

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação *lato sensu* em hematologia e banco de sangue

A.C & T - Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, abril 2010.

**A importância do teste do ácido nucléico – NAT – nos bancos de sangue do Brasil.**

Giselle Bissaro Barban

## **A importância do teste do ácido nucléico – NAT – nos bancos de sangue do Brasil.**

**Giselle Bissaro Barban**

---

### **Resumo**

O teste do ácido nucléico – NAT – é uma tecnologia desenvolvida para detecção do material genético de agentes infecciosos virais como HCV (vírus da hepatite tipo C) e HIV tipo 1 (vírus da imunodeficiência humana tipo 1). Esses testes foram implantados em muitos países desenvolvidos a partir de 1999 com o propósito de identificar doadores de sangue com níveis de anticorpos indetectáveis pelos exames sorológicos convencionais (5,8). Assim, esses testes moleculares executam um importante papel no diagnóstico clínico de uma variedade de doenças infecciosas (13) A incorporação do NAT na triagem dos doadores diminui o período de janela imunológica, reduzindo o risco de transmissão de HIV e HCV por transfusões de hemocomponentes, e desse modo, aumenta a segurança transfusional.

**Palavras-Chave:** Diagnóstico molecular, teste do ácido nucléico, bancos de sangue, agentes infecciosos virais.

---

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação *Lato Sensu* em Hematologia e Banco de Sangue (março de 2009 a abril de 2010).

Endereço para correspondência: Rua Regina, 51, CEP 14091-120, Ribeirão Preto, SP  
e-mail: gisellebbarban@hotmail.com

## **Introdução**

A transmissão de doenças infecciosas através da transfusão de hemocomponentes contaminados tem diminuído constantemente devido aos grandes avanços dos testes laboratoriais, à cautelosa entrevista com os doadores antes da coleta e ao amplo trabalho de conscientização desenvolvido junto à população (8).

Desse modo, a norma que regulamenta os procedimentos hemoterápicos, (RDC nº 153 de 14 de julho de 2004) determina o descarte imediato de bolsas com qualquer teste que durante a triagem demonstre resultados positivos.

Para o vírus da imunodeficiência humana tipo 1, HIV-1, são realizados dois tipos diferentes de testes sorológicos, sendo um ensaio Quimioluminescente, que identifica o antígeno viral específico, e um do tipo imunoenzimático, responsável pela detecção de anticorpos (5,10). O vírus da hepatite tipo C, HCV também é identificado por ensaio imunoenzimático, ou ELISA de terceira geração, que detecta anticorpos anti-HCV presentes no soro do doador (13).

A sensibilidade do teste ELISA é dada pela detecção de anticorpos anti-HIV em 22 dias após a infecção e anti-HCV em aproximadamente 70 dias. À esse intervalo entre a fase inicial da infecção e a caracterização de uma resposta imune do organismo, denominamos janela imunológica, onde não se detecta a presença de anticorpos nos exames convencionais (14).

Procedimentos para a doação de sangue requerem medidas de prevenção a contaminações que possam estar ocultas devido à janela imunológica, sendo este um obstáculo importante para a obtenção de uma transfusão mais segura (14).

Do inglês, “*nucleic acid amplification technology*”, NAT – é um teste que apresenta a capacidade de amplificar sequências de ácidos nucleicos específicas de um organismo.

O NAT teve início no final dos anos 90, ano em que as técnicas de amplificação se tornaram comuns nos laboratórios de biologia molecular (1). Essa técnica apresenta alta sensibilidade de detecção de ácidos nucleicos e permite detectar a presença do material genético, RNA viral, nas amostras de sangue do doador o que o torna capaz de diminuir o período da janela imunológica. O NAT HIV/HCV pode reduzir este período de janela imunológica de 22 para 11 dias, com detecção do RNA do vírus HIV, e no caso de HCV, de 70 para apenas 12 dias. Desse modo, o NAT se faz necessário para complementar os testes sorológicos de pesquisa de anticorpos e antígenos (14), sendo um teste relevante para minimizar o risco infeccioso das transfusões e contribuindo para um indiscutível aumento da segurança transfusional.

