

Detección de ácidos nucleicos
(NAT)
en la provisión de sangre segura
en bancos de sangre. Experiencia
en Rosario – 2004-2008

Dr. Fabián Fay
CIBIC

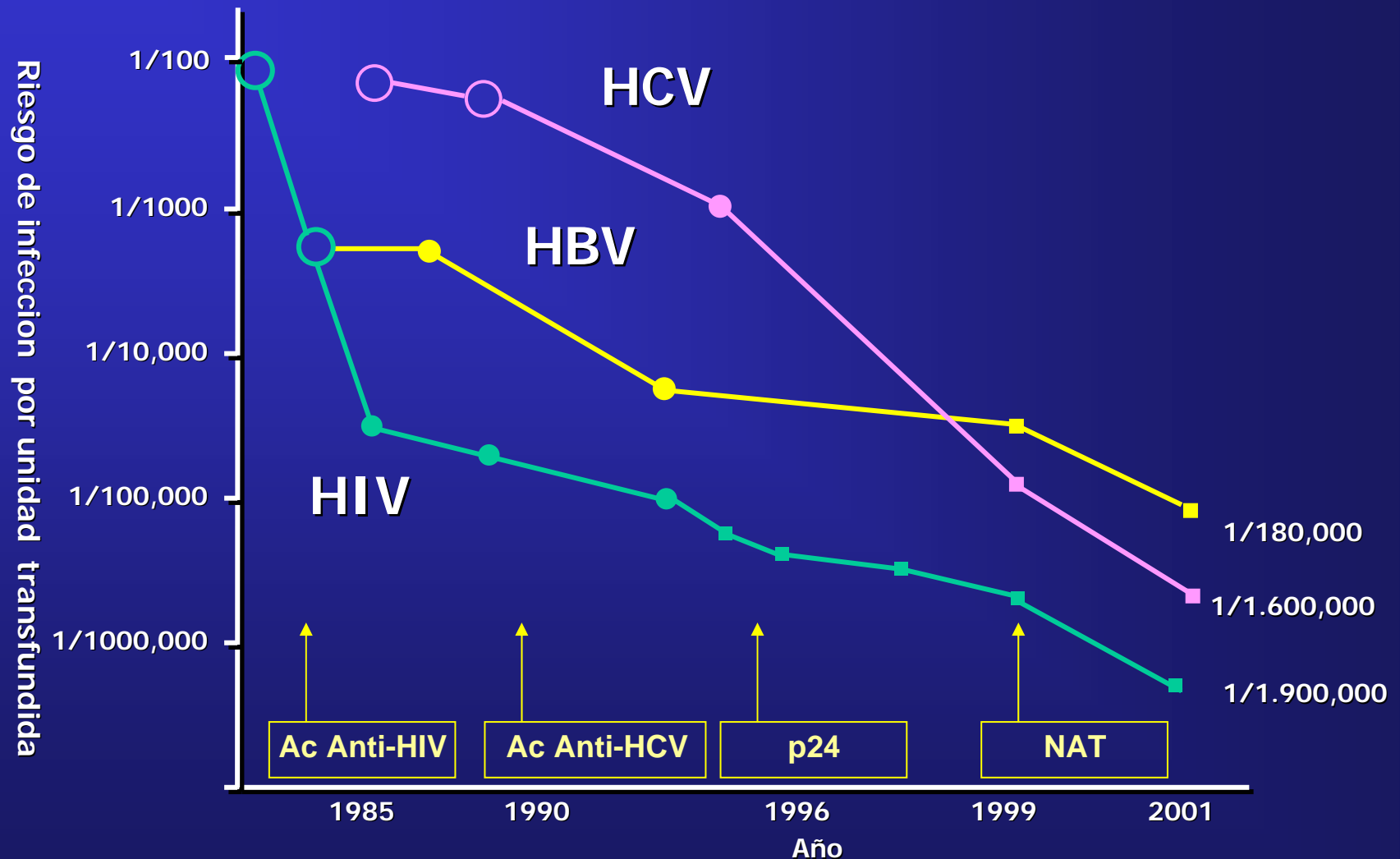
Centro de Diagnostico Medico de Alta
Complejidad S.A.
Rosario – Argentina

Seguridad Transfusional

El riesgo de transmisión viral asociada a transfusiones de sangre se ha disminuido en las pasadas décadas debido a:

- Mejoramiento en la selección de donantes
- Métodos de inactivación viral
- Aparición de métodos de tamizaje mas sensibles

