisis Science**, v.43, n.3, p.269-72, 2010.

KOSAN E, et al. Can the nucleic acid amplification test (NAT) be an alternative to the serologic tests? A prospective study, the results of 18,200 blood donors from the Turkish Red Crescent. **Transfus Apherisis Science**, v.43, n.3, p.269-72, dez. 2010.

KUPEK^a, E. Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991-99. **Journal of Viral Hepatitis**, n.8, p.78-82, 2001.

KUPEK^b, E. The reduction of HIV transfusion risk in southern Brazil in the 1990s. **Transfusion Medicine**, v.11, n.2, p.75-78, 2001.

KUPEK E. Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. **Brazilian Journal of Infection Diseases**, v.8, n.3, p.236-240, 2004.

LAJOLO, C.P.; LANGHI JR, D.M.; MARQUES JR, J.F.C. ELISA negativo com NAT positivo. Uma realidade em Hemoterapia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n.4, p.330-1, 2008.

LAPERCHE S et al. HIV antibody screening remains indispensable for ensuring viral safety of blood components despite NAT implementation. **Transfusion**, n.43, p.1428-32, 2003.

LASKUS, T. et al. Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. **Gastroenterology**, n.127, p.764-76, 2004.

LEE, D et al. Stabilized viral nucleic acids in plasma as an alternative shipping method of NAT. **Transfusion**, n.42, p.409-13, 2002.

LEVI JE et al. Replacement of HIV p24 Ag test by a multiplex RT-PCR method for primary screening of blood donors. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.49, n.3, p.171-6, mai-jun.2007.

MACHUCA A, HEWLLETT I. Riesgo residual de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en bancos de sangre e impacto del cribado con pruebas de detección de ácidos nucleicos. **Medical Clinical (Barcelona)**, v.121, n.11, p.418-25, 2003.

MAKROO RN et al. Multicenter evaluation of individual donor nucleic acid testing (NAT) for simultaneous detection of human immunodeficiency virus -1 & hepatitis B & C viruses in Indian blood donors. **Indian Journal Medicine Research**, v.127, n.2, p.140-7, 2008.

MARESCH, C et al. Residual infectious disease risk in screened blood transfusion from a high-prevalence population: Santa Catarina, Brazil. **Transfusion**, n.48, v.2, p.276-81, 2008.

MCCUTCHAN, F.E. Global Epidemiology of HIV. **Journal Medicine Virology**, n. 78, p. S7-S12, 2006.

MINE H et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive *multiplex* reagent in Japan. **Journal of Virology Methods**, v. 112 n.1-2, p.145-51, 2003.

O'RIORDAN J, WILLIAMS P, DONNELAN J. HCV and HIV_1 donor screening using nucleic acid amplification technique (NAT). **Vox Sanguinis** Nov, v. 89, n.4, p.266, 2005.

O'BRIEN SF, YI QL, FAN W, SCALIA V, KLEINMAN SH, VAMVAKAS EC. Current incidence and estimated residual risk of transfusion-transmitted infections in donations made to Canadian Blood

Services. **Transfusion**, v.47, n.2, p.316-25, fev.2007.

OFFERGELD R, FAENSEN D, RITTER S, HAMOUDA O. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. **Euro Surveillance**, v.10, n.2, p.8-11, fev. 2005.

PETERSEN P.H. et al. Proposed Guidelines for the Internal Quality Control of Analytical Results in the Medical Laboratory. **Europe Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, n. 34, p.983-999, 1996.

PHIKULSOD S. et al. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Thai blood donations. **Transfusion**, v. 49, n.6, p.1126-35, 2009.

PILLONEL J et al. Epidemiological surveillance of blood donors and residual risk of blood-borne infections in France, 2001 to 2003. **Transfusion Clinical Biology**. v.12, n.3, p.239-46, jul. 2005.

ROTH WK et al. NAT and viral safety in blood transfusion. **Vox Sanguinis**, n.78, suppl. 2, p.257-9, 2000.

ROTH WK, SEIFREID, E. Yield of futures issues of nucleic acid testing. **Transfusion Clinical Biology**, n.8, p.282-4, 2001.

ROTH WK et al. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. **Transfusion**, n.42, v.7, p.862-8, jun. 2002.

ROTH, WK et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. **Vox Sanguinis**, n. 102, p. 82–90, 2012.

SABINO EC et al. Human immunodeficiency virus prevalence, incidence, and residual risk of transmission by transfusions at Retrovirus Epidemiology Donor Study-II blood centers in Brazil. **Transfusion**, n.52, p.870–879, 2012.