Introduzido em muitos países desenvolvidos à partir de 1999, o NAT na Europa ocidental tem rendimento para detecção de HCV e HIV-1 de aproximadamente 1:10 doações e 0,3:10 doações respectivamente (8). Em centros transfusionais italianos reduziu em 80% o risco de transmissão de HCV pela transfusão, quando comparado com técnicas imunoenzimáticas (7).

Entretanto nesses países a prevalência dessas infecções virais é muito baixa e o rendimento do NAT é principalmente para doações feitas no período de janela imunológica (8).

O número de doações de sangue por ano no Brasil, segundo o Ministério da Saúde é de cinco milhões. A presença do HIV entre os doadores de sangue é de 0,1% e para HCV o índice sobe para 0,3% (2).

O teste foi recentemente recomendado pela legislação brasileira (Portaria 262/2002 do Ministério da Saúde) e implantado em alguns bancos de sangue da cidade de São Paulo, com o intuito de reduzir a transmissão de HCV e HIV pela transfusão, tornando-se então obrigatório em toda Hemorrede Nacional, incluindo bancos de sangue públicos e privados (10).

Implantado no Hemocentro de São Paulo, desde março de 2004, a tecnologia NAT possibilitou a identificação de dois casos de doadores na fase aguda da infecção por HIV-1 antes da soroconversão (10). A efetividade do NAT

é dada pela detecção de amostras NAT positivas e testes sorológicos negativos (5).

Estima-se que com a implantação do NAT, seja detectado entre zero a 23 doações contaminadas por HIV detectadas no ano, e para o HCV o número aproximado de contaminações evitadas pode estar entre zero a 131/ano (5).

Considerando que uma bolsa de sangue pode contaminar até 1,5 receptores, com a implantação do NAT espera-se evitar até 35 contaminações por ano no Brasil e para o HCV este número sobe para até 197 contaminações por ano no Brasil (5).

O teste do ácido nucléico ainda não foi introduzido em todo país devido à algumas limitações como recursos, grande número de serviços, pessoal qualificado e espaços estruturalmente adequados, porém esses motivos não impedem a implantação do teste no país (1).

### **Técnicas utilizadas para amplificação de ácidos nucléicos**

O NAT pode ser feito através de vários tipos de técnicas, sendo as mais comuns, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação medida por transcrição (TMA). Outras tecnologias como a amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos (NASBA), técnica do DNA ramificado (bDNA), também podem ser empregadas para fins diagnósticos.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Trata-se de uma técnica extremamente sensível que permite clonar fragmentos de DNA ou RNA relativamente curtos (abaixo de 10.000 pares de nucleotídeos) permitindo sua detecção por coloração fluorescente ou eletroforese em gel (13).

Existem dois tipos de PCR, a convencional (PCR-C) e a *real time* (PCR – RT), a diferença está no momento de análise e liberação de resultados, pois a

PCR- RT avalia a amplificação no momento em que ela ocorre, é um método quantitativo, mais sensível, rápido e preciso, enquanto a PCR-C mede o produto acumulado no final dos ciclos de amplificação, é semiquantitativa, necessita de processamentos adicionais após a amplificação e é imprecisa (6).

A aplicação da técnica de PCR-RT no teste NAT faz-se necessária por sua alta sensibilidade. Com a utilização de seqüências complementares ao RNA viral do HCV e do HIV é possível determinar se há presença desses genomas em uma amostra de sangue, até mesmo com poucas cópias virais. A rotina laboratorial que utilizar a PCR-RT deve realizar a detecção em separado do RNA do HCV e do HIV-1 através de dois conjuntos diagnósticos (kits) distintos (5).

