

MAÍRA GONÇALVES ARTIERE LIMA
ACADEMIA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
São José do Rio Preto -SP

O IMPACTO DO TESTE NAT NA DOAÇÃO DE SANGUE

Marília

2012

RESUMO:

Este estudo explora o aparecimento da hemoterapia desde os primórdios até os tempos atuais, e as inovações tecnológicas que tem aparecido afim de tornar a transfusão de sangue um ato cada vez mais seguro. O aparecimento da biologia molecular, e com ela o teste NAT, levanta uma forte polêmica no meio transfusional confrontando a eficácia do teste quanto a diminuição da janela imunológica e o alto custo que esta metodologia ainda apresenta. Foi realizado um levantamento bibliográfico que expõe as experiências de outros países com a introdução do NAT em seu circuito do sangue apontando os ganhos e dificuldades enfrentados por cada um deles e as alternativas para compensar a questão financeira. Além disso, foram apresentadas opiniões diversas sobre a real necessidade da implantação deste teste que por alguns é considerado uma necessidade para âmbito transfusional, e que para outros deve ser analisada com cautela a questão custo benefício. Os resultados apresentados mundialmente após a introdução desta metodologia são inquestionáveis e demonstram que o assunto deve ser debatido ainda com mais atenção e vigor no Brasil. As experiências já realizadas no país com o NAT também apresentaram resultados satisfatórios, incluindo pesquisas que estabeleceram uma comparação entre as metodologias mais usadas na triagem do sangue como Elisa e Quimiluminescência com o NAT. A conclusão mais acertada é que não devemos depositar no NAT a esperança de que este teste sozinho vá resolver todos os problemas existentes quanto a segurança transfusional, mas desenvolver um olhar crítico sobre as possíveis falhas de cada metodologia de triagem e traçar um linear de complementaridade entre elas para que o paciente seja o maior beneficiário.

Palavras-chave: Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos; Doadores de Sangue; Risco Transfusional; Triagem Sorológica.

1 INTRODUÇÃO:

A história da hemoterapia mundial teve início há muitas décadas, sendo dividida em dois principais períodos: um primeiro chamado de período empírico, cujas primeiras referências são gregas e que se estendeu até 1900, e uma segunda fase denominada período científico, marcada por muitas pesquisas e descobertas que se iniciou em 1900 e perdura até os dias atuais. Um dos primeiros relatos transfusionais datado em 1667, ainda no período empírico, fala sobre a transfusão de sangue de um carneiro para um ser humano que veio a falecer imediatamente após o ato transfusional. A partir daí inúmeras tentativas continuaram a ser descritas, observando transfusões entre humanos no sistema braço a braço, em que uma pessoa doava seu sangue diretamente para outra, ainda assim muitos insucessos foram relatados levando a proibição do ato transfusional na Europa por alguns anos. A revolução na hemoterapia teve início em 1900 com a descoberta do grupo sanguíneo ABO pelo médico e pesquisador Karl Landsteiner. A partir daí foi fundado em 1921 o primeiro serviço especializado em Londres. (PEREIRA et al., 2010).

No Brasil, existem alguns relatos de teses defendidas ainda no período empírico que demonstram experiências transfusionais, mas foi a partir da década de 1930 que os primeiros serviços especializados surgiram. Durante a década de 1940, a hemoterapia foi considerada uma especialidade médica no Brasil, e nas décadas seguintes algumas leis foram criadas visando a padronização das técnicas brasileiras, porém ainda carecíamos de uma política de sangue consistente. Em 30 Abril de 1980, foi criado o Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados (Pró-Sangue), que instituiu a construção de hemocentros nas principais cidades do país, classificou a doação de sangue como um ato voluntário e apresentou medidas de segurança tanto para doadores quanto para receptores (JUNQUEIRA, 2005).

Desde o princípio do século XX já se conhecia a possibilidade da transmissão de algumas doenças pelo sangue, contudo foi o aparecimento da AIDS em 1981 que trouxe consigo muitas mudanças nos serviços de hemoterapia quanto a segurança transfusional. A transmissão de agentes infecciosos pelo sangue se dá basicamente quando um doador possui este agente circulante em seu sangue, e os testes de triagem não conseguem detectar a presença deste patógeno na unidade transfundida, dependendo também da susceptibilidade do receptor (SANTOS, 2008).

Conforme relatado por Santos (2005), cada agente infeccioso possui tropismo por um determinado tipo de componente sanguíneo, desta forma os vírus HTLV e CMV localizam-se nos leucócitos, os vírus das Hepatites B e C localizam-se no plasma, o *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas, pode estar presente em todos os hemocomponentes, o *Plasmodium*, causador da Malária, encontra-se nas hemácias e o HIV nos leucócitos e plasma.

A fim de evitar transfusões de unidades infectadas, os bancos de sangue em geral se baseiam principalmente na triagem clínica e epidemiológica de seus doadores, e realizam provas que detectam marcadores da presença destes patógenos no sangue doado. São utilizados testes sorológicos capazes de detectar a presença de anticorpos e/ou porções antigênicas destes agentes (WENDEL, 2007).