SABINO EC et al. Estimated risk of transfusion-transmitted HIV infection in São Paulo, Brazil. **Transfusion**, v. 39, n.10, p.1152, 1999.

SCHREIBER, G.B. et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. **New England Journal of Medicine**, Jun 27;334, n.26, p.1685-90, 1996.

SCHULTZE, T.J. et al. Preanalytical stability of HIV-1 and HCV RNA: impact of storage and plasm separation from cells on blood donation testing by NAT. **Transfusion Medicine**, n.21, p.99-106, 2011.

SCURACCHIO, P.S. et al. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid amplification technology. **Transfusion, Medicine**, v.17, n.3, p.200-4, 2007.

SEED CR et al. Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV and HCV NAT donor screening in Australia and the implications for future HBV NAT. **Transfusion**, n.42, p. 1365-1372, 2003.

SGOUROU A et al. Procleix Ultrio transcription-mediated amplification vs. serological blood screening in south-western Greece. **Transfusion Medicine**, v.18, n.2, p.104-11, abr. 2008.

SHAN H, et al. A multi-Chinese blood center study testing serologic-negative donor samples for hepatitis C virus and human immunodeficiency virus with nucleic acid testing. **Transfusion**, v.47, n.11, p.2011-6, nov. 2007.

SPADA C, SOUZA MA, TREITINGER, A. Estimation of the residual risk for the transmission of HIV in blood donos from the mountain region of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n.6, p. 489-93, 2005.

STRAMER SL, DODD RY, BRODSKY JP. (2013), The value of screening signal-to-cutoff ratios for hepatitis C virus antibody confirmation. **Transfusion**, n.53, p.1497–1500, 2013.

STRAMER SL et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing.

New England Journal of Medicine, v.351, n.08, p.760-68, 2004.

STRAMER SL. Nucleic acid testing for transfusion-transmissible agents. **Current Opinion Hematology**, v.7,n.6, p.387-91, 2000.

STRAMER SL. Viral diagnostics in the arena of blood donor screening. **Vox sanguinis**, n.87 supl.2, p.180-183, 2004.

TAKATU P.M. et al. NAT detection in a blood donor at HIV antigen and antibody window period. First case reported in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n.25 (S2), p.239, 2003.

TAYLOR, B.S et al., The challenge of HIV-1 subtype diversity. **New England Journal of Medicine**, n.358, p.1590-602, 2008.

TOMONO T, et al. Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV: experience in Japan. **Development Biology (Basel)**, n.108, p.29-39, 2002.

VELATI C et al. Impact of nucleic acid amplification technology (NAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003). **Euro Surveillance**, n.10, v.2, p.12-4, fev.2005.

VELATI C et al. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. **Transfusion**, v.48, n.10, p.2205-13, out. 2008.

VERMEULEN M et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. **Transfusion**, v.49, n.6, p.1115-25, jun.2009.

VERMEULEN, M.; LELIE, N.; REDDY, R. Recent insights in testing for transfusion transmissible viral infections. **ISBT Science Series**, n.6, p.229-233.

WHO, **Universal Access to Safe Blood Transfusion**. Geneve, 2008. Disponível em <http://www.who.int/bloodsafety/publications/UniversalAccesstoSafeBT.pdf>. Acesso em 08 de junho de 2012.

WILLIAMSON, L.M.; HEPTONSTALL, J.; SOLDAN K. A SHOT in the arm for safer blood transfusion. **Bio Med Central Journal**, v.313, n.3067, p.1221-2, 1996.

WILLKOMMEN H, SCHMIDT I, LOWER J. Safety issues for plasma derivatives and benefit from NAT testing. **Biologicals**, n.27, p.325-331, 1999.

ZOU S et al. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. **Transfusion**, v.50, n.7, p.1495-504, jul.2010.

IV ANEXOS

5.1 – Artigo Publicado

TRANSFUSION
MEDICINEOfficial Journal of
the British Blood Transfusion Society

Transfusion Medicine | ORIGINAL ARTICLE

Case report of a haemovigilance investigation using phylogenetic analysis of HIV-1 in Brazil

A. R. Pinto,¹ A. Petry,² T. Grifó,¹ R. Vandresen² & E. Kupek²¹Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil, ²Centre for Haematology and Haemotherapy of the State of Santa Catarina (HEMOSC), Florianópolis, Brazil, and ³Department of Public Health, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

Received 26 July 2011; accepted for publication 08 November 2011

SUMMARY

Objectives: The aim of this work is to provide the first report of a transfusion-acquired HIV-1 infection and to verify transmission from the donor to the recipients using phylogenetic analysis of HIV-1 DNA sequences in a Brazilian blood bank.