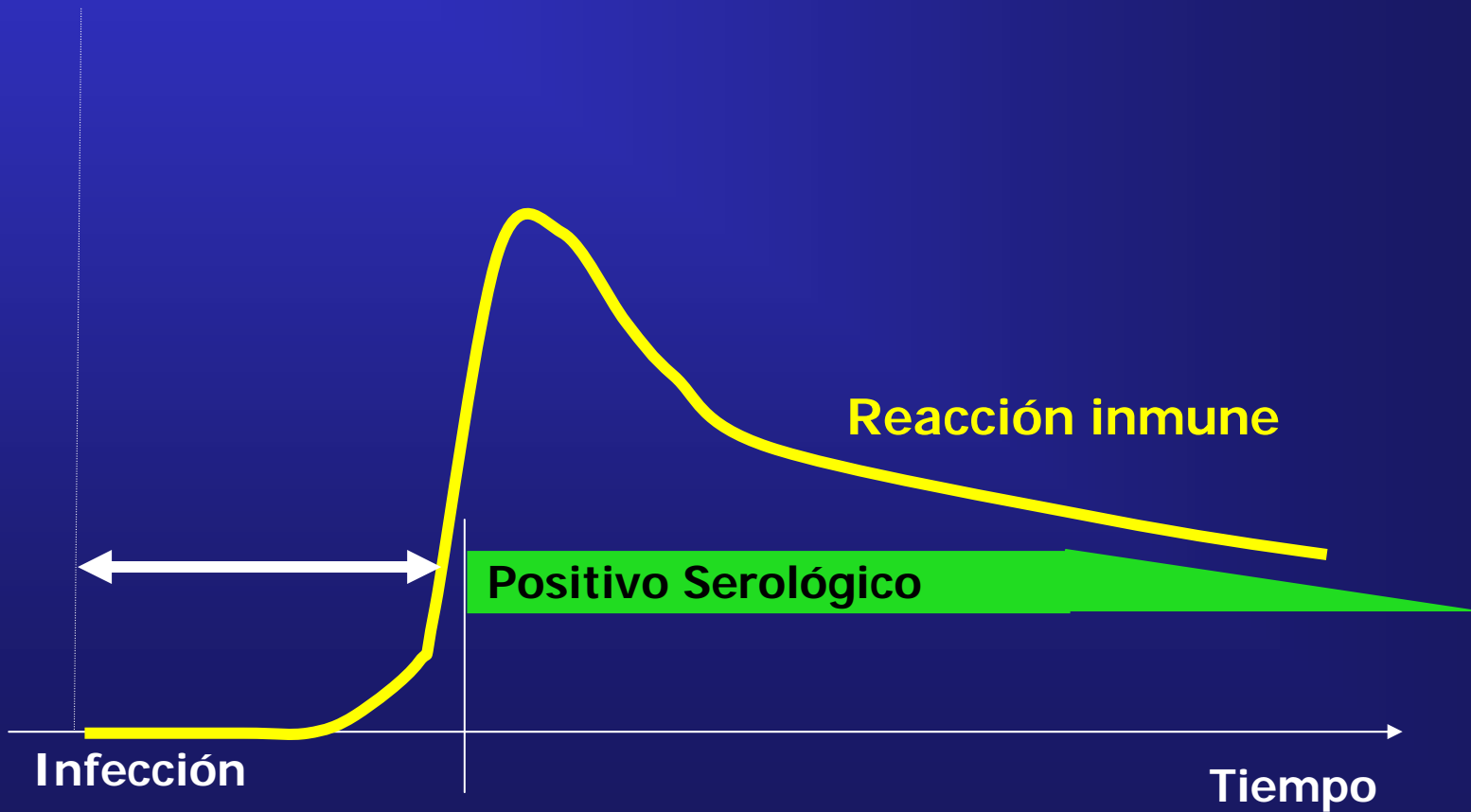
Evolución del riesgo en la provisión de sangre



Bacterial Contamination of Blood Components: Risks, Strategies, and Regulation Hillyer et al.
Joint ASH and AABB Educational Session in Transfusion Medicine. *Hematology* 2003

