

**AVALIAÇÃO DE ENSAIO QUIMIOLUMINESCENTE AUTOMATIZADO EM ROTINA DE
TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE DO HOSPITAL FEDERAL DOS
SERVIDORES DO ESTADO/RJ**

Pós-graduação *lato sensu* em Hematologia e Banco de Sangue
Academia de Ciência e Tecnologia

Sabrina Alberti N. de Oliveira

Outubro/2012

RESUMO

Para introdução de metodologia quimioluminescente automatizada em rotina de triagem sorológica de doadores de sangue, foi realizada a testagem de 357 amostras de doadores em paralelo com metodologia em uso no setor (ensaio de micropartículas), no período de setembro a outubro de 2010. Devido à baixa probabilidade de detecção de resultados reagentes em doadores foram acrescentadas ao comparativo todas as amostras com resultados reagentes ou indeterminados obtidas de soroteca de um período de 6 meses (dezembro de 2009 a abril de 2010), totalizando 176 amostras distribuídas entre os marcadores descritos. A comparação demonstrou uma boa concordância de resultados: 99,45% (361/363) para HBsAg; 93,46% (415/444) para Anti-HBc; 90,46% (370/409) para anti-HCV; 99,2% (373/376) para HIV Ag/Ac. A introdução de equipamento de quimioluminescência (CMIA) reduziria o descarte de número considerável de bolsas de sangue, com impacto significativo principalmente na detecção de anti-HCV e anti-HBc.

I. Introdução

A doação sistemática de sangue teve início no Brasil por volta de 1940 e caracterizava-se por um sistema transfusional baseado na remuneração de doadores, com grande impacto na qualidade do sangue obtido (Amorim Filho, 2000). Após intensas críticas e pelo aparecimento da AIDS e sua relação com a transfusão sanguínea na década de 1980, percebeu-se a necessidade da criação de novos procedimentos para a rotina transfusional com a substituição da doação anônima pela personalizada e a conscientização e disciplina em relação ao uso do sangue e seus componentes pelos profissionais de saúde (Junqueira e cols, 2005).

Até este período, a realização de exames sorológicos nos serviços de hemoterapia nacionais era raramente exigida e fiscalizada pela vigilância sanitária. Em 1980, o governo federal criou o Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados - PRÓ-SANGUE, junto à Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH), visando

à organização das atividades no campo transfusional em todo o país, uniformizando sua prática e definindo alguns procedimentos obrigatórios em toda a hemorrede. Estabeleceu-se, assim, um verdadeiro sistema nacional de hemoterapia, proporcionando maior segurança no uso de sangue, estendendo a atividade a diversas categorias profissionais (técnicos de laboratório, enfermeiros, biomédicos, médicos, biólogos) e regularizando um padrão técnico, filosófico e administrativo da atividade transfusional, regulamentado através da chamada Lei do Sangue (Saraiva, 2005; Junqueira e cols., 2005).

Como qualquer atividade da área de saúde, o serviço de Hemoterapia recebe aperfeiçoamentos constantes, com a regulamentação e padronização dos procedimentos hemoterápicos de coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte e utilização de hemocomponentes, visando garantir a eficiência do serviço e a qualidade do produto final. Atualmente, a legislação que rege o serviço transfusional caracteriza-se pela RDC nº 57, de 16/12/10 (ANVISA, 2010) e pela Portaria nº 1353, de 13/06/11 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em relação ao controle de infecções com possibilidade de transmissão através da transfusão sanguínea – através do Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1/2), Vírus Linfotrópico de Célula T Humana (HTLV-I/II), *Trypanosoma Cruzi* e *Treponema pallidum* - os testes sorológicos utilizados para a triagem das bolsas de sangue devem possuir registro na ANVISA e ter alta sensibilidade.

