

Cuatro años de experiencia con NAT

Fund. Hemocentro Buenos Aires

Andrea Guichón, Ph.D.

Consultora en Biología Molecular

Junio 2008

Presentación

- 1. Introducción a la metodología NAT**
- 2. Implementación y ensayos preliminares**
- 3. Logística de trabajo en FHBA**
- 4. Resultados con pools de donantes**
- 5. Resultados con pools de donantes**
- 6. Conclusiones y futuro**

Iniciación de NAT

Fundación Hemocentro Buenos Aires

- **Mediados del 2004, primer centro en Cap. Fed.**
- **Motivaciones**
 - mejorar seguridad en transfusiones
 - mayor resguardo legal
- **Elección de metodología NASBA por**
 - accesibilidad económica
 - asesoramiento técnico local disponible
 - formato de trabajo flexible

Etapas de NAT con NASBA

1. Liberación ácidos nucleicos



2. Aislamiento de ARN



3. Amplificación



4. Detección

Módulos de Kits comerciales

Ensayos adaptados para NAT HCV y HIV

bioMérieux



2. Aislamiento
ARN

3. Amplificación

4. Detección

1. Preparación
muestra pool

Esquema NAT en FHBA

SEROLOGÍA NEGATIVA



Etapas de metodología NAT

1. Preparación pooles



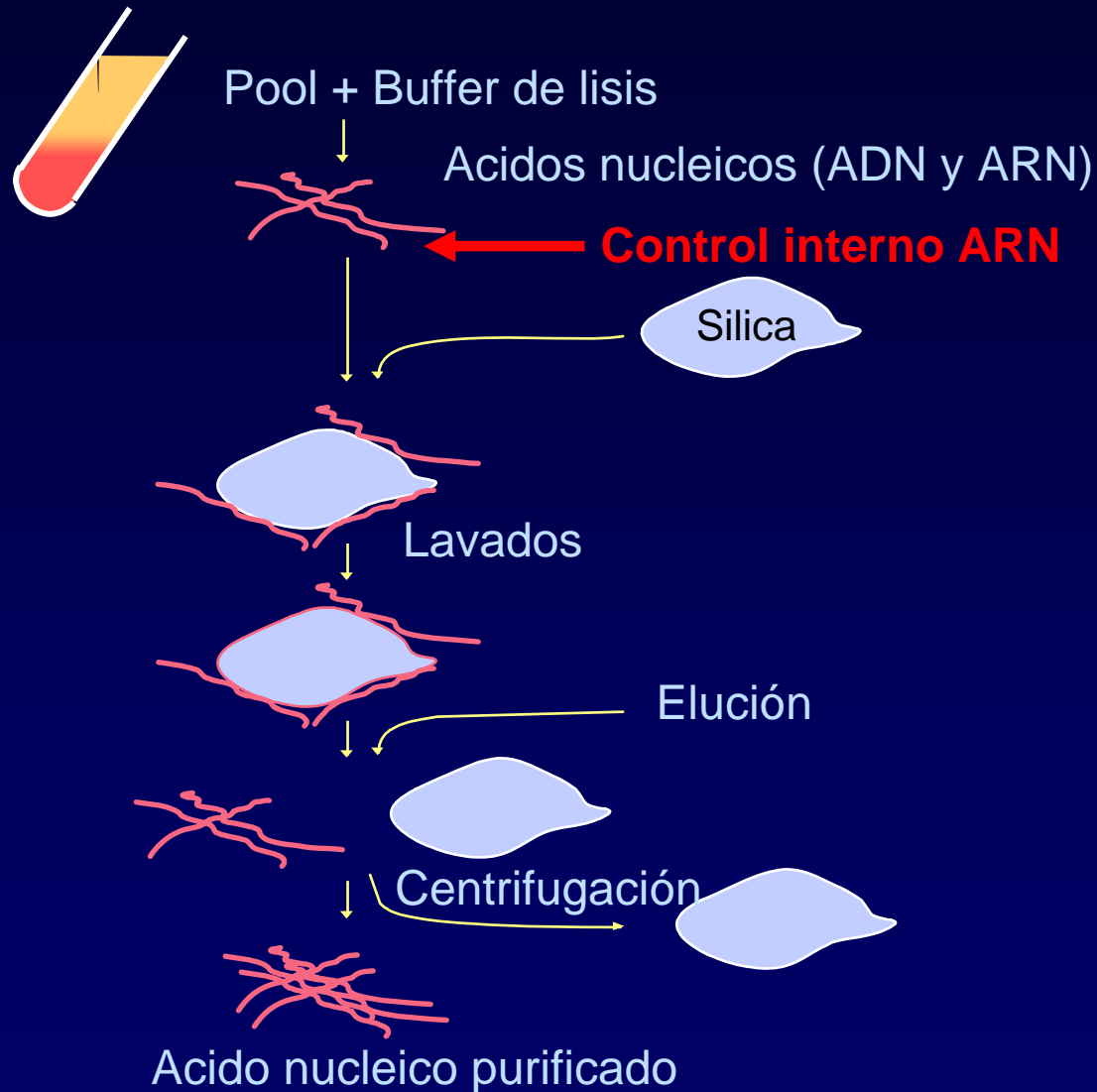
2. Aislamiento ARN
manual Boom

3. Amplificación
NASBA

4. Detección automatizada
ECL



Método de aislamiento Boom



Propiedades de Aislamiento NucliSens

Método de Boom

- Método de extracción genérico para ADN y ARN
- Buffer de lisis buen conservante de pool de plasma
- Óptima eliminación de inhibidores.
- Volumen de muestra flexible: hasta 2 ml pool
- Se puede combinar con otros métodos de amplificación (PCR), ej, Europa, opción automatizada: Extractor + PCR
- Método manual: no requiere equipos especiales y es fácil.

NASBA

Nucleic Acid Sequence Based Amplification





- Isotérmica 41°C (sin termociclador)
- Alta eficiencia para amplificar virus ARN (HCV, HIV)