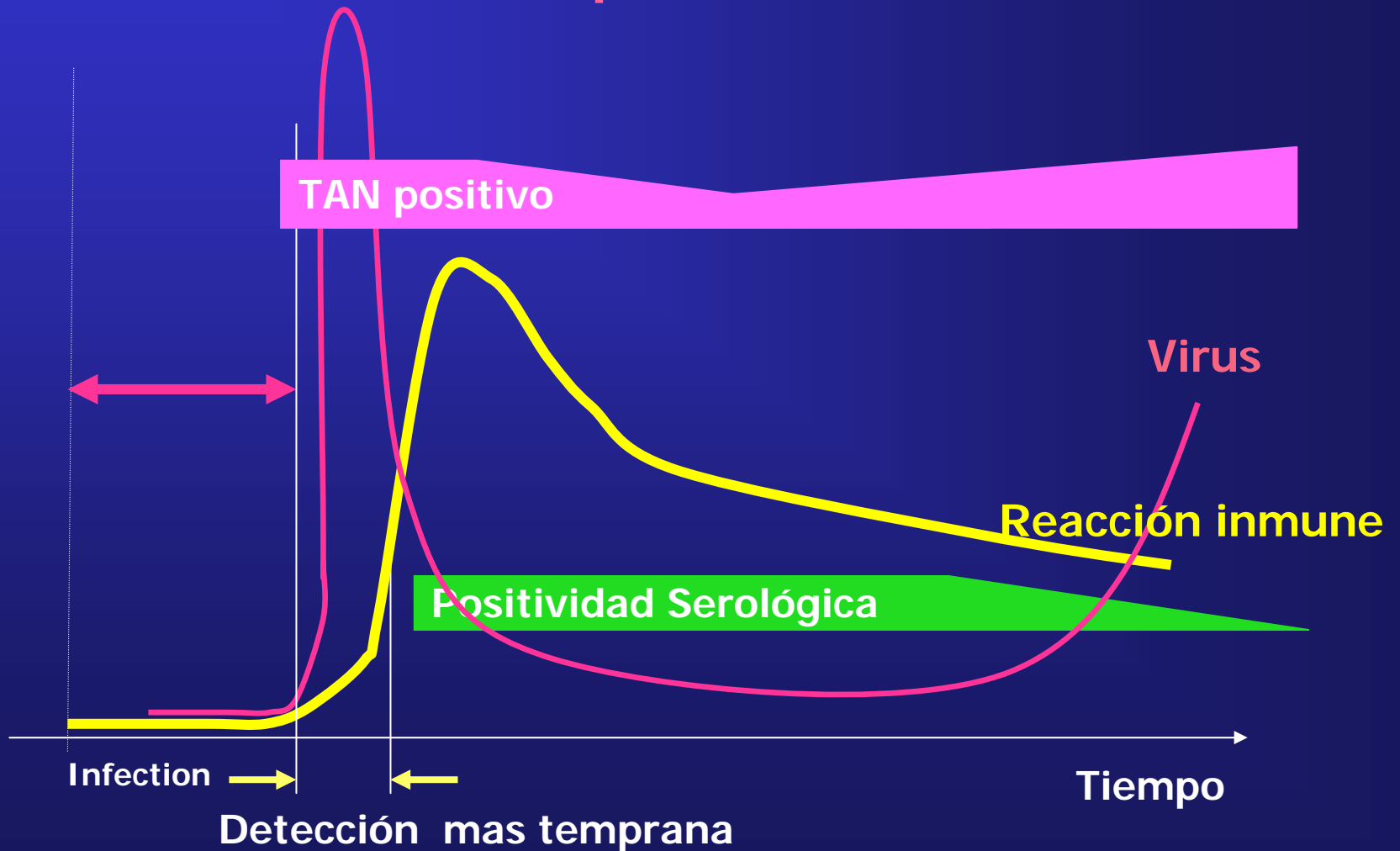
Período de Ventana

Tiempo entre el momento de la infección y el desarrollo de marcadores serológicos



Objetivo de NAT

Disminución del período de ventana



¿Por que aplicar NAT en screening de sangre?

- **NAT disminuye el período de ventana con relación a la serología clásica:**
- **La disminución de las unidades infectivas provocará en forma significativa:**
 - **Disminución del riesgo de utilizarlas**
 - **Eliminación de los costos de diagnóstico y tratamiento de dichas infecciones**
 - **Mejoramiento de la confiabilidad de la seguridad biológica de la sangre y hemoderivados**

Experiencia en Rosario:

Tecnología empleada en NAT

Ampliscreen – Roche Diagnostics

Metodología empleada: PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

- [COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, v1.5](#)
- [COBAS AmpliScreen™ HCV Test, v2.0](#)
- [COBAS AmpliScreen™ HBV Test, v2.0](#)

Aspectos fundamentales del diseño de las NAT

- **Sensibilidad** (Definición de valor de corte del ensayo y Hit rate)
- **Especificidad** (Reactividad cruzada)
- Capacidad para detectar todas las variantes/subtipos posibles de cada uno de los agentes testeados
- **Reproducibilidad**
- **Estandarización**
- Control de contaminación cruzada

Sensibilidad

1. Referencia contra que se mide: Todos los Kits comerciales validan contra Estándar internacional de OMS
2. Posibilidad de tener una referencia de la sensibilidad en cada ensayo:
 - Control positivo
 - Control negativo
 - Controles internosEstos controles deberían ser realizados para cada agente testeado y validados por lote de reactivos.
3. Definición del Hit-Rate del ensayo por lote de reactivos.