Para que a reação ocorra, é preciso basicamente três ciclos básicos de oscilação da temperatura. No primeiro ciclo de desnaturação, com temperatura entre 94-95°C as duas fitas de cDNA (DNA complementar - transcrito a partir de RNA viral pela enzima transcriptase reversa) se separam, posteriormente há um resfriamento para 50-60°C permitindo que ocorra o anelamento dos *primers*, ou, moléculas iniciadoras, que se ligam (hibridizam) especificamente com seqüências complementares nas duas fitas de DNA, delimitando a região a ser amplificada. Também nesse ciclo, sondas fluorescentes se ligam ao DNA e quando catalizadas pela enzima DNA polimerase, emitem um sinal fluorescente que é utilizado para detecção dos produtos amplificados (13,15).

Finalmente no último ciclo, a uma temperatura de 72°C, ocorre a extensão que é feita pela enzima DNA polimerase (Taq Polimerase – isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* - estável em altas temperaturas e não é desnaturada pelo aquecimento da reação), responsável pela adição de deoxirribonucleosídeos trifosfatos (bases nitrogenadas) sintetizando desse modo apenas seqüências complementares de DNA a partir dos *primers* (15).

O ciclo segue-se novamente para a primeira etapa onde irá separar as fitas de DNA recém-sintetizadas que servirão também como moldes, esse processo é repetido por 30 a 40 vezes, sendo assim, cada etapa duplica a

quantidade de DNA sintetizada anteriormente e, desse modo, a reação ocorre em ordem exponencial (13).

O instrumento de PCR *real-time* combina um termociclador, responsável pela oscilação da temperatura entre todas as etapas da reação e filtros que detectam e mede a fluorescência emitida a cada ciclo, que é proporcional a quantidade de DNA alvo amplificado. O resultado é observado em tempo real a partir de gráficos representados em um programa de computador.

### **Amplificação mediada por transcrição (TMA)**

Essa reação utiliza um ciclo contínuo e isotérmico de amplificação de RNA a partir de *primers* que definem a seqüência a ser amplificada. A enzima transcriptase reversa faz cópias de fita dupla de DNA partindo do molde de RNA viral, posteriormente ocorre a reação inversa, ou seja, a RNA polimerase através do molde de fita dupla de DNA, sintetiza novamente fitas simples de RNA, obtendo ao final múltiplas cópias de RNA do segmento do ácido nucléico de interesse (DNA ou RNA). Esse processo gera até 10 bilhões do produto alvo de amplificação em 15 a 30 minutos (6).

Outras diferenças entre TMA e PCR é que na primeira não é preciso utilizar o termociclador, pois todo o processo ocorre sob condições de temperatura constante e a TMA emprega um único kit que permite a detecção simultânea (multiplex) do RNA viral tanto HIV como HCV (5).

### **Tecnologia disponível no mercado**

Há apenas duas empresas que fabricam testes comerciais autorizados para detecção do RNA de HCV e HIV pelo NAT, a Chiron e a Roche, porém os kits são de custo elevado e podem ser menos específicos e sensíveis quando aplicados em nossa região devido à diversidade genética dos agentes patógenos, e também, testes de desenvolvimento próprio – *in house* –

transformam-se em alternativas mais acessíveis para países em desenvolvimento como o Brasil (3).

### **Plataformas NAT**

O *COBAS TaqScreen Multiplex Test MPX A* da *Roche Molecular System* é qualitativo e permite a detecção simultânea de HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA e HBV DNA. O teste é realizado por sistema automatizado que, utilizando um pipetador automático, prepara as amostras em *Pool* (coleção de pequenas alíquotas de muitas amostras de plasma de doações individuais). A extração é realizada pelo instrumento *COBAS AmpliPrep*, seguido da amplificação por real-time PCR e detecção através do analisador *COBAS TaqMan*. Todo o sistema é controlado por um programa de computador que ao final também é responsável pela interpretação dos resultados (8).