Visando aumentar a segurança do receptor de hemocomponentes, foi exigido que os testes utilizados na triagem laboratorial de doadores apresentem alta sensibilidade e especificidade. Defini-se por sensibilidade a capacidade de um teste detectar a doença em indivíduos realmente doentes, e especificidade a capacidade de um teste de identificar corretamente a ausência de determinada doença em indivíduos realmente sadios (GARCIA, 2008).

Entende-se por segurança transfusional um apanhado de medidas que gerem um menor risco tanto para o doador, quanto para o receptor, além da garantia de estoque capaz de atender a demanda de cada região. O Ministério da Saúde preconiza que o sangue doado deve ser testado para: HTLV I e II, HIV 1e 2, HCV, HBV, *Trypanossoma cruzi*, *Treponema pallidum*, *Plasmodium* em áreas endêmicas para malária e CMV para pacientes imunossuprimidos (CARRAZONE, 2004).

Os ensaios chamados de primeira geração, que foram muito usados nas décadas de 80 e 90, forneciam antígenos obtidos através de um lisado do patógeno, e geravam muitos resultados falso-positivos causando desconforto emocional ao doador e alto custo para os serviços de hemoterapia pela alta taxa de descarte de bolsas supostamente infectadas. O método sorológico que ainda é mais utilizado é o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa), por apresentar alta reprodutibilidade e fácil execução (CARRAZONE, 2004).

Os testes Elisa de segunda geração utilizam antígenos recombinantes, e os de terceira geração peptídeos sintéticos em sua formulação. Os testes sorológicos têm evoluído muito, porém ainda não existem testes disponíveis no mercado mundial que apresentem 100% de sensibilidade e especificidade. (CARRAZONE, 2004).

Uma evolução ainda maior no âmbito sorológico se deu com o aparecimento do ensaio quimioluminescente, que segue o princípio básico conhecido como detecção da interação antígeno-anticorpo. A diferença principal deste tipo de ensaio quando comparado ao Elisa é a forma com que a reação é revelada, neste caso se dá através de marcadores quimioluminescentes capazes de emitir luz quando excitados. Ao final da reação, os substratos quimioluminescentes são hidrolisados gerando um produto instável que ao retornar a seu estado fundamental emitem fótons de luz. A luz emitida é medida por um espectrofotômetro que a converte em valores, pois a emissão de luz é proporcional a concentração da substância que está sendo pesquisada na amostra (FERREIRA; AVILA, 2001).

Trata-se de uma metodologia mais sensível, totalmente automatizada, rápida e que apresenta custo relativamente baixo, uma vez que são utilizadas pequenas quantidades dos reagentes. A Detecção de fluorescência que ocorre a partir da reação química é duas vezes mais sensível do que a detecção de cor observada no Elisa, o que torna o método mais seguro quanto a ocorrência de resultados falsos e diminui a quantidade de repetições por resultados considerados inadequados (FRREIRA; AVILA, 2001).

A grande maioria dos ensaios sorológicos são baseados na detecção de anticorpos contra um determinado patógeno, porém existe um período entre a contaminação do doador pelo agente infeccioso e a formação de anticorpos em níveis detectáveis para diagnóstico da doença. A este período se dá o nome de janela imunológica, onde o doador já está infectado, porém ainda não se tornou soro positivo para aquela patologia (LIMA, 2011). O impacto sobre a possibilidade de uma possível soroconversão, e logo uma epidemia causada por transfusões, tornou necessária a contínua busca de novas técnicas cada vez mais seguras de triagem de doadores (SANTOS, 2008).

Como descrito por Wendel (2007) métodos moleculares que tem como base a detecção de ácidos nucléicos de patógenos tem sido introduzidos na patologia clinica como um todo desde a década de 90, devido ao sucesso que este tipo de ensaio obteve na quantificação de carga viral em pacientes HIV e HCV positivos. O desenvolvimento de um método que possua um alto grau de sensibilidade e especificidade e que ao mesmo tempo diminua a chamada janela imunológica se tornou uma meta para todos os envolvidos no circuito do sangue.

A tecnologia mais recente utilizada para triagem de doadores com base nos métodos moleculares é o NAT (*Nucleic Acid Amplification Test*), que utiliza como alicerce a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (LIMA, 2011). A reação de PCR permite que uma dada sequência de ácidos nucléicos seja amplificado milhares de vezes de forma rápida e eficiente. O material genético preferencialmente provem de DNA por ser uma molécula mais estável, contudo o RNA também pode ser usado como fonte, uma vez que existem patógenos como HIV que só apresentam esta estrutura como material genético. Por ser uma molécula instável e de fácil degradação o RNA primeiro deve ser transformado em uma molécula de DNA através da reação de RT-PCR, para que posteriormente possa ser amplificado e quantificado (GOLDENBERG, 2002). Esta técnica permite a detecção do material genético dos agentes infecciosos no plasma de um indivíduo, mesmo que estes estejam presentes em pequenas quantidades como acontece no início da infecção, sendo considerado mais sensível e específico que os métodos sorológicos, e conseqüentemente diminuindo de forma notável o tempo da janela imunológica (LIMA, 2011).