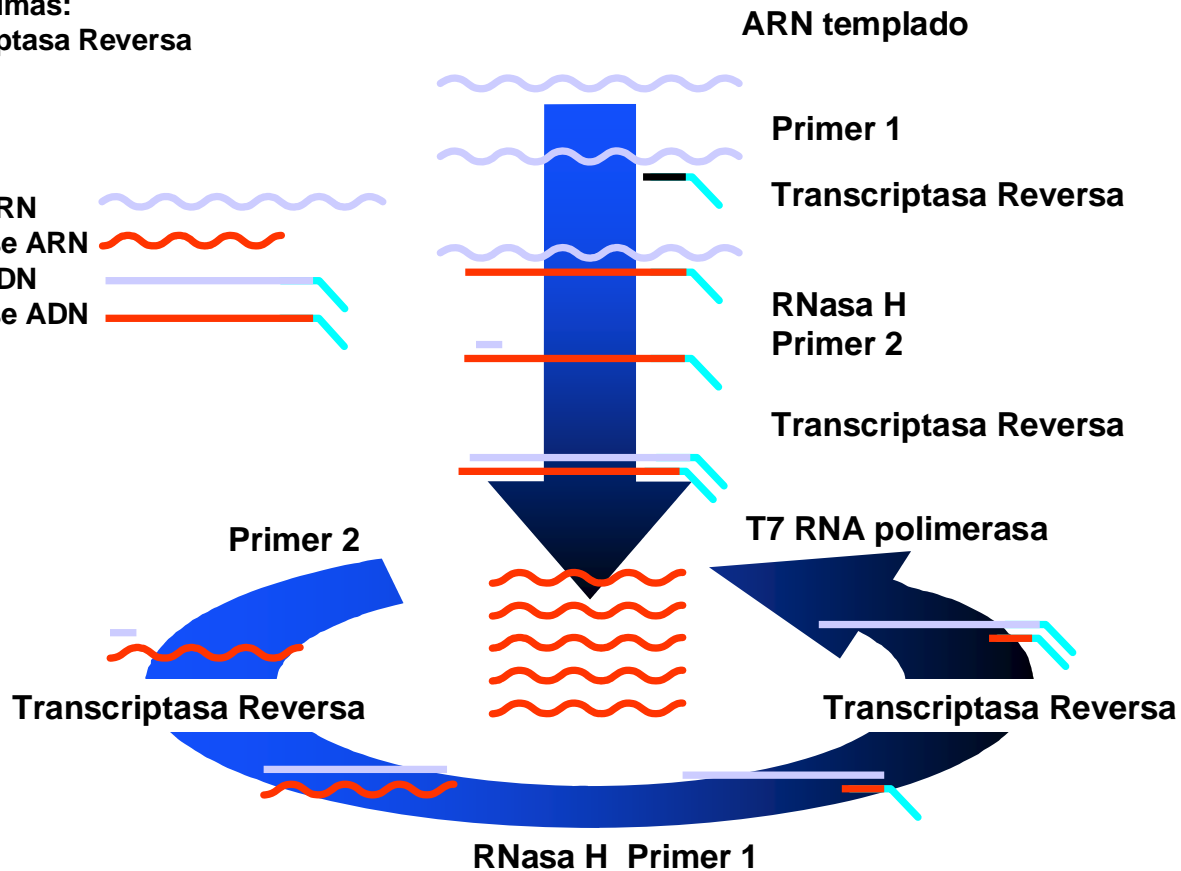
Amplificación por NASBA

Primers específicos para HCV y HIV

Tres enzimas:

- Transcriptasa Reversa
- RNasa H
- RNA pol

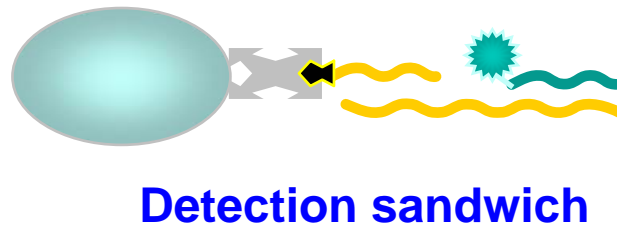
- sense ARN 
- antisense ARN 
- sense ADN 
- antisense ADN 