Já o *Procleix Ultrio* da empresa *Chiron Corporation* também é qualitativo, valendo-se da reação de TMA para detectar simultaneamente RNA HIV-1, RNA HCV e DNA HBV. O teste é realizado no sistema *TIGRIS*, que é um instrumento automatizado para o *Procleix*. Os resultados são analisados e relatados pelo programa de computador do *TIGRIS* (8).

Estudos realizados pelo *National Blood Center* da Tailândia em 2007 que utilizam esses kits comerciais, demonstram a sensibilidade e especificidade dessas plataformas. Os resultados obtidos foram promissores, pois 486.676 doadores de sangue soronegativos tiveram suas amostras testadas individualmente no método da empresa *Chiron* e em *Pool* de seis amostras no *COBAS 201* da *Roche*. A especificidade do teste foi de 99,93 % para *Procleix Ultrio* e de 99,90% para o *Cobas TaqScreen* e os casos de janela para HCV e HIV -1 foram detectados pelos dois testes, desse modo os dois são aceitáveis para a rotina NAT, segundo o estudo (8).

## **Controle de qualidade e validação dos testes**

Consideravelmente esforços têm sido realizados não somente para desenvolver maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão em métodos NAT, mas também para padronização desses ensaios (7).

O Controle de qualidade torna-se importante à medida que monitora a eficiência das etapas de reação de detecção dos vírus (3). Cada ensaio NAT deve incluir um controle interno para controlar a extração, a transcrição reversa, a amplificação e os passos de detecção, e também controles externos (controles da corrida), sendo um positivo e outro negativo que servirá como calibrador da reação (11).

A introdução do controle de qualidade interno e externo permite assegurar que os laboratórios produzam e reproduzam resultados de alta qualidade, auxiliando nas análises laboratoriais como também na implantação de medidas preventivas e corretivas (7). Para avaliar o índice de obtenção de resultados falso positivos, são utilizados painéis com diluições seriadas de RNA viral e amostra negativa como forma de testar a proficiência dos laboratórios NAT (11).

## **Rotina do Laboratório NAT**

As etapas do método incluem a preparação da amostra de sangue, a extração do ácido nucléico e sua purificação, a amplificação do RNA ou do DNA complementar alvo e finalmente a detecção do produto amplificado e interpretação dos resultados.

Para os testes realizados em *Pool* que obtiverem resultados positivos, deve-se fazer novamente o teste, misturando quantidades menores de amostras de plasma dos doadores a fim de identificar a amostra positiva, ou então realizar o teste individual para a amostra suspeita.

A vantagem do *Pool* de amostras é que o custo da técnica e o tempo para liberação dos resultados diminuem, não havendo interferência na sensibilidade

nem na especificidade, porém, é a quantidade de amostras presentes no *Pool* e o limiar de sensibilidade das provas que influenciam na eficácia da técnica (1).

Pela sorologia são realizados dois testes ELISA para HIV, sendo que os serviços de hemoterapia que realizarem NAT, somente poderão suspender a realização do segundo teste sorológico para o HIV depois que o laboratório NAT tenha seu desempenho validado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, segundo a PORTARIA nº 79 do Ministério da Saúde.

Sugere-se que as estratégias de triagem implantadas nos bancos de sangue sejam constituídas por uma combinação de NAT e ELISA de terceira geração para HCV e HIV, obtendo desse modo um melhor desempenho destas duas estratégias associadas para melhor detecção de doadores contaminados (5).

A introdução do laboratório NAT requer passos preliminares importantes como a definição da epidemiologia local e regional, a realização de um projeto piloto para estudos dos dados e para estabelecer parâmetros operacionais de financiamento e, também estratégias para questões técnicas e operacionais a fim de determinar o custo benefício da implantação (9).