No Brasil, a primeira tentativa de implantar obrigatoriamente o NAT nos bancos de sangue ocorreu em 5 de Fevereiro de 2002 com a publicação da Portaria 262 pela ANVISA, que apresentava como prazo máximo 1 de Agosto de 2002 para o implantação do teste. Posteriormente, novas Portarias foram surgindo até que em 29 de Janeiro de 2004 foi publicada a Portaria 112 estabelecendo que o NAT se tornaria obrigatório no país a partir de Fevereiro de 2004, e que esta implantação seguiria um plano gradativo a nível nacional. Ainda hoje esta é a Portaria vigente sobre o assunto (CALEGARIO, 2009).

Segundo publicado pela ANVISA (2004):

Art. 1º Determinar a implantação, em etapas, no âmbito da Hemorrede Nacional, da realização dos testes de amplificação e de detecção de ácidos nucleicos (NAT), para HIV e para HCV, nas amostras de sangue de doadores.

§ 1º Esta implantação será gradativa, devendo a 1ª etapa se dar em número restrito de Serviços de Hemoterapia públicos.

§ 2º A seleção dos Serviços de Hemoterapia públicos, de que trata o parágrafo anterior, será definida pelo Ministério da Saúde, respeitando-se critérios epidemiológicos e sanitários, além de atender aos seguintes:

I – Dispor de área física pronta para a instalação dos equipamentos para a realização dos testes;

II – Dispor de um sistema informatizado com capacidade de armazenamento e processamento compatíveis com a demanda estimada, com capacidade interfacial com os sistemas de identificação das amostras de sangue e com os equipamentos que realizam os testes e que permita a transcrição automática dos resultados dos exames nos Serviços que realizarão os testes; e

III – Dispor de técnicos de níveis superior e médio, capacitados e disponíveis para serem treinados para executar o NAT.

Este estudo tem como objetivo realizar uma explanação sobre o que é o teste NAT, discutir as experiências de outros países que já passaram pelo processo de implantação do teste e abordar de forma crítica a implantação no Brasil apontando os pontos positivos e negativos quando comparado as metodologias já vigentes no país.

2 DISCUSSÃO:

Ao traduzirmos a expressão *Nucleic Acid Amplification Test* representada mundialmente pela sigla NAT, temos como resultado a frase Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos. Este título nos remete a base do ensaio que esta em identificar e quantificar a presença de um determinado tipo de material genético. O teste NAT tem se alicerçado na utilização de ferramentas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinar a presença de um patógeno qualquer de interesse e realizar a quantificação deste através da amplificação do genoma detectado, a fim de diagnosticar precocemente doenças transmissíveis pelo sangue diminuindo assim o risco de transmissão destas através do ato transfusional (LEVI, 2007).

2.1 Biologia Molecular: o aparecimento de uma nova tecnologia

Explorando um pouco mais sobre o universo molecular, podemos constatar que a PCR tem por definição a amplificação enzimática de uma determinada seqüência gênica, visando a produção de milhares de cópias desta seqüência *in vitro*. Este método foi descrito no final da década de 1980 pelo pesquisador Kary Mullis e revolucionou o mundo da ciência molecular, por se tratar de um procedimento simples e rápido para análise de genes. Tamaña descoberta rendeu ao pesquisador o prêmio Nobel de Química no ano de 1993 (FARAH, 2007).

2.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR clássica é baseada na replicação de DNA, utilizando uma fita simples do mesmo que funciona como molde para síntese de novas cadeias complementares através da enzima DNA polimerase, a qual tem a capacidade de inserir nucleotídeos que devem estar presentes no tubo de reação. Tais nucleotídeos são inseridos de forma complementar e respeitando a seqüência determinada pela fita-molde, no entanto a DNA polimerase necessita de um sinalizador que esteja acoplado ao molde para que a partir deste ocorra a inserção dos nucleotídeos subseqüentes (FARAH, 2007).

Este sinalizador é chamado de “ponto de início” ou *primer* como ficou mundialmente conhecido, e se trata de um oligonucleotídeo sintético de seqüência conhecida que se anela a fita-molde no ponto desejado, delimitando o fragmento de DNA que será amplificado de acordo com o interesse. Ambas as fitas de DNA podem ser usadas como molde, basta que *primers* específicos a cada fita sejam incluídos na reação (FARAH, 2007).