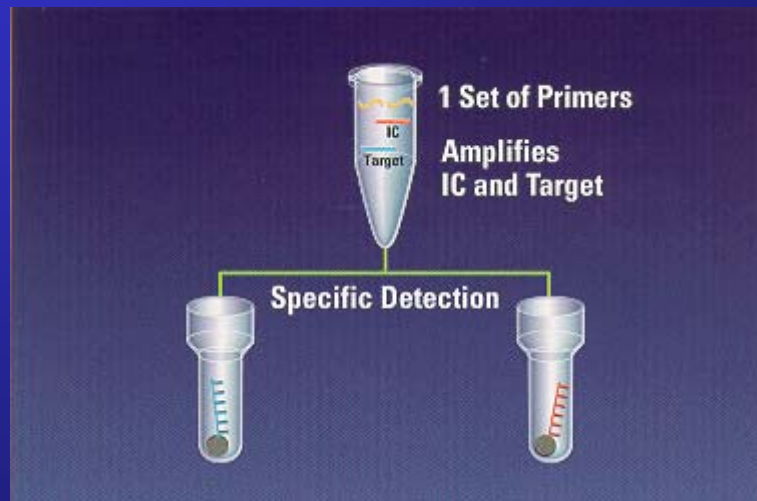
Comparación de la sensibilidad analítica de los test NAT

	95% Límite de Detección (95% CI)		
Ensayo	HIV (IU/mL)	HCV (IU/mL)	HBV (IU/mL)
AmpliScreen* Std preparation	323.4 (284.9-387.3)	41.9 (28.0-111.8)	15.99 (13.78-20.06)
AmpliScreen* Multiprep	78.4 (68.4-94.4)	28.8 (20.5-85.8)	4.41 (3.56-6.13)

* Roche's COBAS AmpliScreen US Package Inserts or Procleix Ultrio CE Package Insert

Controles Internos (Métodos comerciales)

a) **ROCHE Ampliscreen** (Posee un control interno para HCV, HIV y HVB en forma individual)



Control interno de amplificación

- Demuestra amplificación en cada muestra
- Asegura que los resultados negativos son verdaderos negativos, previene la existencia de falsos negativos

Especificidad

Roche Ampliscreen

- [COBAS AmpliScreen™ HCV Test, v2.0](#)

Se testeó el siguiente panel de microorganismos sin observarse reactividad cruzada.

Adenovirus tipo 1	Chlamydia trachomatis	Corsakie virus	HTLV-1	HIV-1subtipo D
Adenovirus tipo 3	CMV	HSV-1	HTLV-2	
Adenovirus tipo 7	Echovirus 1-5	HSV-2	VZV	
Muestras Autoinmunes	EBV	HIV-2	HIV-1subtipo A	
S. epidermitis	HAV	HHV6	HIV-1subtipo B	
Candida Albicans	HBV	HHV7	HIV-1subtipo C	

Detección de tipos/suaptipos virales

Roche Ampliscreen

- **HCV** : 1a, 1b, 2a, 2b,2c, 3a, 3e, 4a, 4c, 4d, 4h, 5a, 6a
- **HIV-1**: Grupo M subtipo A, B, C, D, E, F, G, H, Grupo O y Grupo M
- **HBV** : A, B, C, D, E, F,G

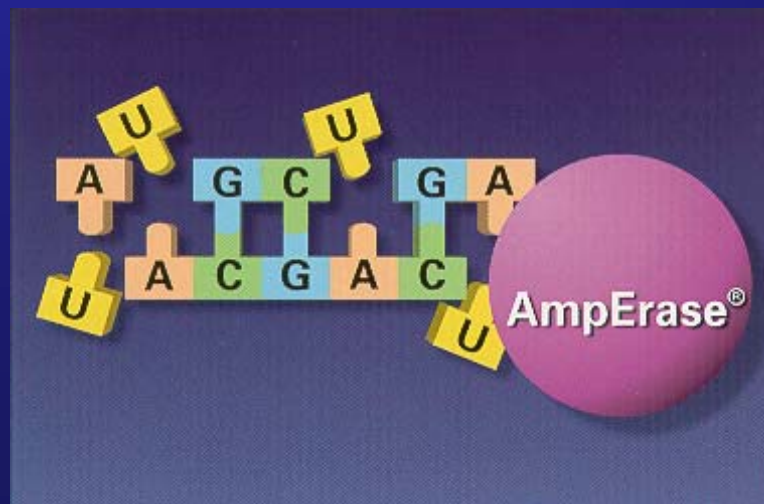
Referencia: monografía de aprobación del producto en la FDA