Detección específica por hibridación y ECL

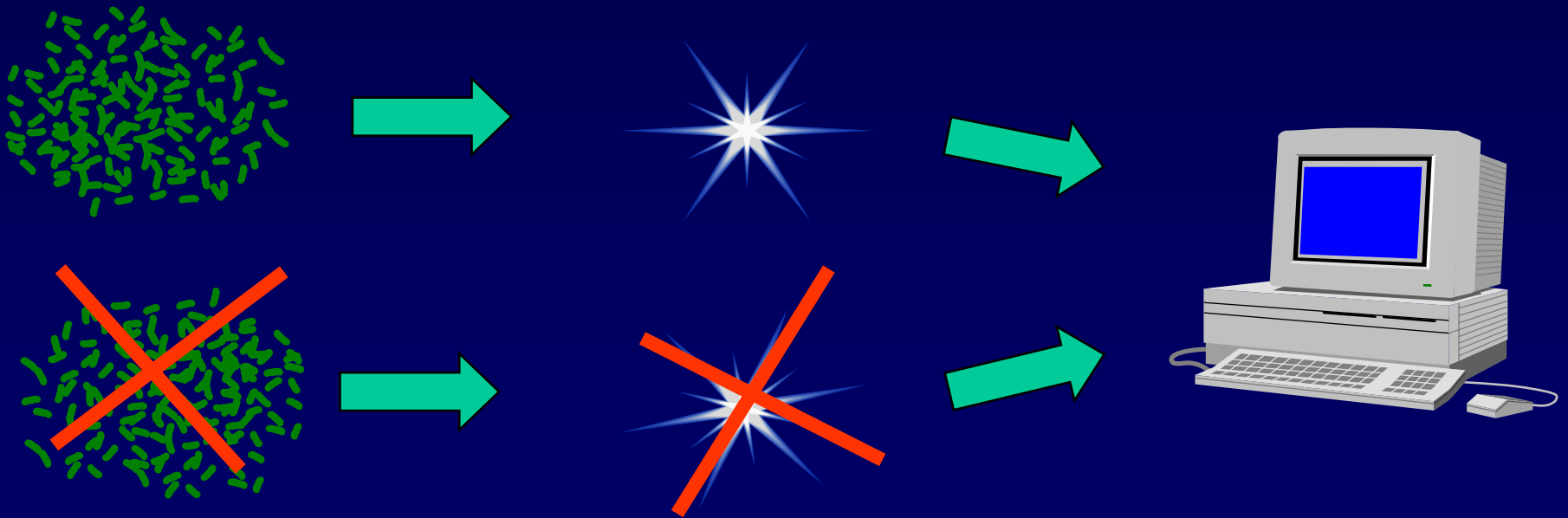


30
min
41°C



Propiedades de Detección ECL

- Análisis e interpretación de datos automatizada.
- Validación de ensayos de acuerdo con controles.
- Almacenamiento de datos no modificables.