Background: Although haemovigilance procedures based on phylogenetic analysis of HIV have been reported in several countries, this type of study has yet to be conducted in Latin America.

Materials and Methods: Upon identifying a HIV-1-positive repeat blood donor by enzyme immunoassay (EIA) blood screening, all recipients of the donor's previous donation were identified and tested for HIV-1 by EIA, nucleic acid amplification test and HIV-1 DNA sequencing and phylogenetic analysis.

Results: One of the recipients tested positive for HIV-1. The phylogenetic analysis showed a high genetic similarity among the viruses, thus supporting the hypothesis of transmission from the donor to the recipient.

Conclusions: Phylogenetic analysis of HIV-1 DNA sequences has been a decisive tool in verifying suspected transmission of the virus from blood donor to recipient in Brazil.

Key words: blood donation, HIV, phylogenetic analysis, transfusion.

Haemovigilance is a set of procedures aimed at improving blood transfusion safety by reducing transfusion complications, among which TRALI (transfusion-related acute lung injury) has received particular attention (Fleisland, 2007). In the 21st century, significant advances have been made to better coordinate haemovigilance systems in place, both within and outside the countries (Faber, 2009). Despite these efforts,

under-reporting of transfusion complications is still a major problem even in developed countries. In Brazil, the notification of serious transfusion complications is mandatory. When a health authority receives such notification, the Brazilian Ministry of Health guidelines instruct the officials to contact the state blood bank association which then initiates a haemovigilance investigation (Ministério de Saúde, 2003). First, blood bank computerised donor records are searched to identify the donors who donated the blood components involved in the transfusion suspected to have caused the complications. Second, the donors are verified for subsequent donations and possible positive test results by serology screening. If no subsequent donation took place, the donors are invited for serology testing at a blood bank. For all investigations, suspected donors' plasma, which had been frozen at -20°C following their last donation, is submitted for serological testing. In the case of suspected HIV transmission, these tests involve enzyme immunoassay (EIA), Western blot and polymerase chain reaction (PCR) for HIV.

In the last decade, Brazilian Ministry of Health has created two computerised national databases for haemovigilance known as SINEPS and HEMOVIGI, as well as an electronic publication of the main results (Ministério de Saúde, 2010). However, under-reporting of transfusion complications was estimated to be 80% in 2007 (Ministério de Saúde, 2010). This may explain why only three cases of transfusion-transmitted infectious diseases have been reported in this source, despite high residual risk estimates that suggest much higher figures (Kupek, 2001, 2004).

Despite significant technological advances in blood safety in Brazil, such as recent introduction of nucleic acid amplification test (NAT) techniques for blood screening in some blood banks, a paucity of published research on haemovigilance exists. Even well-established epidemiological studies based on lookback methodology have been lacking in Brazil. The aim of this work is to diminish the gap between recently established technological advances in blood safety and their application to haemovigilance in the country. To this end, we describe an application of phylogenetic analysis of HIV-1 as means of

Correspondence: Emil Kupek, Department of Public Health/CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil.

Tel: +55 48 30256232; fax: +55 48 37219542;
e-mail: kupek@ccs.ufsc.br

© 2011 The Authors
Transfusion Medicine © 2011 British Blood Transfusion Society

First published online 2 December 2011
doi: 10.1111/j.1365-3148.2011.01120.x

verifying HIV transmission from a blood donor to a blood recipient.

MATERIALS AND METHODS

In 2009, a suspicion was raised that a patient who received eight blood components [six fresh frozen plasma (FFP) and two concentrated red blood cell (RBC) units] during a surgical removal of an ovarian cyst was contaminated with HIV-1 by blood transfusion on this occasion. The blood bank which provided the blood components was contacted by the hospital where the surgery took place and mandated to investigate the issue. The HIV testing history of both blood donor and recipient medical history are depicted in Fig. 1 and explained below. Finally, the analysis of genetic linkage of HIV in the blood of both the donor and the recipient is presented in order to verify if HIV was transmitted by blood transfusion.

Blood recipient medical history

The blood recipient reported fever, lymphadenopathy and haematological alterations approximately a week after the above-mentioned surgery, prompting her physician to suspect HIV seroconversion and request the HIV antibody test 2 weeks after receiving the blood transfusion. Although Western blot and EIA produced negative test results at that point of time, the test for p24 was positive, thus triggering a lookback procedure (Fig. 1). Shortly afterwards, the husband of the infected blood recipient was invited to test for HIV. He agreed and tested negative on two EIAs: Enzygnost Integral II (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) and CHLia (Prism, Weisbaden, Germany).