Ao identificar a necessidade da introdução de um novo teste na triagem sorológica, deve-se ter assegurado a disponibilidade de aquisição no mercado, registro no Ministério da Saúde, equipamentos e treinamentos necessários. A alta sensibilidade dos testes, exigida para uso nos serviços de hemoterapia, visa aumentar a segurança para o receptor. Porém, a alta sensibilidade com consequente redução na especificidade acarreta resultado falso-positivo, podendo trazer sérias conseqüências aos doadores de sangue que terão que lidar com o estigma de um teste supostamente reagente, até o esclarecimento diagnóstico. Para os serviços de hemoterapia isso implica descarte de bolsas e desperdício de sangue (Motta e cols, 1999; Salles e cols, 2003). Os testes chamados de primeira geração, em que o antígeno é obtido por

intermédio do lisado do patógeno, utilizados especialmente nas últimas décadas de 80/90, causaram fortes danos emocionais em doadores falso-positivos e um alto custo para os serviços de hemoterapia, com o descarte de bolsas com suspeita de infecção (Salles e cols, 2003). Nos últimos 30 anos, novos testes de triagem sorológica foram sendo introduzidos, na medida em que os agentes patógenos eram identificados e reagentes disponibilizados. Atualmente, o ELISA é o mais utilizado nos serviços de hemoterapia, por permitir boa reprodutibilidade, fácil execução e possibilidade de automação, além da utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos, reduzindo possíveis reações cruzadas. Outros tipos de testes também são utilizados em triagem de doadores de sangue, como por exemplo, hemaglutinação, aglutinação de partículas e quimioluminescência (Chamone e cols, 2001).

O emprego dos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT) é importante para o esclarecimento de reações indeterminadas nos testes de triagem sorológica, em virtude da elevada sensibilidade e especificidade que os mesmos apresentam (Wang e cols, 2002; Machuca e cols, 2003). A partir da portaria nº 262/2002 do Ministério da Saúde, o teste NAT passou a ser recomendado se ser obrigatório para todos os doadores de sangue do Brasil. Desde então desenvolveu-se uma plataforma NAT (testes de ácido nucleico) com conjunto diagnóstico fabricado nacionalmente por Bio-Manguinhos/Fiocruz para detecção de HIV-RNA e HCV-RNA; porém ainda está em processo de implantação em todo território nacional e não inclui a detecção do HBV-DNA.

II. Objetivo

A introdução do sistema automatizado de metodologia quimioluminescente (CMIA) no setor de Sorologia do Hospital Federal dos Servidores do Estado/RJ vem ao encontro da constante busca por inovações tecnológicas que possam garantir a alta sensibilidade, porém reduzir possíveis interferentes e o descarte desnecessário de bolsas de sangue. Desta forma, este estudo visou comparar o desempenho da metodologia CMIA (Architect i1000SR®/Abbott) para triagem sorológica de doadores de sangue com as metodologias em uso no setor.

III. Materiais & Métodos

3.1. População estudada

O estudo envolveu a testagem de 533 amostras de soro obtidas de doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Federal dos Servidores do Estado/RJ; obtidas após centrifugação de tubos de sangue total com gel separador a 1800 g (4360 rpm na centrífuga *Hettich Universal 320*) por 10 minutos.

Destas, 357 amostras foram oriundas de rotina diária de doação de sangue entre setembro e outubro de 2010. Porém, devido à baixa probabilidade de obtenção de resultados reagentes na população de doadores de sangue, foram acrescentadas ao estudo amostras que obtiveram resultados reagentes ou indeterminados de soroteca disponível no setor, armazenadas a -20°C. A pesquisa em soroteca foi realizada em um período de 6 meses, de dezembro de 2009 a abril de 2010, obtendo-se seis amostras para HBsAg, 87 para anti-HBc, 52 para anti-HCV, 19 para HIV Combo e 12 para anti-HTLV.

3.2. Processamento da amostra

As amostras de rotina foram submetidas aos ensaios de triagem sorológica para detecção de HBsAg, anti-HBc, anti-HCV e HIV Combo por ensaio quimioluminescente automatizado ARCHITECT/ABBOTT (Figura 2a) em paralelo com a metodologia em uso no setor de enzimaensaio de micropartículas (MEIA) automatizado AXSYM/ABBOTT (Figura 1a). As amostras de soroteca foram testadas após descongelamento em temperatura ambiente nos testes quimioluminescentes, sendo os resultados dos testes MEIA resgatados através do sistema informatizado HEMOVIDA/DATASUS/MS.

