

O uso do teste de ácidos nucleicos para a confirmação de agentes infectocontagiosos nos Bancos de Sangue do Brasil

DANIANE NOVAIS FERRARI

Biomédica, Farmacêutica, Pós-Graduanda “*Lato-Sensu*” em Hematologia e Banco de Sangue – Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto.

Resumo

A segurança do sangue doado passou a ser prioridade, após a descoberta de vírus que podiam ser facilmente transmitidos através de transfusões sanguíneas, diante disso, ocorreu a necessidade de aumentar a sensibilidade dos testes de triagem realizados nos bancos de sangue de todo o mundo, inclusive no Brasil e no final dos anos 90 o NAT começou a ser implementado para estudos no país, tratando-se de um método adicional aos testes sorológicos utilizados nos bancos de sangue do mundo todo. O objetivo dessa pesquisa foi mostrar a importância do uso do teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) e a sua relevância para a confirmação de doenças infectocontagiosas. O teste é capaz de diminuir o período da janela imunológica de 22 dias para 11 dias para o HIV e de 70 para apenas 12 dias no caso das Hepatites C, assim como de 50 para 39 dias no caso do HBV, também é possível observar uma diminuição nos casos de testes falso-positivos para essas patologias, observando assim um valor ainda maior no uso do teste para a segurança da saúde em todo o país.

Palavras-chave: NAT. Doação de sangue. HIV. HCV. HBV.

Abstract:

The safety of donated blood became a priority after the discovery of viruses that could easily be transmitted through blood transfusions, and there was a need to increase the sensitivity of screening tests performed in blood banks around the world, including In Brazil and at the end of the 90's the NAT began to be implemented for studies in the country, being an additional method to the serological tests used in the blood banks of the whole world. The objective of this research was to show the importance of the use of the nucleic acid detection test (NAT) and its relevance for the confirmation of infectious and contagious diseases. The test is able to shorten the immunological window period from 22 days to 11 days for HIV and from 70 for only 12 days for Hepatitis C, as well as from 50 to 39 days for HBV, it is also possible to observe a decrease in the cases of false-positive tests for these pathologies, thus observing an even greater value in the use of the test for health security throughout the country

Keywords: NAT. Blood donation. HIV. HCV. HBV.

1. INTRODUÇÃO

A doação de sangue é valorizada na prática médica em todo o mundo, por ser uma importante alternativa terapêutica para doenças em que o sangue e seus derivados constituem uma forma de tratamento.

A Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde, está vigente e é utilizada pelos Hemocentro do país e segundo esta, a doação de sangue é um ato anônimo, altruísta, voluntário e não remunerado, envolvendo três etapas: 1) o registro do candidato, onde seria a identificação do candidato através de um formulário; 2) a triagem clínica, responsável por avaliar o estado e o histórico de saúde, os hábitos e comportamentos do doador (BORDIN, LANGHI, COVAS, 2007; CARRAZZONE, 2004) identificando sinais e sintomas de patologias nos candidatos (MONTEIRO, COMPARSI, 2015), e 3) a triagem sorológica, que é uma análise dos testes laboratoriais, onde irá determinar se o sangue já coletado está apto para a doação (BORDIN, LANGHI, COVAS, 2007; CARRAZZONE, 2004).

Esta mesma portaria, define a obrigatoriedade da realização dos testes para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1/HIV-2), Vírus Linfotrópico Humano (HTLV-I/HTLV-II), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Hepatite B (HBV), *Tripanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Treponema pallidum* (*T. pallidum*), *Plasmodium falciparum* (em regiões endêmicas), sejam analisados obrigatoriamente em cada doação e citomegalovírus (CMV, pacientes imunocomprometidos), caso não ocorra a possibilidade de execução da técnica de filtração e irradiação dos hemocomponentes prontos para transfusão (BORDIN, LANGHI, COVAS, 2007). Os testes utilizados para a detecção de HIV durante as triagens dos doadores de sangue é o de detecção de anticorpo contra o HIV, e detecção combinada de anticorpo contra o HIV mais antígeno p24 do HIV, método este, usando o teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) (BRASIL, 2016), técnica também usado para a detecção do vírus da Hepatite B e Hepatite C.