The lookback procedure

The search of the blood bank records showed that the eight blood components transfused to the HIV-infected recipient were donated by eight different blood donors who were then

communicated to provide a fresh blood sample at the blood bank. All of the donors consented and were tested for HIV by anti-HIV Enzygnost Integral II (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) and anti-HIV CHLia (Prism). One donor tested positive on both tests and subsequently on all bands of HIV Blot 2.2 (MP Diagnostics, MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd., Singapore). The HIV-positive donor had made a fresh plasma donation 85 days before the lookback testing took place (Fig. 1). On that occasion, about 1.5 mL of plasma was stored at -30°C for further research and/or lookback purposes. This sample was unfrozen for lookback purpose and tested for HIV-1 RNA through Cobas AmpliCor HIV Monitor Test (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), with a limit of detection of 75 copies per millilitre. The subsequent results of this test were negative. The same sample was re-tested by real-time PCR (NAT Biomanguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) with the limit of detection of 13 copies per millilitre and again produced a negative test result. Mini pool NAT testing was not available at the time of blood donation.

The lookback identified the HIV-positive donor as a 34-year-old woman who declared no risky sexual behaviour during the pre-donation interview. However, she consulted her physician 5 days after performing the blood donation because of symptoms which included lymphadenopathy in cervical region, fever and some haematological alterations. Initially, the physician requested laboratory tests for Epstein-Barr, cytomegalovirus and hepatitis C virus but not for HIV. Her blood was transfused to three recipients: a 77-year-old patient with chronic myeloid leukaemia received a platelet concentrate in August 2009, an 85-year-old patient with lymphoma received a RBC concentrate in September 2009 and a 30-year-old woman received the FFP. The first two patients died within 2 weeks of receiving the transfusion because of the severity of their haematological diseases and were not tested for HIV. The third recipient was contacted during the lookback procedures and invited to collaborate with the haemovigilance investigation. She was interviewed and asked to provide a fresh blood sample which was analysed by Western blot (Genelabs, Gentaur BVBA - Biokys, Kampenhout,

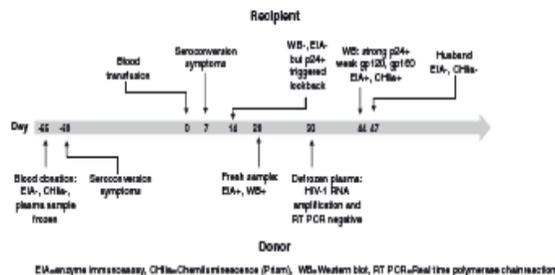


Fig. 1. Timeline for HIV testing of suspected blood donor and the recipient of this blood donation who subsequently developed HIV.

Belgium) that showed strong reactivity for p24 band and weak reactivity for gp120 and gp160 bands (Fig. 1). Her serological tests for HIV were also positive.

Amplification and sequencing of HIV-1 proviral DNA

Proviral DNA were extracted from donor and recipient whole blood samples using the Qiagen QIAamp Blood Midi kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, NJ, USA) and amplified by a two-round PCR with nested primers. Gp120 envelope (*env*) region was amplified using ED5 (5'ATGGGATCAAAAGCCTAAA-GCCATGTG) and ED12 (5'AGTGCTTCTCTGCTCTCCCAAGAACCCAAAG) as outer primers, and ED31 (5'CTCAGCCATTACACAGGCCCTGTCACAAAG) and ED33 (5'TTACAGTAGAAAATTCGCCCTC) as inner primers (Dehart *et al.*, 1995). The polymerase (*pol*) region was amplified using DP10 (5'TAACTCCCTCTCAGAAAGCAGGAGCCG) and MMR16 (5'TTTTACATCATTAGTGTGGG) as outer primers, and DP16 (5'CTCAAAATCACTCTTTGGCAAC) and MMR15 (5'TAAATTGATATGCCATTG) as inner primers (Bello *et al.*, 2008). Amplifications were carried out using ± 120 ng of total DNA and KAPA HIFI DNA Polymerase (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA) according to manufacturer's instructions. A Mastercycler Gradient® thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used in the following conditions: initial denaturation temperature at 95 °C (2 min), denaturation at 98 °C (20 s), annealing at 55 °C (15 s), extension at 68 °C (1 min), followed by 25 cycles with denaturation at 98 °C (20 s), annealing at 55 °C (15 s) and extension at 68 °C (1 min). A final extension of 5 min was set at 68 °C. For second-round PCR, a 4 μ L aliquot of the first-round PCR mixture was used with the same conditions. Amplification results were checked on agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The PCR products were purified using GPC™ PCR DNA and Gel Band Purification KR (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Purified DNA was sequenced using DYEnamic® ET Dye Terminator (GE/Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA) ready reaction kit and processed in an automated MegaBace 1000® DNA Analysis System (GE/Amersham Biosciences Inc.).