### **Considerações Finais**

A implantação de novas tecnologias e novas estratégias para reduzir o risco de infecções pelo HIV e HCV por doações no Brasil é necessária, visto que em países com alta prevalência e incidência de tais infecções têm provavelmente um rendimento maior de detecção de períodos de janela imunológica durante a doação. Dados da implantação do NAT nos países com maior prevalência mostraram altos rendimentos como um caso positivo de HCV para 3100 doadores (9).

Apesar da tecnologia possuir altos custos, o benefício da implantação é maior, visto que garantirá um melhor controle de qualidade no sangue a ser doado. Estudos adicionais realizados pela ANVISA junto a

Bio-Manguinhos/Fiocruz para a produção de kits para teste NAT no âmbito nacional estão sendo considerados como uma forma alternativa de reduzir o custo do teste (5).

Dentre outros benefícios alcançados com a implantação desse teste no país, além da segurança transfusional, está o avanço tecnológico na área de biologia molecular que agrega muitos benefícios no âmbito científico e de diagnósticos laboratoriais, garantindo um passo importante para o Brasil na área da saúde.

## Referências Bibliográficas

(1) Nascimento,AMB. Laboratório de Biologia Molecular – NAT – Hemoba. Disponível em

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/laboratorio\\_biologia\\_molecular.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/laboratorio_biologia_molecular.pdf)

(2) Hemo em revista, panorama. Disponível em

<http://www.sbhh.com.br/biblioteca/hemo-revista/pag22a26.pdf>

(3) Silveira E. CATG Centro de Genomas. Disponível em

<http://www.inovacao.unicamp.br/pipe/report/070514-catg.shtml>

(4) Ministério da Saúde – Portaria nº 79 de 31 de janeiro de 2003. Disponível em

<http://www.saude.gov.br>

(5) Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Novembro, 2007.

Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/brats/index.asp>

(6) Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Glossário Novembro,

2007. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/brats/index.asp>

(7) Candido A, Chionne P, Milazzo L, Dettori S, Madonna E, Taffon S, Kondili L.A, Barca A, Hassan HJ, Rapicetta M. Nucleic acid testing (NAT) for HCV RNA in Italian transfusion centres: Na external quality assessment. Journal of Clinical Virology 2008; 41: 277-282.

(8) Phikulsod S, Oota S, Tirawatnpong T, Sakuldamrongpanich T, Chalermchan W, Louisirirochanakul S, Tanprasert S, Chongkolwatana V, Kitpoka P, Phanuphak P, Wasi C , Nuchprayoon C. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency vírus Type 1, hepatitis C vírus, and hepatitis B vírus in Thai blood donations. Blood Donors and Blood Collection 2009; 49, 1126-1135

**(9)** Ekiaby M, Lelie N, Allain J-P. Nucleic acid testing (NAT) in high prevalence-low resource settings. *Biologicals* 2009, xxx; 1-6.

**(10)** Scuracchio PSP, Poli MCC, Lemos MMM, Oliveira Filho AG, Salles NA, Chamone DAF, Magri M, Cavalcante NJF, Collela R. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid – amplification technology. *Transfusion Medicine* 2007; 17, 200-204.

**(11)** Saldanha J. Validation and standardisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *Journal of Clinical Virology* 2001; 20, 7-13.

**(12)** Thon – VE. Quality control in nucleic acid testing – where do we stand? *Journal of Clinical Virology* 2002; 25, S13-S21.

**(13)** Saad-DR, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363, 197-205.

**(14)** Azevedo R, Kashima S, Valente VB, Sant`ana AMS, Machado JPDP, Barban GB, Ubiali E M A, Covas DT. Desenvolvimento e implantação do teste NAT *in house* em um Hemocentro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31, suplemento 5: 271-414

**(15)** Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Tradução Ana Leonor Chies Santiago-Santos...[et. al.] *Fundamentos da Biologia Celular*. Artmed - 2º ed. – Porto Alegre, 2006

**(16)** Resolução RDC nº153, de 14 de junho de 2004.