As pesquisas de agentes virais, para testes laboratoriais com amostras de doadores de sangue, tiveram início em 1963, com o teste para a pesquisa do antígeno de superfície “S” do vírus da hepatite B (HBsAg) (DWYRE, FERNANDO E HOLLAND, 2011), no entanto, apenas em 1975 houve a implementação do teste para HBsAg (BRASIL, 2003), e somente em 1993 a detecção de marcadores para o vírus da hepatite C (HCV), assim como para o vírus da

imunodeficiência humana (HIV) nos anos 1980 e 1990 no Brasil, diminuindo significativamente os riscos de infecções transmitidas pelas transfusões sanguíneas aos receptores (DWYRE, FERNANDO E HOLLAND, 2011; PETRY, 2013).

No final dos anos 90 o NAT começou a ser implementado para estudos no Brasil, no mesmo período em que técnicas de amplificação tornaram-se comuns nos laboratórios de biologia molecular. O teste é capaz de diminuir o período da janela imunológica de 22 dias para 11 dias para o HIV e de 70 para apenas 12 dias no caso das Hepatites C, através da detecção do RNA do vírus dessas infecções (AZEVEDO et al., 2009). O período da janela imunológica é um fator preocupante para a segurança do sangue a ser doado, já que mesmo com os avanços nas técnicas de diagnóstico dessas doenças ainda é possível a transfusão dos componentes sanguíneos infecciosos no período de tempo em que os resultados de todos os testes analisados são negativos, possibilitando a transmissão do agente infeccioso para o paciente receptor do sangue doado (PETRY, 2013).

Dessa forma, esse estudo possui como objetivo, mostrar através de uma revisão bibliográfica, a importância do uso do teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) e a sua relevância para a confirmação de doenças infectocontagiosas, como o HIV e o HCV, assim como o de HBV, durante a doação de sangue.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa ou tradicional de artigos científicos, tese e dissertações, apresentando uma temática mais aberta, sem uma questão específica e bem definida, onde não possui a necessidade de um protocolo rígido para sua confecção, as fontes não são pré-determinadas e específicas, com uma seleção de artigos mais livres (CORDEIRO et al., 2007). Nesse trabalho será abordado o uso do teste de detecção de ácidos nucleicos (NAT) nos bancos de sangue do Brasil, para a confirmação das patologias de HIV, Hepatite B e C.

A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas, nacionais e internacionais, *Scientific Electronic Library On-Line* (SCIELO), *US Library of Medicine* (PUBMED), Biblioteca Virtual da Saúde (BVS) e Google Acadêmico,

utilizando as palavras chave: detecção de ácidos nucleicos, NAT, banco de sangue, HIV, Hepatite B, Hepatite C, assim como suas versões no idioma inglês

3. DESENVOLVIMENTO

O teste de amplificação de ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Amplification Test* - NAT) é um método adicional aos testes sorológicos utilizados no banco de sangue, como o teste de ELISA e de quimioluminescência e não apresenta a capacidade de substituir esses métodos, já que com o avanço da infecção, a carga viral em algum momento é indetectável (KLEINMAN et al., 2009). A introdução do NAT como método nas amostras de doadores de sangue foi buscar uma maior segurança no sangue doado pela detecção de infecções virais agudas em fase da janela imunológica que não são detectáveis apenas com os teste de triagem de pesquisa de anticorpos. O NAT utiliza principalmente uma técnica de biologia molecular, o PCR (Polimerase Chain Reaction) capaz de amplificar e identificar o RNA viral presente no plasma do doador infectado, uma vez que pequenos níveis de RNA viral podem ser detectados já no início da patologia, reduzindo assim o período da janela imunológica (KUCIRKA et al, 2011; LIMA, 2011).

3.1. História do teste de ácidos nucleicos (NAT)

A primeira implantação do teste em um serviço de hemoterapia foi em 1997 na Alemanha e sucessivamente outros países foram adotando a tecnologia na triagem dos doadores de sangue (ROTH et al, 2012), como nos Estados Unidos que ocorreu em 1999 (DWYRE et al, 2011). No Brasil o Ministério da Saúde buscou desde 2002 a utilização da tecnologia do NAT para os bancos de sangue do país, no entanto, em 2003, o valor cobrado nos kits NAT internacionais por amostra testada eram muito elevados, o que gerou a necessidade do desenvolvimento de um kit nacional, que fosse possível para o país e em dezembro de 2010 a Bio-Manguinhos/FIOCRUZ obteve registro do kit NAT aprovado pelo órgão regulador (ANVISA), proporcionando uma implantação efetiva do NAT nos serviços de hemoterapia do Brasil (CGSH, 2012). Após a fase experimental do kit, foi apenas no ano de 2013 que o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2.712 de 12 de Novembro de 2013, que tornou o teste obrigatório para todas as amostras de doadores de sangue coletadas nos bancos de sangue públicos e privados do país. No ano de 2014, ocorreu a

implementação de um novo alvo no kit NAT, o HBV, vírus responsável pela transmissão da hepatite B, com a redução da janela imunológica para até 12 dias (PORTELLA, 2016).