Control de Contaminacion

Roche Ampliscreen

AmpErase

- Detecta específicamente y destruye DNA amplificado anteriormente (evita contaminación cruzada)
- Protege contra fallas primarias de control de calidad del sistema (*i.e.*, workflow, separación de áreas de trabajo)



Diferencias entre métodos Comerciales y Caseros

Método	Comercial	Métodos Caseros
Sensibilidad	Validado por el Fabricante	Debe determinarse para cada corrida en particular
Especificidad	Validado por el Fabricante	Debe determinarse por el usuario
Detección de variantes/subtipos	Validado por el Fabricante	Debe determinarse por el usuario
Reproducibilidad	Validado por el Fabricante	Debe determinarse por el usuario
Trazabilidad de reactivos	Validado por el Fabricante	Parcial
Control Interno	SI	No
Control de contaminación	SI	No

Tiempos de entrega de los resultados

- Los tiempos de entrega de los resultados tomados desde la entrada de las muestras con serología negativa para los distintos marcadores testeados, dependerá de 2 factores, el **tamaño de pool** y el **método utilizado**

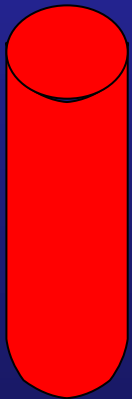
Tamaño del Pool	SDNAT	MPNAT	MPNAT	MPNAT
	1	6	24	96
Cantidad de corridas analíticas necesarias para llegar a resultado individual	1	2	3	4-5

Efecto del tamaño del pool sobre la sensibilidad

Ejemplo

Test con sensibilidad de 30 UI/ml

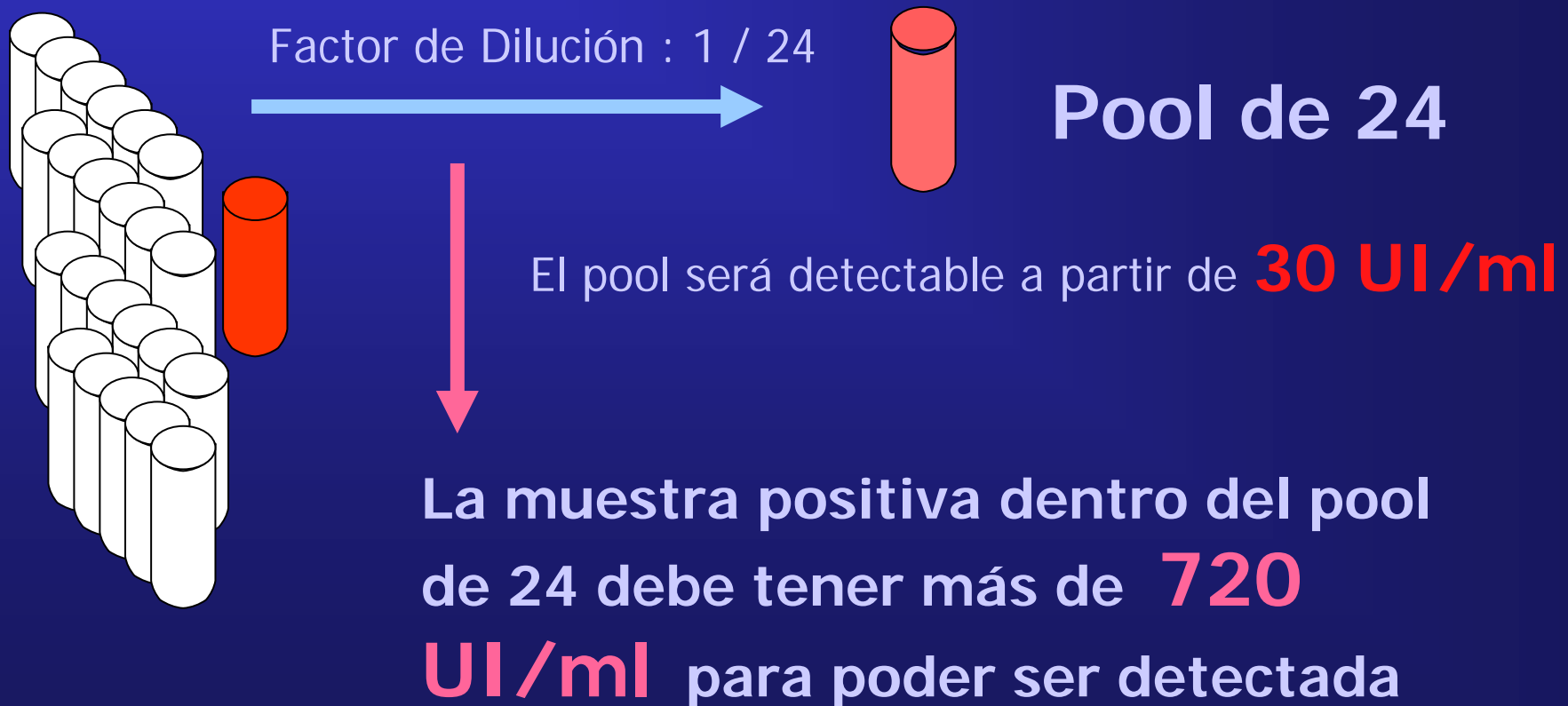
Muestra Directa (SDNAT): Detecta a partir de 30 UI/ml