Durante a rotina, o que se faz é adicionar ao tubo de reação uma pequena quantidade de DNA extraído de tecidos ou fluidos biológicos, quantidades determinadas dos quatro nucleotídeos que compõe a cadeia do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), a enzima DNA polimerase, os primers específicos e uma solução tampão que confere condições ideais de pH para que a reação ocorra. O processo de amplificação ocorre em vários ciclos repetitivos, e cada ciclo é composto por três passos básicos: a desnaturação da cadeia de DNA, o anelamento dos primers nas fitas-molde e a síntese de novos fragmentos a partir da ação da DNA polimerase. Para que ocorra a desnaturação das fitas de DNA o tubo de reação é submetido a uma alta temperatura, que causa o rompimento das pontes de hidrogênio entre as duas cadeias do DNA, separando-as. Após a desnaturação a temperatura é resfriada um pouco para o que os primers possam se ligar as fitas já separadas que agora levam o nome de fitas-molde, promovendo o anelamento. Então, por fim, a reação chega a temperatura considerada ótima para que a enzima DNA polimerase possa atuar inserindo os nucleotídeos, realizando assim a síntese dos fragmentos desejados. Os ciclos são repetidos por 25 ou 30 vezes e podem gerar milhões de cópias do fragmento desejado (FARAH, 2007).

Inicialmente a DNA polimerase utilizada na PCR não era termoestável, o que obrigava a adição de mais enzima a cada ciclo. A primeira enzima termoestável foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus* e devido a sua procedência recebeu o nome de *Taq* polimerase, sendo esta enzima capaz de se manter estável mesmo após exposições repetidas a alta temperatura. Com o passar dos anos a PCR evoluiu bastante e enzimas ainda mais eficientes vem sendo isoladas recentemente. Outro ponto crítico na PCR é a escolha dos primers, que devem ter tamanho suficiente para se anelarem a fita-molde de maneira estável, além de não formar estruturas secundárias estáveis (FARAH, 2007).

Um ponto importante na questão do anelamento é a temperatura, que deve ser ideal para cada primer, uma vez que se for muito baixa o primer pode se ligar em outra porção da fita-molde, mesmo que esta não seja totalmente complementar, e se for muito alta o anelamento não acontece. A temperatura ideal vai depender das bases que o compõe e o comprimento do primer. Hoje a ciência molecular conta com auxílio de computadores que ajudam na escolha do primer ideal para cada situação, e sua temperatura de anelamento (FARAH,2007).

Ao final da amplificação é necessário a visualização do produto do teste, e para tanto o DNA sintetizado é observado através de uma eletroforese realizada em gel de poliacrilamida ou gel de agarose, que revelará o tamanho da seqüência amplificada. A técnica de PCR é considerada simples e eficiente, uma vez que realizada em condições favoráveis padronizadas (FARAH, 2007).

2.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase Reversa (RT-PCR):

Desde a descrição da técnica de PCR clássica no fim dos anos 80 ocorreram muitas modificações com a finalidade de aprimorar a técnica, o que levou ao surgimento de formas variantes de PCR. Uma destas variações que tem sido muito utilizada nos dias atuais é a RT-PCR, ou PCR reversa, que utiliza uma molécula de RNA como fita-molde ao invés de uma molécula de DNA. Este método se encaixa perfeitamente quando existe a busca por detectar e quantificar a presença de um determinado agente patológico que não possui material genético a base de DNA, apresentando apenas RNA em seu genoma como é o caso do vírus HIV (FARAH,2007).

Como já citado anteriormente a molécula de RNA é muito instável, se degrada com facilidade e não pode ser amplificada diretamente do vetor. Em consequência disso é necessária a obtenção de moléculas de DNA que sejam sintetizadas a partir de uma fita-molde do RNA mensageiro disponível, o resultado desta síntese é o chamado DNA complementar ou cDNA. A síntese de cDNA é mediada pela ação de uma enzima chamada transcriptase reversa, que é encontrada em vírus com genoma composto por RNA, e tem uma capacidade notória de converter o RNA viral em cópias de DNA que são integradas ao genoma da célula parasitada. Este ambiente é reproduzido *in vitro* na técnica de RT-PCR com a transcriptase reversa para que a partir de um RNA seja possível sintetizar cDNA (FARAH,2007).

A RT-PCR é uma técnica que tem se mostrado muito completa, pois combina a transcrição reversa de um genoma composto por RNA em cDNA que pode ser amplificado pela DNA polimerase viabilizando a detecção e quantificação da presença de patógenos como forma de diagnóstico. O uso de RNA como matéria prima para amplificação de material genético tornou possível o desenvolvimento do teste NAT introduzido nos bancos de sangue ao redor do mundo a partir do final da década de 1990 (FAHAR,2007).

2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR- REAL TIME):

De todas as variações da técnica de PCR clássica que apareceram ao longo dos anos, o método considerado mais inovador e importante até os dias atuais é a técnica de PCR em tempo real. A possibilidade de monitorar a reação durante o processamento dos ciclos revolucionou a quantificação de fragmentos de DNA e RNA. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente que emite um sinal que aumenta de acordo com a quantidade de fragmentos amplificados na reação de PCR (FARAH,2007)

Este método é totalmente automatizado e dispensa o uso da eletroforese em gel para visualização dos resultados após o fim da reação. O equipamento utilizado neste tipo de técnica, além de realizar os ciclos de temperatura para que ocorra a reação, também apresenta a capacidade de identificar e quantificar a fluorescência emitida pelas amostras (FARAH, 2007).