The HIV-1 sequence analysis was conducted as following. The basiclocal alignment search tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) was used to compare donor and recipient sequences against the entire HIV-1 sequence database.

The sequences with the highest similarity score to donor and recipient, and without gaps or stop codons, were chosen for the subsequent phylogenetic analysis. The reference sequences included in the alignment by the similarity criterion were HIV-1 subtype C, including 15 sequences from Brazil, 1 sequence from Argentina and 1 sequence from Uruguay. Also, reference sequences from HIV-1 subtype B and F1, which co-circulates in Brazil with subtype C and from HIV A1 were included as out-group sequences. Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Two distinct alignments were built, one of 513 bp spanning the *env*-gp120/C2V3 region

(nucleotides 6857–7370 relative to HXB2) and another of 1250 bp covering the protease (PR) and reverse transcriptase (RT) of *pol* gene (nucleotides 2264–3514 relative to HXB2).

Phylogenetic analyses were performed by the neighbor-joining (NJ) algorithm based on a DNA distance matrix using the Tamura–Nei nucleotide substitution model, in 1000 bootstrap replicates, using MEGA v4 program (Tamura, 1993, 2007). Maximum-likelihood (ML) analyses were performed in the PhyML 3.0 online program (www.atgc-montpellier.fr/phyml) using the Kimura two-parameter algorithm (Kimura, 2001; Guindon & Gascuel, 2003). For the MJ analyses, the sequences were uploaded in a standard PHYLIP file of aligned DNA, originated by hand editing of the CLUSTAL X alignment saved in a fasta format. In both analyses, an HIV-1 subtype A1 sequence was used as out-group.

Ethical issues

All blood donors signed a consent document allowing the use of their data for research purposes. The Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina approved the research under the protocol number 843/10.

RESULTS

HIV-1 sequence analyses of the *env* and *pol* genes from both donor and recipient demonstrated the viruses were very closely related. Four nucleotide divergences in the 513bp sequence spanning the *env*-gp120/C2V3 region and just 3 divergences in the 1250bp sequence spanning the PR and RT region of *pol* gene were observed. In both regions analysed, the similarity between donor and recipient was higher than 99%, whereas the most closely related *env* sequence of the Los Alamos HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov>) had 91% of similarity and the closest *pol* sequence had 95% of similarity.

Phylogenetic analyses showed donor and recipient HIV-1 sequences belong to the Brazilian subtype C cluster and formed a monophyletic clade within the HIV-1 clade C. One-thousand bootstrap replicate of the data set, analysed by both NJ and the ML method (data not shown), showed 100% bootstrap support for the donor–recipient clade in the *env* tree (Fig. 2) and 99% of bootstrap in *pol* tree (Fig. 3), thus confirming the close epidemiological relatedness.

DISCUSSION

This is the first report of the use of phylogenetic analysis of HIV-1 in Brazil and Latin America in the context of a haemovigilance investigation. Relatively few publications using this technique can be found worldwide. The first reports of this kind from Singapore (Ling *et al.*, 2000) and South Africa (Bredell *et al.*, 2003) covered the period before the introduction of NAT blood screening. In the United States, two confirmations of transfusion-transmitted HIV based on phylogenetic linkage of suspected blood donor and its recipient were published nearly

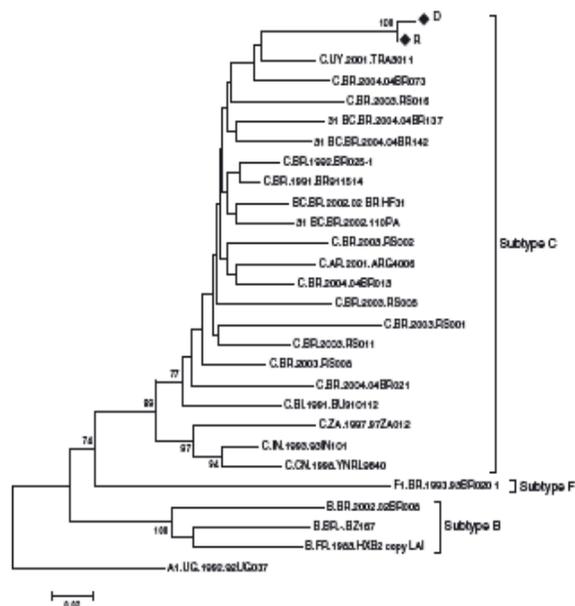


Fig. 2. Phylogenetic analysis of *env-gp120/CY3* region by NJ. Bootstrap values greater than 70% are noted, and the Brazilian subtype C sequences most related with donor-recipient templates are bolded. Black diamonds are noted on donor (D) and recipient (R) sequences, and black circles are noted on the foreign sequences with the highest similarities with donor-recipient.