3.3. Princípio dos testes sorológicos

3.3.1. Enzimaensaio de micropartículas (MEIA)

A tecnologia MEIA (Figura 1b) caracteriza-se por um ensaio imunoenzimático com a fase sólida sendo constituída de partículas de látex revestidas com molécula de captura específica para o analito a ser determinado. O conjugado marcado com fosfatase alcalina catalisa a hidrólise do substrato 4-metilumbeliferil fosfato (MUP) em produto fluorescente 4 metil-umbeliferona após excitação por fonte de luz, com captação pelo sistema óptico do equipamento, proporcional à quantidade do analito da amostra. O complexo imune fica retido em uma célula-matriz de fibra de vidro onde ocorrem todas as etapas de lavagem, adição do substrato e leitura (Figura 1c).

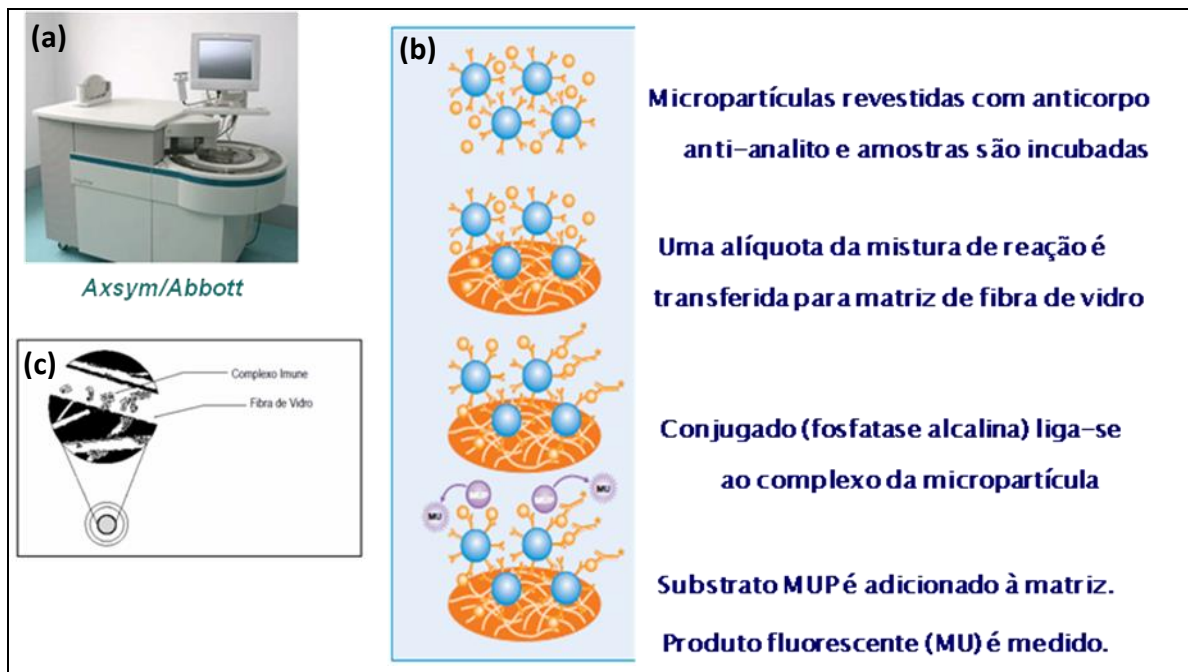


Figura 1. Imunoensaio de micropartículas (MEIA) automatizado AXSYM/ABBOTT

3.3.2. Imunoensaio de quimioluminescência

A reação CMIA (Figura 2b) envolve a interação de micropartículas magnéticas (Figura 2c) revestidas com molécula de captura do analito desejado (antígeno ou anticorpo), conjugado rotulado com acridina – um composto quimioluminescente - e soluções ativadoras de H_2O_2 (pré-ativador) e $NaOH$ (ativador) que promovem a reação química com liberação de fóton captado pelo equipamento.