3.2. Técnicas do NAT

O teste pode ser realizado através de diferentes técnicas moleculares, onde as mais vistas, segundo Barban, 2015, é a reação em cadeia da polimerase (PCR) e à amplificação por transcrição (TMA). A técnica usada por PCR, como proposta na portaria nº 158 de 2013 do Ministério da Saúde, mesma técnica usado no kit NAT Bio-Manguinhos (PCR-RT), é um método extremamente sensível que permite a clonagem de fragmentos do RNA relativamente curtos (menores que 10.000 pares de nucleotídeos), onde permite sua detecção através de uma coloração fluorescente ou eletroforese em gel (SAAD, 2006; BARBAN, 2015). São dois tipos de PCR, o convencional (PCR-C) e o real time (PCR-RT), diferenciando-se apenas no momento da análise e na liberação dos resultados, já que o segundo método analisa a amplificação no momento em que ocorre e é um método quantitativo, mais rápido e sensível (BRASIL, 2007; BARBAN, 2015). Com a capacidade de detectar mais de um tipo de RNA viral na mesma reação é um método mais usado e obrigatório para a triagem de doadores de sangue em vários países (LIMA, 2011).

Já o teste de amplificação por transcrição (TMA) é contínuo e isotérmico de amplificação do RNA a partir de *primers* capazes de interpretar a sequência a ser amplificada. Diferentemente do PCR, a TMA não necessita do termociclador, já que todo o processo ocorre em uma temperatura constante e a TMA usa apenas um kit que permite a detecção simultânea (multiplex) do RNA viral (BARBAN, 2015), o PCR usa dois kits para essa detecção (ANVISA, 2007).

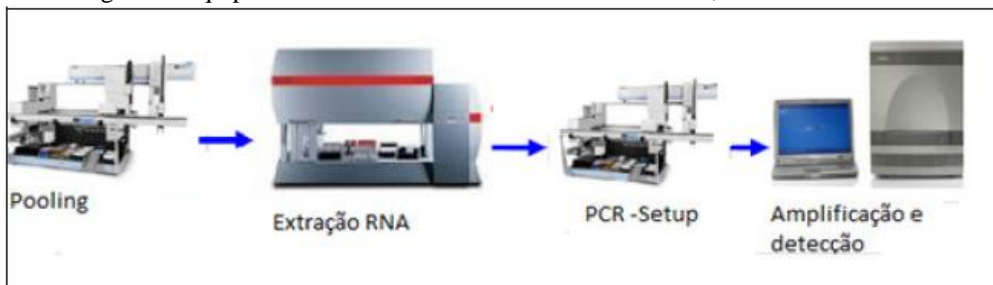
3.3. Funcionamento da plataforma NAT.

Existem diferentes kits NAT registrados e aprovados pelo Ministério da Saúde, como o da empresa Gen-Probe, que usa a técnica de TMA e o da empresa Roche, que assim como o kit Bio-manguinhos/FIOCRUZ também usa a tecnologia por PCR-RT, todos citados no estudo de Petry em 2013 de uma forma mais detalhada, no entanto, todas as técnicas são realizadas de maneira semi-automatizada ou automatizada, sendo importante em um banco de sangue,

devido ao elevado número de amostras na rotina diária. Alguns kits utilizados para esse diagnóstico são capazes de detectar dois vírus HIV e HCV e outros podem detectar simultaneamente os vírus HBV, HCV e HIV (LIMA, 2011).