Este registro depende de raios laser que são enviados para todas as amostras em intervalos de tempo regulares através de fibras ópticas, e a fluorescência emitida pelo corante da amostra retorna pelas mesmas fibras e geram registros em um computador acoplado ao aparelho. Existem basicamente duas maneiras para que esta fluorescência apareça na reação, a primeira é com o uso de um corante específico que emite fluorescência apenas quando está ligado a uma fita dupla de DNA, portanto não há fluorescência no início da reação quando a fita-molde (seja de DNA ou de RNA) se encontra desnaturada como fita simples (FARAH,2007).

A segunda forma é com o uso de sondas marcadas com corante fluorescente que são específicas para o produto desejado da PCR, esta é desenhada para se anelar em uma região do fragmento produzido e emite fluorescência quando excitada pela luz. Ambos os métodos de visualização são sensíveis e precisos, revelando a reação de acordo a reprodutibilidade dos ciclos. A vantagem mais evidente da PCR em tempo real está em se tratar de um método rápido, automatizado e que facilita muito a quantificação do produto gênico esperado pela PCR, entretanto todas as vantagens do uso desta técnica para diagnóstico esbarram em um fator de grande dificuldade para sua implantação que é o alto custo do processo quando comparado a uma reação de PCR convencional. A tendência é que um dia haja substituição completa de uma pela outra, quando o custo for comparável (FARAH, 2007).

2.2 A implantação do Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAT):

A causa inicial da introdução do NAT nos bancos de sangue como triagem de doadores foi a grande janela imunológica que o vírus da Hepatite C pode apresentar de até 90 dias dependendo do teste sorológico utilizado. A incansável busca pela diminuição deste tempo levou a aplicação do teste NAT para detecção do RNA viral do HCV como teste pioneiro. Após a padronização e o sucesso obtido com o NAT em relação ao HCV, o próximo alvo que despontava no âmbito transfusional era o HIV (LEVI, 2007).

Muitos estudos foram realizados sobre a viabilidade do NAT para HIV, incluindo alguns que demonstraram o baixo custo-benefício do teste, contudo mais do que um novo objetivo científico para implantação do teste o receio e a tolerância zero da opinião pública sobre uma possível epidemia transfusional do HIV levaram a implantação do NAT a nível mundial também para detecção deste vírus. A maioria dos países que já implantaram o NAT na rotina do sangue adotou métodos "in house" de RT-PCR com gel de eletroforese numa fase inicial, migrando para o PCR em tempo real quando esta técnica se disponibilizou no mercado mundial. (LEVI, 2007).

2.2.1 Experiências sobre a implantação do NAT no mundo:

Nos países europeus o NAT começou a ser implantado entre 1999 e 2001 para detecção do vírus HCV, provavelmente por se tratar do primeiro teste obrigatório para triagem do plasma utilizado pela indústria. Alguns anos mais tarde o NAT para HIV foi progressivamente implantado nestes países seguindo um programa cauteloso (LAPERCHE, 2005). A Alemanha foi o país pioneiro na adoção do NAT para triagem de doadores de sangue, e ainda hoje grande parte do sangue produzido neste país é testado por métodos “in house” que obedecem a severas regras de controle de qualidade (LEVI, 2007).

O principal objetivo da introdução do NAT nos bancos de sangue europeus foi a redução do risco residual de transmissão viral ligada a janela imunológica. Para tanto, a maioria dos países adotou um modelo matemático específico que estima o risco residual de transmissão levando em conta o período de janela imunológica para cada agente, e a taxa de incidência de soroconversão em doadores de repetição. Embora amplamente aceito pela comunidade europeia este modelo apresenta algumas limitações como não levar em conta a população de doadores de primeira vez e a possibilidade de erros técnicos na realização dos testes, o que o torna um pouco distante da realidade (LAPERCHE, 2005).

Todos os países que utilizam o cálculo do risco residual para infecções através da transfusão de sangue vêm demonstrando uma diminuição considerável deste risco mesmo antes da implantação do NAT como teste de triagem. Grande parte desta diminuição está intimamente ligada a melhor seleção dos doadores de sangue e principalmente a políticas de prevenção contra estas doenças na população como um todo com objetivo de evitar novas infecções. Antes do NAT o risco residual para transmissão de HCV variava entre 0,64 na França a 3,94 na Espanha por milhão de doações registradas, e para a transmissão do HIV era de 0,59 na França a 2,48 na Espanha por milhão de doações. Após a implantação do NAT o risco residual para HCV tem variado entre 0,1 na França e 2,48 na Espanha por milhão de doações, para HIV se apresenta entre 0,18 na Alemanha e 1,1 na Itália por milhão de doações (LAPERCHE, 2005).