Sera detectable a partir de 30 UI/ml

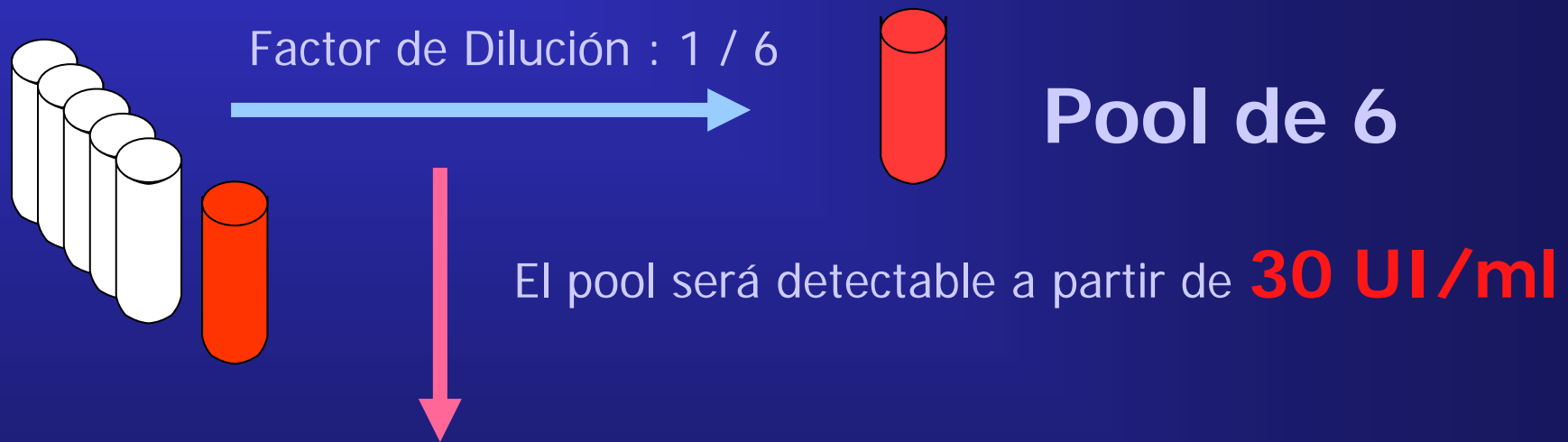
Ampliscreen HCV Pool de 24

Si se supone solo 1 muestra positiva del pool,
la sensibilidad del ensayo varía (factor X 24)