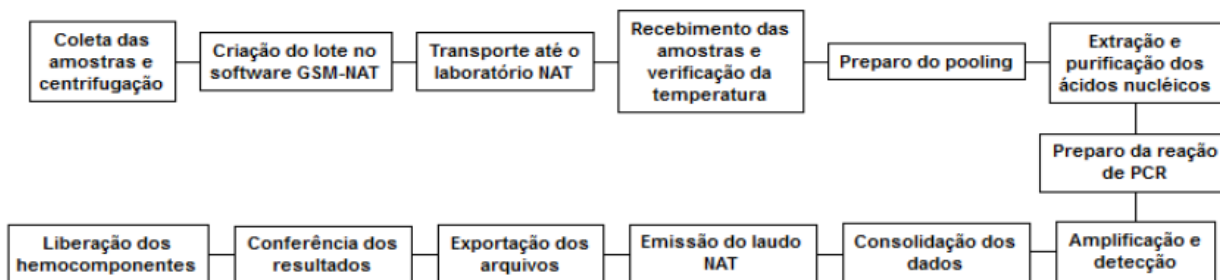
A chamada plataforma NAT é composta por três equipamentos integrados (Figura 1), que realizam diferentes etapas no funcionamento do teste, como ilustrado por Petry em 2013, na figura 2, pela técnica de PCR, usando um dos kits nacionais. Segundo estudo de Phikulsod e colaboradores (2009) o equipamento COBAS TaqScreen Multiplex Test MPX A da Roche é um dos usados para a realização do teste por sistema automatizado, com o auxílio de um pipetador automático, prepara as amostras em *pool*, em seguida a extração se dá através do equipamento COBAS AmpliPrep e consequentemente a amplificação por real-time PCR e detecção através do equipamento de análise COBAS TaqMan. O sistema é todo controlado por um software, desenvolvido pelo Ministério da Saúde, junto com a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH), responsável também por interpretar os resultados finais.

Figura 1: Equipamentos da Plataforma NAT. Fonte: CGSH,2012.



Sendo capaz de analisar 552 amostras, o tempo de execução dos testes são de aproximadamente 8 horas e 30 minutos.

Figura 2: Esquema de execução dos testes NAT. Fonte: CGSH, 2012.



3.4. NAT e os agentes infectocontagiosos.

Quando analisado a redução da janela imunológica com o uso do teste NAT, foi observado que para o vírus HIV de 16-20 dias nos testes sorológicos caiu para 10-12 dias, de 70 dias para 10 dias quando visto no vírus HCV e de 50 para 39 dias o do HBV com o NAT (NUBLING et al, 2009; VELATI et al, 2008; ZOU et al, 2010; LIMA, 2011). Estudo realizado por Lima (2011), na Fundação Hemocentro de Brasília, analisou as concordâncias e discrepâncias entre os testes NAT para HIV e HCV com os testes sorológicos (ELISA e Quimioluminescência), observou resultados de 99,81% para HIV e 99,87% para HCV quando visto a concordância entre os testes e quando analisados apenas os resultados positivos foram de 14,71% do HIV e 13,63% do HCV, onde a maior parte dos resultados foram de falso-positivos nos testes sorológicos, concluindo que a inclusão do NAT foi não só importante para a redução do período da janela imunológica, mas também para o esclarecimento de resultados falso-positivos dados pela sorologia, que também causa a inaptidão dos doadores e descarte das bolsas.

Uma pesquisa realizado por Kupek e Petry (2014) foram analisados mais de 700 mil amostras de doadores de sangue ao longo do período de 2007 a 2013 em sete hemocentros do estado de Santa Catarina, comparando o antes e depois da introdução do NAT para o HIV e HCV (teste que durante esse período ainda estava em fase experimental), foi observado nesse estudo um aumento da prevalência em 14,5% e a incidência de 54,2% do HIV no período antes do NAT contra o período pós NAT e o risco residual diminuiu 2,5 vezes com a introdução do NAT. Quando visto os resultados para o HCV, a soroprevalência aumentou 1,22-1,35 por 1.000 doadores e a incidência caiu 0,12-0,06 por 1.000 doadores/ano, assim como o risco residual também diminuiu mais de 3 vezes após a implementação do NAT, mostrando assim também a eficiência da técnica em diminuir riscos de transmissão do vírus da Hepatite C através de transfusão sanguínea. Neste mesmo estudo observou também que a prevalência foi maior em doadores de repetição, ou seja, em indivíduos que já haviam doado antes e indivíduos do sexo masculino com baixa escolaridade, diferente dos resultados encontrados por Sabino e colaboradores (2012), que observou uma maior prevalência em doadores que estavam doando pela primeira vez, já que muitos dos candidatos procuravam o teste HIV de rotina nos bancos de sangue. No ano

de 2009, foi observado duas transmissões de HIV através da transfusão sanguínea em locais que não havia sido introduzido o NAT durante a fase experimental (PINTO et al, 2012).