5 years after minipool NAT screening was mandated in 1999 (Dehert et al., 2004; Phelps et al., 2004). A detailed investigation of one of these cases concluded that HIV-1 RNA was reliably detected by individual-sample NAT but only inconsistently by minipool NAT (Dehert et al., 2004) due to its limit of detection. A more recent report on transmitting HIV via blood transfusion in Germany attributed the failure to detect the virus by minipool NAT to low viral load and mismatches in the primer/probe region (Schmidt et al., 2009). The authors argued that using several conserved regions of HIV-1 genome simultaneously might reduce the risk of such failure without costly implementation of individual-sample NAT.

Various lookback investigations indicate the low viral load during the infectious window period as a major obstacle for detecting HIV by minipool NAT screening (Ling et al., 2003; Dehert et al., 2004; Schmidt et al., 2009) due to its limit of detection. On the other hand, the huge cost of individual donor NAT screening for routine blood screening and relatively low yield with this technique over minipool NAT (Assal et al., 2009)

has made the former inaccessible even for developed countries. For example, a study conducted in the United States found this yield to be four to six additional cases in 2–3 million blood donations (Busch & Dodd, 2000), whereas an European study found this yield to be zero in 3–6 million blood donations (Roth et al., 2002). More recently, the yield for HCV and HIV was estimated at 1–2 additional cases in 10 million donations in Germany (Schmidt et al., 2009).

In the view of these findings, the few cases of very recently infected blood donors with low viral load is likely to remain undetectable by minipool NAT for HIV and HCV, which has been implemented in some blood banks in Brazil in 2010. This underlines the importance of haemovigilance procedures, such as lookback and phylogenetic analysis, for elucidating these rare cases in order to look for additional strategies to further improve blood safety.

In the present study, high similarity between donor and recipient HIV-1 sequences with less than 1% of nucleotide divergence was observed. This finding is consistent with the

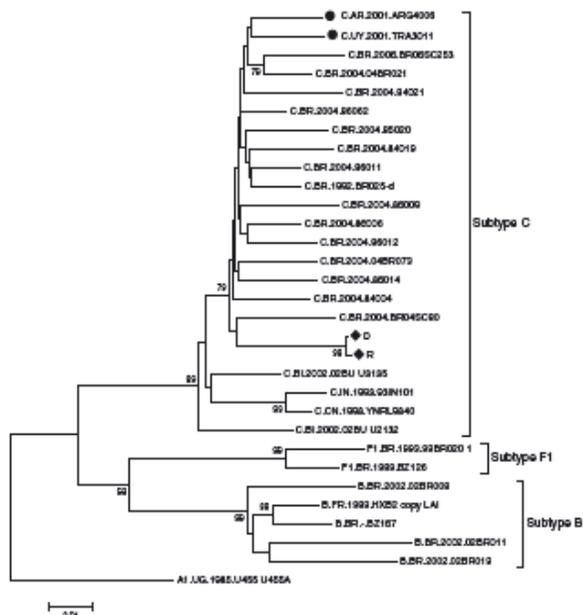


Fig. 3. Phylogenetic analysis of *pr* and *rt* of *pol* region by NJ. Bootstrap values greater than 70% are noted, and the Brazilian subtype C sequences most related with donor-recipient samples are bolded. Black diamonds are noted on donor (D) and recipient (R) sequences, and black circles are noted on the foreign sequences with the highest similarities with donor-recipient.

high mutational rate for HIV, resulting in a divergent viral evolution in just a few weeks. It is a remarkable feature of HIV due to the lack of proofreading activity of the viral RT enzyme, which confers a mutational rate per replication cycle of approximately 3.4×10^{-5} mutations per base pair. Considering the viral baseline production of 1010 virion per day and a genome of 104 bp, the production of millions of HIV variants within any infected person in a single day is feasible. However, different mutational rates are observed within distinct regions of HIV genome, with the *pol* gene being two to three times less divergent than the *env* gene. The present study shows a higher similarity of donor and recipient *pol* sequences, in comparison with *env* sequences, which could be explained by the highly conserved proteins encoded by *pol* gene: RT and PR enzymes. Other studies have already stressed the role of phylogenetic analysis in enhancing epidemiological investigation of contact tracing for infectious diseases as a powerful tool for identifying the sources

of infection and defining prevention strategies (Deng *et al.*, 2009). Such analysis may be enhanced by the analysis of viral markers kinetic and clinical manifestations of donor-recipient pairs in order to estimate the likely date of infection.