Nos Estados Unidos o NAT foi introduzido durante praticamente o mesmo período que na Europa de 1999 a 2002. Nos primeiros três anos da implantação do teste dentre 40 milhões de doações testadas foram encontrados 12 doadores que se apresentavam não reativos para testes sorológicos de HIV-1 e 170 doadores não reativos para teste de HCV que foram confirmados positivos para RNA viral das respectivas doenças. Desta forma o rendimento do teste foi estabelecido por uma razão de 1 doação NAT positiva em 3,1 milhões de doações para HIV-1, e 1 doação positiva em 230,000 doações para HCV (STRAMER, 2004).

Segundo publicado por Stramer (2004) estima-se que o risco residual para infecções associadas a transfusões nos Estados Unidos foi reduzido a 1 em 2 milhões de unidades provenientes de doadores de repetição após a introdução do NAT. Estes resultados se mostraram muito consistentes se comparados com as taxas anteriores ao NAT que eram de 1 em 276 mil doações para HCV e 1 em 1,5 milhões doações para HIV-1 com o uso de testes sorológicos sozinhos. Vários estudos vêm sugerindo que testes sorológicos sozinhos podem perder uma quantidade substancial de pessoas infectadas que ainda não apresentaram a soroconversão. Hoje a implantação do NAT aparece como certa na busca pela máxima segurança transfusional, no entanto os procedimentos ainda são heterogêneos e devem ser adaptados ao perfil de risco residual existente em cada população.

2.2.2 Introdução do NAT no Brasil:

No Brasil o NAT começou a ser desenvolvido em 1998, período que coincide com o desenvolvimento do teste na maioria dos países, portanto o teste brasileiro foi enquadrado numa metodologia semelhante. As variáveis sobre a implantação do NAT em cada país são muitas como, por exemplo, se o teste é feito individualmente ou em pool de doadores, se a opção for pelo pool qual o número de doadores que devem fazer parte deste pool, a prevalência de doadores reagentes para as doenças de interesse, e os recursos estruturais e financeiros que cada país apresenta (WENDEL, 2007).

A grande maioria dos países que já utilizam da metodologia NAT iniciou o processo de implantação com uso de pools de doadores numa fase de triagem para posterior confirmação individual e alguns ainda realizam seus testes de desta maneira. Os Estados unidos vêm utilizando pools contendo de 16 a 24 doadores, já países da Europa e Japão utilizam pools de 48 a 96 doadores, por enquanto no Brasil em uma padronização de técnica realizada “in house” são utilizados pools de 6 a 12 doadores (WENDEL, 2007).

Segundo publicado por Levi (2007) em um estudo que relata a introdução do NAT no Brasil através de uma metodologia “in house”, a técnica de escolha inicial foi a RT-PCR com eletroforese em gel para detecção de HVC RNA. Após três anos de sucesso com a técnica para HCV, decidiu-se adicionar o teste para HIV RNA no sistema já existente tendo em vista a padronização de uma RT-PCR multiplex que teria capacidade de detectar material genético de ambos os vírus simultaneamente. Desta forma seria possível que com apenas um ensaio os doadores fossem testados tanto para HCV quanto para HIV, sem alteração na sensibilidade do teste e com aumento mínimo no custo.

Os testes com a metodologia multiplex se iniciaram em Julho de 2001, e após dois anos o método foi considerado pronto para ser validado durante aplicação na rotina. Os testes se estenderam até 2005 e os resultados encontrados foram muito animadores. Em geral as taxas de repetições por resultados inadequados ou falsa reatividade foram semelhantes ao sistema NAT comercial aprovado mundialmente no mesmo período. O método “in house” brasileiro apresentou taxas de 0,16% de falsas positividade contra 0,17% apresentada pelo kit comercial de PCR em tempo real multiplex da Roche utilizado pelo Japão. Já na Europa esta taxa encontra-se um pouco menor, cerca de 0,14% no mesmo teste comercial, demonstrando que execução de testes comerciais também é variável dentre os países (LEVI,2007). É importante ressaltar que os testes “in house” desenvolvidos no Brasil sempre foram testados em paralelo com metodologias sorológicas e um amplo controle de qualidade, o que conferiu mais confiança na fidelidade dos resultados que o método demonstrava (WENDEL, 2007)

A opinião positiva que se fortalece sobre o uso de uma metodologia “in house” além de em seguir os parâmetros de aceitação mundial por nações como Japão e Alemanha, também passa pelo campo econômico por se tratar de uma metodologia muito mais barata e mais compatível com a realidade de recursos disponíveis (WENDEL, 2007).

Segundo dados divulgados por Lima (2011) a respeito de um estudo comparativo realizado no Hemocentro de Brasília entre as metodologias de Quimiluminescência e NAT para detecção do HCV foi encontrada uma concordância justa, porém não perfeita utilizando o coeficiente de Kappa.