Estudo realizado por Almeida-Neto em 2013, mostrou que no Brasil, a prevalência estimada de doadores NAT HCV positivos era de 0,2% e o risco transfusional sem o NAT foi estimado de 1:200.000, no entanto, a incidência de hepatite C pós-transfusional seria de 0,002% e o risco residual de 3,7 para cada milhão de transfusões realizadas quando utiliza testes de anti-HCV na triagem sorológica de doadores (HAMERSCHILAK; SARAIVA, 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão do NAT nos bancos de sangue do país não foi apenas importante para a detecção da janela imunológica de uma forma mais reduzida quando comparado aos demais testes utilizados (testes sorológicos), mas também para esclarecer casos de resultados falso-positivos visto na sorologia, como observado em estudos aqui citados. Ao longo dos anos podemos perceber uma diminuição significativa nos casos das infecções adquiridas através de transfusão sanguínea. Um melhor entendimento da população sobre o doação de sangue e o riscos que isso pode acarretar, seria relevante para causar uma maior diminuição nos casos positivos de HIV, HCV e HBV, principalmente em bancos de sangue em regiões mais desenvolvidas do país, já que muitas pessoas procuram os bancos de sangue para a realização de teste de rotina, aumentando assim esses números de casos nas patologias infecciosas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Medicine* 2013; 53: 827–834.

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, 2007.

Azevedo R, Kashima S, Vaentes VB, Sant'ana MAS, Machado JPDP, Barban GN, Ubiali EMA, Covas DT. Desenvolvimento e implantação do teste NAT in house em um Hemocentro. *Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31: 271-414.

Barban GB. Importância do teste do ácido nucleico – NAT – nos banco de sangue do brasil. 2015. 12 f. Artigo de revisão (Especialização) do Programa de Pós Graduação Lato-Sensu da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2010.

Brasil, Ministério da Saúde. **Portaria 79**, publicada em DOU em 31 de janeiro de 2003. Disponível online: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/79_03.htm>. Acesso em: 13 jun 2017.

Brasil MS. Portaria nº 158, de 04. 02. 2016. Redefine o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos – DOU de 05.02.2016

Brasil MS. Portaria nº 2.712, de 12. 11. 2013. Redefini o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos – DOU de 13.11.2013.

Bordin JO, Langhi DJ, Covas DT. *Hemoterapia: Fundamentos e prática*. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2007

Carrazzone CFV, Brito AM de, Gomes YM. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2004; 2: 93-98.

CGSH, Ministério da Saúde. Projeto piloto – Avaliação preliminar da plataforma brasileira de testes NAT multiplex HIV/HCV e seus processos na hemorrede oficial. Brasília, 2012.

Cordeiro, AM et al. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões* 2007; 34: 428-431.

Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. Hepatitis B, Hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. *Vox Sanguinis* 2011; 100: 92-98.

FIOCRUZ. Repositório institucional da Fiocruz. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15005>. Autor Portella. Acesso em: 28 jun 2017.

Hamerschlak N, Saraiva JCP. Hemoterapia e Doenças Infecciosas. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2014.

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* 2009; 49: 2454-2489.

Kupek E, Petry A. Changes in the prevalence, incidence and residual risk for HIV and Hepatitis C virus in Southern Brazilian blood donors since the implementation of NAT screening. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014; 47: 418–425.

Kucirka LM, Sarathy H, Govindan P, Wolf JH, Ellison TA, Hart LJ, Montgomery RA, Ros RL, Segev DL. Risk of window period HIV infection in high infectious risk donors: Systematic review and meta-analysis. *American Journal of Transplantation* 2011; 11: 1176-1187.

Lima DS. Estudo comparativo de metodologias de triagem para HIV e HCV em doadores de sangue. Artigo de revisão bibliográfica (Especialização) do Programa de Pós Graduação Lato-Sensu da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2011.

Monteiro DK, Comparsi B. Principais fatores associados à inaptidão temporária e permanente de candidatos à doação de sangue. *Revista de Saúde Integral*. 2015; 15:1-13.

Nubling CM, Heiden M, Chudy M, Kress J, Seitz R, Keller-Stanislawski B, Funk MB. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion* 2009; 49:1850-1858.

Petry A. Implantação dos testes de amplificação de ácidos nucléicos HIV/HCV Bio-Manguinhos® na triagem de doadores de sangue: questões epidemiológicas e logísticas. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

Pinto AR, Petry A, Graef T, Vandresen R, Kupek EJ. Case report of haemovigilance investigation using phylogenetic analysis of HIV-1 in Brazil. *Transfusion* 2012, 22: 57-62.

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. *Blood Donors and Blood Collection. 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* 2012; 102: 82-90.

Sabino EC, Gonzalez TT, Carneiro-Proietti AB, Sarr M, Ferreira JE, Sampaio DA, Salles NA, Wright DJ, 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* 2012, 52: 870–879.

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

Velati C, Romano L, Fomiatti L, Baruffi L, Zanetti R. 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.

Zou S, Dorsey KA, Notari EP, Foster GA, Kryzstof DE, Musavi F, Dodd RY 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.