The lookback procedure motivated some changes in the procedures of the blood bank involved in advance of mandated NAT screening. To discourage test seeking for HIV, the period between serological testing and releasing the results to the blood donor candidates was prolonged from 1 week to 1 month. In addition, asking directly if the purpose of blood donation was motivated by test seeking for HIV has been introduced and the risk of such attitude emphasized during the pre-donation interview. As Brazil is preparing for the introduction of mandatory minipool NAT blood screening the monitoring of this mandate's impact on reducing transfusion-transmitted diseases and the incorporation of this technique into haemovigilance investigation are highly important.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the HEMOSC board of directors, Laboratório de Protozoologia/UFSC, and the LATED Laboratory of Biomanguiños/FICCRUZ. This work was partially supported by Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC). The authors have contributed to this paper as follows: A. P. and E. K. outlined the paper. A. R. P. and T. G. carried out the phylogenetic analysis

of HIV-1. R. V. and A. P. researched the case history events, combining serological test results with medical records and interviews with the blood donors. All authors have contributed to the writing of the paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interests.

REFERENCES

- Asari, A., Barlet, V., Deschassaux, M. et al. (2009) Sensitivity of two hepatitis B virus, hepatitis C virus (HCV), and immunodeficiency virus (HIV) nucleic acid test systems relative to hepatitis B surface antigen, anti-HCV, anti-HIV, and p24/anti-HIV combination assays in seroconversion periods. *Transfusion*, **49**, 301–310.
- Bello, G., Passaes, C.P., Guimarães, M.L., Loreto, R.S., Mator Almeida, S.E., Medeiros, R.M., Alencastro, P.R. & Morgado, M.G. (2008) Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*, **22**, 1993–2000.
- Beedell, H., Crookes, R.L., Heyns, A.P., Schoub, B.D. & Morris, L. (2003) Molecular investigation of two possible cases of accidental HIV-1 transmission in South Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **19**, 613–617.
- Bauch, M.P. & Dodd, R.Y. (2000) NAT and blood safety: what is the paradigm? *Transfusion*, **40**, 1157–1160.
- Delwart, E.L., Hering, B., Rodrigo, A.G. & Mullins, J.I. (1995) Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR Methods and Applications*, **4**, S202–S216.
- Delwart, E.L., Kalkin, N.D., Jones, T.S., Ladd, D.J., Foley, B., Tobler, L.H., Tsai, R.C.P., Busch, M.P. (2004) First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. *Vox Sanguinis*, **86**, 171–177.
- Deng, W., Fu, P., Bao, L. et al. (2009) Molecular epidemiological tracing of HIV-1 outbreaks in Hainan island of southern China. *AIDS*, **23**, 977–985.
- Faber, J.C. (2009) Review of the main haemovigilance systems in the world. *Transfusion Clinique et Biologique*, **16**, 86–92.
- Fleisand, O. (2007) A comparison of complication rates based on published haemovigilance data. *Intensive Care Medicine*, **33**(Suppl.), S17–S21.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology and Medicine*, **52**, 696–704.
- Kimura, M. (2001) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Kupak, E. (2001) Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991–99. *Journal of Viral Hepatitis*, **8**, 78–82.
- Kupak, E. (2004) Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991–2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **8**, 236–240.
- Ling, A.E., Robbins, K.E., Brown, T.M. et al. (2000) Failure of routine HIV-1 tests in a case involving components during the infectious window period transmission with preseroconversion blood. *JAMA*, **284**, 210–214.
- Ministério de Saúde. (2003) *Manual Técnico de Hemovigilância (Technical Manual of Haemovigilance)*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
- Ministério de Saúde. (2010) *Boletim de Hemovigilância – 2008*. [Haemovigilance bulletin – 2008]. URL <http://www.servas.gov.br/lingua/haemovigilancia/index.htm> (Accessed 10/11/10).
- Philips, R., Robbins, K., Liberti, T. et al. (2004) Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion*, **44**, 929–933.
- Roth, W.K., Weber, M., Buh, S., Drosten, C., Weichert, W., Sireis, W., Hedger, D. & Seifried, E. (2002) Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in Central Europe. *Transfusion*, **42**, 862–868.
- Schmid, M., Korn, K., Nübling, C.M. et al. (2009) First transmission of human immunodeficiency virus type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion*, **49**, 1836–1844.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 512–526.
- Tamura, K., Dudley, I., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F. & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876–4882.