Ainda segundo o intervalo que este coeficiente forneceu para comparação realizada, a concordância presente pode ser considerada igual aquela esperada pelo acaso. Ao colocarmos estes dados em porcentagens podemos observar que a concordância entre os métodos foi de 99,87%, contudo a porcentagem referente a concordância entre os resultados positivos foi de apenas 13,63%. Este percentual considerado baixo para os valores positivos tem relação mais provável com resultados falso-positivos encontrados no método de quimiluminescência, uma vez que os testes sorológicos utilizados nos bancos de sangue visam sempre maior sensibilidade acima da especificidade. Outra possível causa para esta discrepância seria a presença de indivíduos portadores do vírus que apresentam altos títulos de anticorpos circulantes e uma baixa carga viral, o que configura uma situação mais limitada (LIMA, 2011).

Neste mesmo estudo foram realizadas comparações entre três metodologias para detecção do HIV, sendo elas ELISA, Quimiluminescência e NAT. Os resultados encontrados nas comparações realizadas duas a duas foram semelhantes aos encontrados anteriormente para o HCV. Tanto entre ELISA e NAT, quanto entre Quimiluminescência e NAT o coeficiente encontrado foi de uma concordância justa, porém com discrepâncias nos valores considerados realmente positivos. A comparação que apresentou maior coeficiente de concordância foi entre ELISA e Quimiluminescência, porém ainda não suficientemente alta para dispensar a aplicação de um dos testes para detecção da doença (LIMA, 2011).

Em uma comparação ainda mais ampla confrontando as três metodologias encontramos que de 14.952 amostras testadas foram detectados 34 resultados positivos no geral, onde 29 destes foram discrepantes. Sete resultados positivos nos métodos de quimiluminescência e ELISA se apresentarem negativos no NAT, 1 resultado com ELISA inconclusivo e NAT positivo apresentou quimiluminescência negativa, 5 amostras se apresentaram positivas apenas pelo método de quimiluminescência e 16 apenas pelo ELISA. Estas diferenças fazem referência principalmente a resultados falso-positivos apresentados pelos testes sorológicos devido a alta sensibilidade como já citado acima (LIMA, 2011).

A amostra que causou maior discussão neste estudo foi aquela que se apresentou positiva para NAT, inconclusiva para ELISA e negativa para quimiluminescência. A carga viral desta amostra detectada pelo NAT foi altíssima contrastando com níveis muito baixos de anticorpos detectados apenas no teste de ELISA, o que poderia ser interpretado como um resultado falso positivo, uma vez que a quimiluminescência foi negativa. A análise deste caso volta a questão da importância da realização do NAT para detecção de casos considerados em janela imunológica, porém demonstra que a realização de pelo menos um teste sorológico junto com o NAT também é indispensável para conclusão do caso. Outro ponto importante revelado neste caso é a necessidade da utilização de ensaios sorológicos que tenham a capacidade de detecção tanto de antígenos quanto de anticorpos que classificam a amostra como inconclusiva pelo menos (LIMA, 2011).

Estudos realizados com testes que combinam a detecção de antígenos e anticorpos simultaneamente para o HCV demonstraram uma notável melhoria na detecção precoce da doença, onde 70,5% das amostras com NAT positivo para HCV e anticorpos negativos foram detectadas pelo teste. Estes dados demonstram que a utilização do teste combinado resultaria na diminuição do risco residual de transmissão da doença. Ainda segundo este estudo, se o risco residual de transmissão para HCV for de duas infecções ao ano sem a utilização do NAT, o uso de ensaio sorológico combinado poderia evitar pelo menos uma destas infecções. A utilização de testes combinados é considerada uma boa alternativa para países onde o NAT ainda foi implantado ou não é viável, pois se trata de uma metodologia muito mais barata e de fácil aceitação mesmo que não seja tão sensível como o NAT (LAPERCHÉ, 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Este estudo teve como proposta principal levantar e compilar dados bibliográficos que representassem a história mundial e principalmente brasileira do Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAT), realizando uma análise crítica sobre o custo-benefício de sua implementação no Brasil. Como foi descrito o NAT teve uma boa aceitação no mercado internacional por se tratar de um teste inovador que possui uma propriedade muito almejada no âmbito transfusional, a diminuição expressiva do tempo de janela imunológica. A implantação do NAT sem dúvida nenhuma será responsável por grandes ganhos no que está relacionado a segurança transfusional, porém não resolverá todos os problemas já existentes.

Estamos diante de uma inovação tecnológica que nos permitirá conquistar um grande avanço quanto a segurança do receptor de hemocomponentes, e a diminuição de descartes inadequados de bolsas que estariam sadias, mas foram bloqueadas por testes menos específicos. A diminuição do risco transfusional foi comprovada em muitos países Europeus como Alemanha, França e Itália após a introdução do NAT na rotina transfusional, o que torna nossa expectativa ainda maior sobre os benefícios que poderemos alcançar.