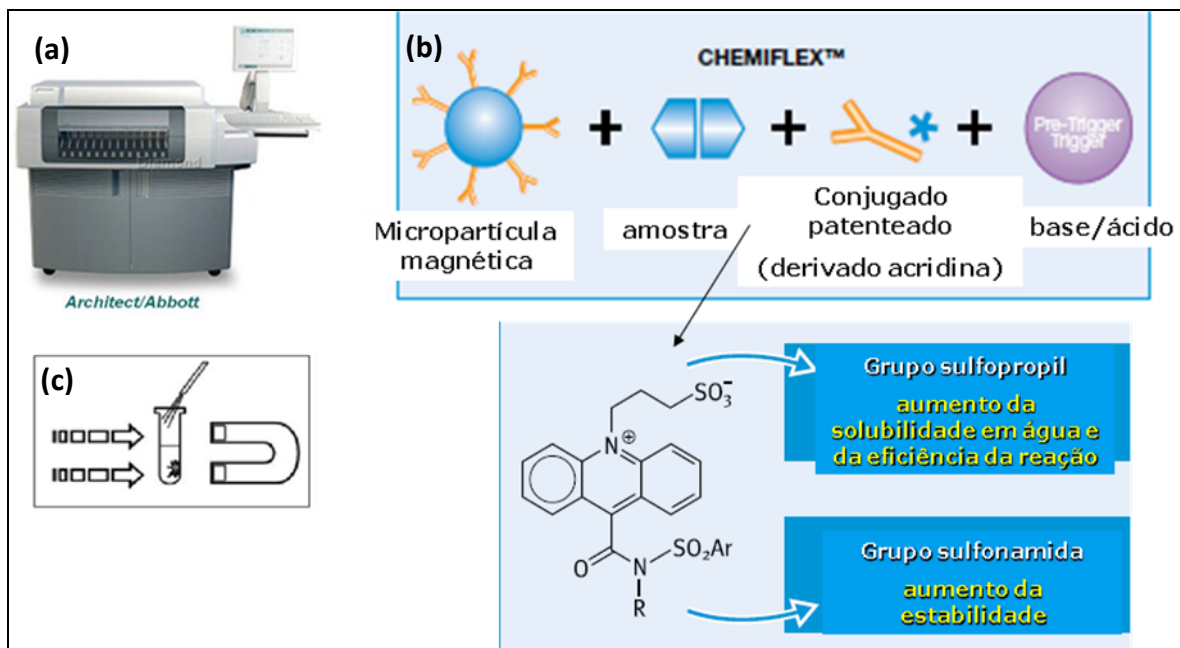


Figura 2. Imunoensaio quimioluminescente (CMIA) automatizado ARCHITECT/ABBOTT

3.4. Análise dos dados

Para comparação dos dados obtidos nos equipamentos utilizados no estudo, foram construídas tabelas de contingência 2X2 para comparação de dois sistemas analíticos com diagnóstico verdadeiro desconhecido, quando o método comparativo não é de referência e cálculo do coeficiente *kappa* (MedCalc® Versão 11.6). Resultados reagentes e indeterminados foram englobados em uma única categoria, pois ambos estão associados à inviabilidade do hemocomponente para transfusão e consequente descarte.

IV. Resultados

Os resultados obtidos por CMIA apresentaram concordância global em comparação com metodologia MEIA de 99,20% para HIV Ag/Ac; 93,47% para anti-HBc; 99,45% para HBsAg e 90,46% para anti-HCV. Os valores de *kappa* foram estatisticamente significativos ($p < 0,001$) e estão descritos na Tabela 1.

Marcador	<i>kappa</i>	IC 95%	Concordância (Agresti, 2007)
HBsAg	0,797	0,697-0,808	Substancial
Anti-HBc	0,782	0,691-0,872	Substancial
Anti-HCV	0,435	0,353-0,517	Razoável
HIV Ag/Ac	0,765	0,667-0,864	Substancial

Tabela 1. Concordância entre resultados das metodologias MEIA e CMIA

As concordâncias para resultados reagentes e não-reagentes foram, respectivamente: 62,5% e 100% para HIV combo; 69,47% e 100% para anti-HBc; 66,7% e 100% para HBsAg; 31,48% e 100% para anti-HCV. Os resultados encontrados e as amostras discordantes estão descritos na Figura 3.