5.2 - Termo de consentimento livre e esclarecido do estudo de estabilidade

Título da Pesquisa: Estudo da estabilidade do RNA das amostras submetidas aos testes NAT.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se irá participar, é importante que saiba como esta pesquisa será realizada e de que forma as informações serão utilizadas. Também esclareceremos os possíveis riscos, benefícios e desconfortos envolvidos.

O objetivo deste estudo é de avaliar a estabilidade do RNA dos vírus HIV e HCV em amostras de sangue. Para isto serão selecionados voluntários que permitam a coleta de aproximadamente 80 mL de sangue em tubos de coleta específicos, para a realização de simulações e testes de biologia molecular.

A seleção destes voluntários foi realizada pelo laboratório de sorologia do HEMOSC, sendo composta somente por funcionários da Instituição com resultados negativos para todas as doenças transmitidas pelo sangue e que sejam doadores de sangue.

Mesmo que decida participar, você ainda será livre para desistir de sua participação no estudo a qualquer momento, bastando para isto informar a sua desistência.

Apesar de não haver um benefício direto para você, informamos que estes resultados irão contribuir futuramente com a qualidade dos resultados dos testes NAT utilizados para a detecção dos vírus HIV e HCV em amostras de doadores de sangue.

Saliento que todos os resultados dos testes laboratoriais realizados nas amostras coletadas serão confidenciais e de conhecimento apenas do pesquisador responsável. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Em caso de qualquer dúvida ou esclarecimento, por favor entre em contato com:

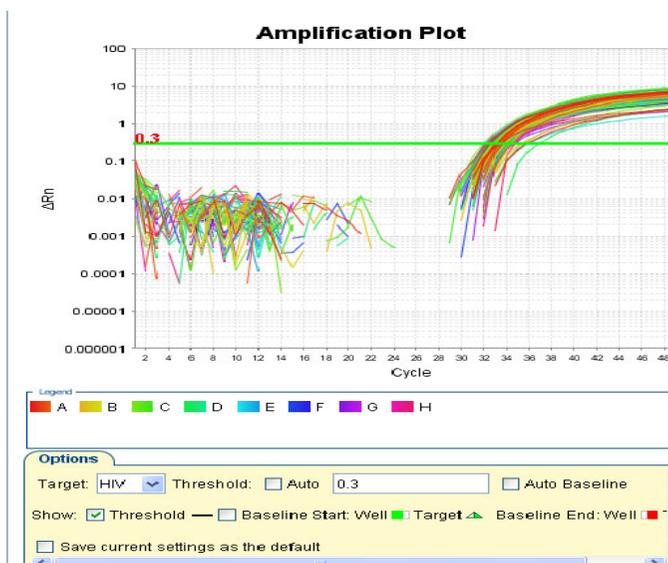
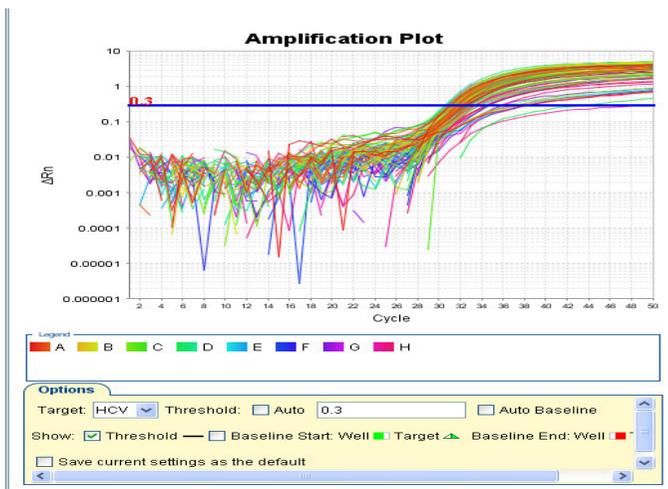
Andrea Petry – pesquisadora responsável – fone 48-3251-9719
(andreap@fns.hemosc.org.br).

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Nome do participante:

Assinatura: Data:

5.3 - Resultados da amplificação do RNA-HCV e RNA-HIV das amostras centrifugadas a cada tempo de acondicionamento



5.4 - Resultados da amplificação do RNA-HCV e RNA-HIV das amostras previamente centrifugadas em relação ao tempo de realização do teste.