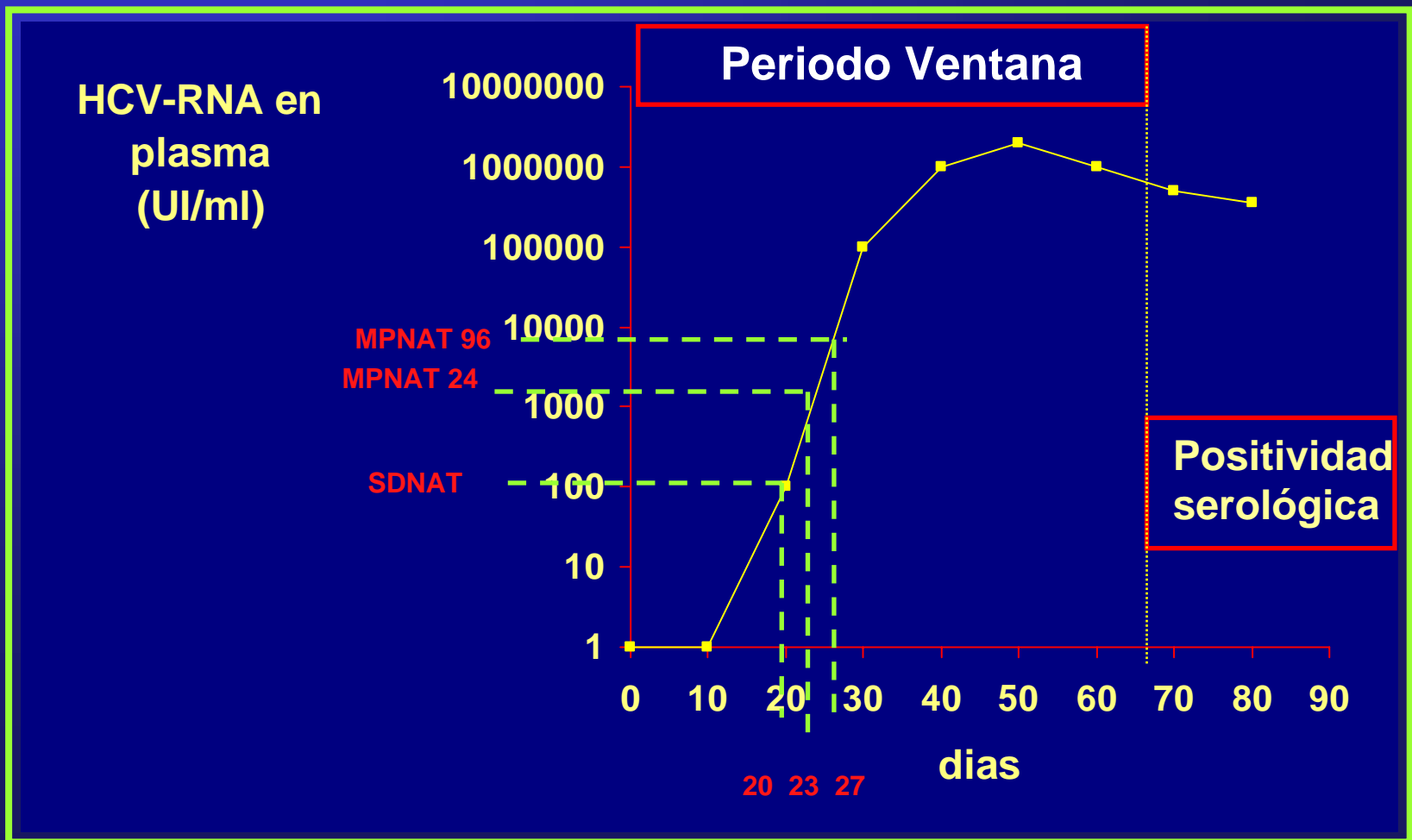
Ampliscreen HCV Pool de 6

Si se supone solo 1 muestra positiva del pool,
la sensibilidad del ensayo varía (factor X 6)



La muestra positiva del pool de 6
debe tener más de **180 UI/ml**
para poder ser detectada

Impacto de la cinética de HCV en la sensibilidad de los pooles



Experiencia CIBIC - Rosario

Abril 2005 – Marzo 2008

Resultados

	Muestras analizadas	Pooles	Corridas realizadas	Pooles negativos	Pooles positivos	Muestras negativas	Muestras positivas
HCV	25184	4224	837	4224	0	25184	0
HIV	25184	4224	837	4224	0	25184	0
HBV	11256	1876	370	1876	0	11256	0

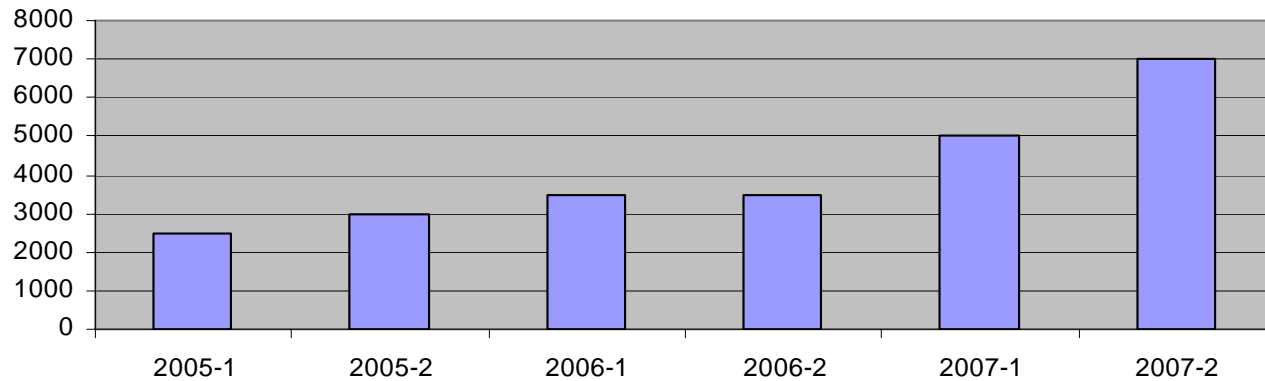
12 Corridas invalidas 1.1 % - Apertura de pooles: 7, 6 HCV, 1 HIV, Todos Negativos