HBsAg TOTAL: 363 amostras	HIV Ag/Ac TOTAL: 376 amostras
R Axsym / R Architect: 1,1% (4 amostras)	R Axsym / R Architect: 1,3% (5 amostras)
R Axsym / N Architect: 0,5% (2 amostras)	R,Ind Axsym / N Architect: 0,5% (3 amostras)
N Axsym / N Architect: 98% (357 amostras)	N Axsym / N Architect: 97,8% (368 amostras)
anti-HBc TOTAL: 444 amostras	Anti-HCV TOTAL: 409 amostras
R Axsym / R Architect: 14% (66 amostras)	R Axsym / R Architect: 2,4% (17 amostras)
R Axsym / N Architect: 5% (29 amostras)	R Axsym / N Architect: 9,2% (38 amostras)
N Axsym / N Architect: 78,6% (349 amostras)	N Axsym / N Architect: 85,8% (353 amostras)

Figura 3. Resultados da triagem sorológica pelas metodologias MEIA (Axsym) e CMIA (Architect)

As baixas concordâncias demonstradas para resultados reagentes está associada à grande quantidade de resultados indeterminados e reagentes fracos no Axsym - com relação densidade ótica/valor de corte do teste (DO/CO) menor que 3,0 - que passaram a não-reagentes no ensaio quimioluminescente.

Em todos os marcadores sorológicos analisados observou-se redução no número de bolsas que seriam descartadas através da introdução do equipamento Architect® i1000SR na rotina de triagem sorológica de doadores de sangue, além de boa concordância entre os equipamentos analisados. Isto vem de encontro à demanda

do serviço de Hemoterapia durante anos pela quantidade considerada elevada de descarte no setor de triagem sorológica.

A redução no descarte, principalmente para os marcadores anti-HCV e anti-HBc, poderia ser explicada pelas características da metodologia de quimioluminescência como produção de sinal estável e rápido de reação (fóton) e pela forma de lavagem da reação (partículas magnéticas são capturadas por imã e lavadas isoladamente), que reduziria a presença de interferentes na detecção. Uma melhor avaliação de aumento da especificidade do Architect em comparação ao AxSYM poderia ser feita com a utilização de painéis sorológicos e metodologia de referência para definição do verdadeiro status sorológico das amostras, o que não foi avaliado no presente estudo.

V. Conclusão

Obteve-se uma boa concordância de resultados entre os equipamentos AxSYM® e Architect® na rotina de triagem sorológica de doadores de sangue, sendo a nova metodologia aprovada para uso pela chefia médica do Serviço de Hemoterapia; verificou-se considerável redução do número de bolsas descartadas, principalmente com relação aos marcadores anti-HCV e anti-HBc, adequando-se à demanda do Serviço.

VI. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Imprensa Nacional, Brasília, DF, nº 241, 17 dez 2010, seção 1: 119-138.

Agresti A. *An introduction to categorical data analysis*. 2ª edição. New Jersey 2007: Wiley Series in Probability and Statistics.

Amorim Filho L. Hemoterapia: uma abordagem histórica e social. In: ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO (org.) Textos de apoio em hemoterapia: volume 1. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro 2000; 15-26.

Chamone DAF, Sáez-Alquézar A, Salles NA e cols. Triagem Sorológica em Bancos de Sangue. In: Manual de Transfusão Sangüínea. 1ª edição. Editores: Chamone DAF, Dorlhiac-Llacer PE, Novaretti M. Editora ROCA, São Paulo 2001: 227-256.

Junqueira PC; Rosenblit J; Hamerschlak N. História da hemoterapia no Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo 2005; 27(3): 201-207.

Machuca A, Hewlett I. Residual risk of human immunodeficiency virus infection in blood banks. Impact of screening with nucleic acid test. Med Clin 2003; 121: 418-425.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011, Diário Oficial da União. Brasília, DF, nº 113, 14 jun 2011, seção 1: 27-45.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Portaria nº 262/GM, de 5 de fevereiro de 2002, Diário Oficial da União. Brasília, DF, nº , 14 jun 2011, seção 1: 27-45.

Motta KM, Cardoso MAR, Neuman LJG e cols. Programa nacional de doação voluntária de sangue – PNDVS. Serie de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia 1999; 6 (Supl.): 150.

Salles NA, Sabino EC, Barreto CC e cols. The discarding of blood units and the prevalence of infectious disease in donors at the Pro-Blood Foundation / Blood Center of Sao Paulo, Brazil. Revista Panamericana Salud Publica 2003, 13(2-3): 111-116.

Saraiva JCP. A história da Hemoterapia no Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo 2005; 27(3): 153-158.

Wang JT, Lee CZ, Chen PJ, et al. Transfusion – transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity for HBV carries. Transfusion 2002; 42: 1592-1597.