Contudo, nos deparamos com um ponto negativo inegável que pode dificultar e até mesmo retardar a implantação deste teste em nosso país, trata-se do alto custo que envolve o desenvolvimento do teste, além da necessidade de laboratórios com estrutura adequada e profissionais devidamente qualificados para este tipo de jornada. Como descrito no texto algumas alternativas são sugeridas por países Europeus para que aqueles que ainda não apresentam condições adequadas para adquirir o NAT como realidade no circuito transfusional, como por exemplo o uso de testes sorológicos combinados com a identificação simultânea tanto de antígenos quanto de anticorpos. Tais testes também tornam o risco transfusional um pouco menor, e pelo fato de se apresentarem com custos muito abaixo da tecnologia proposta pelo NAT são considerados por alguns uma solução mais viável para países que apresentam menores recursos financeiros.

O estudo publicado por Wendel (2007) traz relatos do desenvolvimento de uma rotina “in-house” do teste NAT que se mostrou muito bem sucedida. A utilização caseira deste tipo de teste ainda está longe do ideal, mas como foi demonstrado se houver um rígido controle de qualidade e padronização das técnicas as chances de sucesso são consideravelmente boas e driblam a dificuldade financeira comentada acima. O fato é que não podemos aceitar que o lado financeiro nos desanime tanto, uma vez que a utilização de metodologias alternativas e o uso de pools para triagem inicial dos testes o tornam mais barato e sem grandes perdas na especificidade ou sensibilidade.

É claro que não podemos achar que apenas o a utilização do NAT vai resolver todos os problemas que envolvem o risco transfusional, pois mesmo se tratando de um teste bem mais específico e que reduz consideravelmente a janela imunológica ainda assim não haverá transfusão 100% segura. Como demonstrando no estudo realizado no Hemocentro de Brasília por Lima (2011), em algumas situações a sorologia se torna uma arma importante para elucidação de casos atípicos.

Após tudo que foi exposto e discutido por este trabalho, a decisão mais acertada, segundo um ponto de vista próprio, seria conduzir a introdução da plataforma NAT de forma gradual e em conjunto utilizar as técnicas sorológicas disponíveis para complementar o diagnóstico. A conclusão alcançada está baseada nos diferentes princípios de cada teste que por fim se complementam e colaboram para um circuito transfusional cada vez mais seguro contando com a alta sensibilidade da sorologia e a alta especificidade obtida com o uso do NAT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRASIL. Portaria nº 112, de 29 de Janeiro de 2004. **ANVISA**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 3p.

CALEGARIO, T. A. **Implantação do NAT nos Bancos de Sangue**. 2009. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização)- Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2009.

CARRAZONE, C.F.V.; BRITO, A.M.; GOMES, Y.M. Importância da Avaliação Sorológica Pré-Transfusional em Receptores de Sangue. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, São Paulo, v.26, n.2, p.93-98, 2004.

FARAH, S. B. **DNA: Segredos e Mistérios**. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2007.538p.

FERREIRA, A.W.; AVILA, S.L. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.443p.

GARCIA, F.B. ET al. Importância dos Testes Sorológicos de Triagem e Confirmatórios na Detecção de Doadores de Sangue Infectados pelo Vírus da Hepatite C. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, São Paulo, v.30, n.3, p.218-222, 2008.

JUNQUEIRA, P.C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Rev. Bras. hematol. hemoter.** São Paulo, v.27, n.3, p.201-207, 2005.

LAPERCHÉ, S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe. **Eurosurveillance**, v.10, p.1-3, 2005. Número Especial.

LAPERCHÉ, S. ET al. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing?. **Transfusion**, Bethesda, v.45, p.1965-1972, Dez.2005.

LEVI, J. E. et al. Replacement of HIV p24 Ag test by a multiplex RT-PCR method for primary screening of blood donors. **Rev Inst. Med. S. Paulo**, São Paulo, v.49, n.3, p.171-176, Maio/jun.2007

LIMA, D. S. **Estudo Comparativo de Metodologias de Triagem para HIV e HCV em Doadores de Sangue**. 2011. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização)- Academia de Ciências e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2011.

SANTOS, E. A.; MARCELLINI, P. S.; RIBEIRO, J. P. Avaliação Epidemiológica das Rejeições dos Doadores de Sangue no HEMOLACEN/SE no Período de 2004 a 2006. **RBAC**. Aracaju, v.40, n.4, p.251-256, jul.2008.

STRAMER, S. L. ET al. Detection of HIV-1 and HCV Infections Among Antibody-negative blood Donors by Nucleic Acid Amplification Testing. **N. Engl. J. Med.**, v.351, p.760-768, 2004. Número Especial.

PEREIRA, R. S. M. R. ET al. Doação de Sangue: solidariedade mecânica versus solidariedade orgânica. **Rev Bras. Enferm**, Brasília, v.63, n.2, p.322-327, mar/abr. 2010.

WENDEL, S. et al. Primary Screening of Blood Donors by NAT Testing for HCV-RNA: Development of an "in-house" Method and Results. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.49, n.3, p.171-176, maio/jun. 2007.