Como se organiza el trabajo

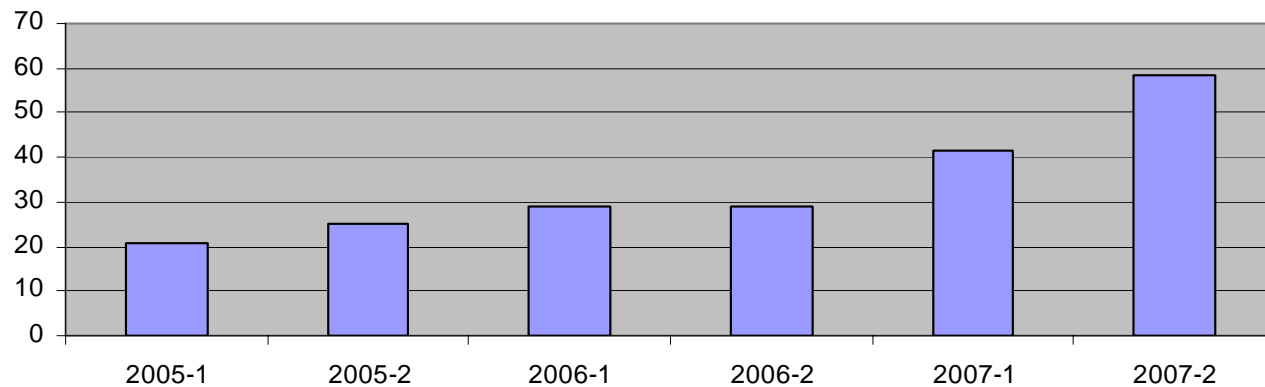
- Las muestras con serología negativa arriban al laboratorio entre las 14 y 15 horas.
- Comienzan su procesamiento a las 15 horas.
- Se finalizan y consolidan los resultados a las 21 horas
- Se informan a la mañana siguiente
- Existe un sistema de procesamiento de urgencia para situaciones de necesidad (Ej: transplantes)
- Los pooles se arman con bolsas de diferentes orígenes de tal forma que de encontrar uno positivo no se bolquean muchas bolsas del mismo lugar

Evolución de Demanda

Donaciones controladas por semestre



Promedio de donaciones diarias controladas



Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Tecnológicos
- Organizativos
- Logísticos
- Políticos (Política de Salud – Marco de Referencia Legal)

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Tecnológicos
 - Implementación de laboratorios con capacidad instalada para realizar testeos de biología molecular
 - Disponibilidad de Recursos Humanos capacitados para la realización de NAT
 - Costos de los test y su implementación para la realidad de las economías de los financiadores de la salud y/o el estado

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Organizativas- Realidad Actual + probable
 - Bancos de Sangre no centralizados
 - Tecnologías desparejas para los métodos de tamizaje clásicos
 - Muchos laboratorios realizando testeos de serología con bajo promedio de test/laboratorios
 - Falta de un marco de Control de Calidad adecuado para garantizar la uniformidad tecnológica de la metodología empleada en el tamizaje clásico.

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Organizativas- Cambios de Paradigmas
 - Es factible la concentración de muestras, desde el punto de vista filosófico?
 - Es factible la concentración del NAT, sin concentración de la serología?
 - Es factible realizar NAT con serología descentralizada si no existe un estándar básico y un programa de Control de Calidad para la misma?

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Organizativas- Cambios de Paradigmas
 - Sin una correcta organización que garantice un número importante de muestras con serología negativa de calidad controlada, es inviable pensar en la implementación del NAT
 - Son necesarias un piso de 60 bolsas/día para poder implementar seriamente un programa de NAT.

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Logísticas – Realidad Argentina Vs Realidad en Países desarrollados
 - Supongamos que resolvimos los aspectos técnicos y los aspectos organizativos, cuales son los potenciales problemas logísticos.
 - Identificación de Muestras – Softwares y sistemas pre-analíticos
 - Transporte de muestras: calidad, tiempo y forma del mismo
 - Aspectos post-analíticos: entrega del resultado en tiempo y forma

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Políticas – Marco de Referencia Legal
 - Sin un correcto marco legal probablemente se aumenten los costos debido a la necesidad de cumplir con dicho marco legal y agregarle el costo del NAT. Ejemplo: Ag P24, Anti-HBc (HBV), HCV Ag.

Los desafíos de la implementación de NAT en Argentina

- Conclusión:
 - La principal barrera a traspasar en la implementación del NAT no es técnica sino filosófica y logística e implica romper con los paradigmas históricos en la organización de los laboratorios de los bancos de sangre.
 - Paralelamente, debe trabajarse en la reformulación del marco legal del tamizaje de sangre para evitar sobrecostos asociados a duplicación de test (Ejemplo: Ag P24 HIV- NAT HIV)