Control interno NAT

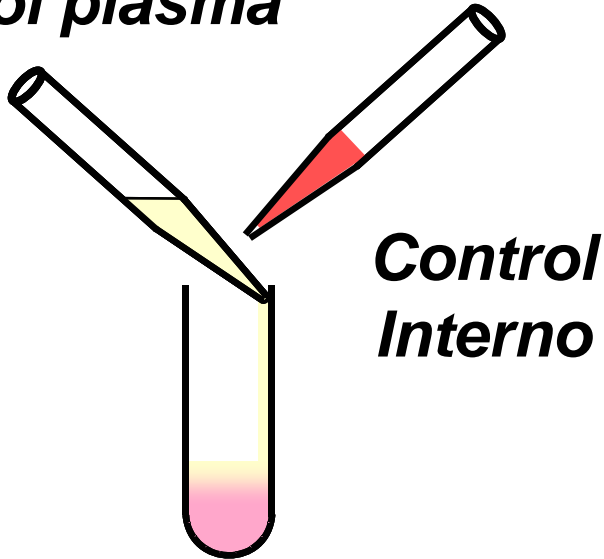
ARN standard para control de procesamiento de cada muestra, incluido en el kit.

Monitoreo completo del proceso

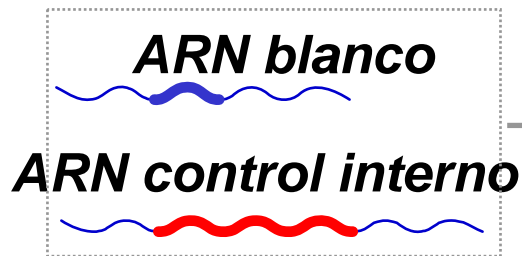
1. Aislamiento
2. Amplificación
3. Detección

Control interno NASBA

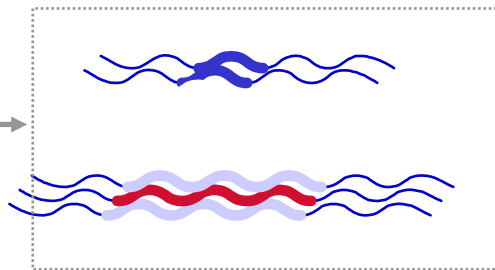
Pool plasma



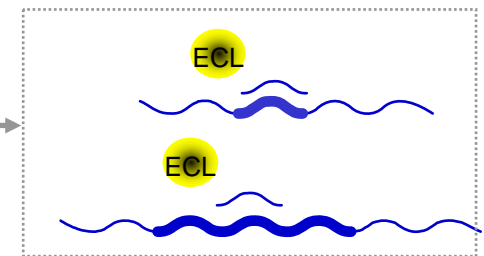
co-Aislamiento



co-Amplificación



2x Detección



Características de ensayo NASBA HIV

Performance determinada por fabricante

- **Sensibilidad = 10-100 copias**
 - Determinada con paneles referencia de HIV genotipos B y E
- **Especificidad en donantes = 99.6%**
 - 225 pooles plasma de 48 por pool
 - 27 pooles de suero de 92 por pool
- **Especificidad analítica = 100%**

Pruebas con panel de muestras de individuos con diferentes enfermedades e infecciones (n=170)

 - Ensayos con y sin contaminación HIV.
 - Sin falsos positivos ni negativos.
- **Detección subtipos**

HIV subtipos de grupo M (A-F y H)

Características de ensayo NASBA HCV

Performance validada en Fund. Hemocentro Bs As y otros centros

*Fund. Hemocentro Bs As, Rev Arg Trans, Dic 2006.
CEMIC, Jour Clin Virol 2004
FUHESA, Congreso Hemoterapia 2003
Hosp. Italiano, Congreso SAV 2002*

- **Sensibilidad = 95 UI**
 - Determinada con estándar calibrado con Estándar Internacional OMS ARN HCV genotipo 1a – Método de Probit
- **Especificidad en donantes = 100%**
 - 100 pooles plasma
- **Especificidad analítica = 100%**

Pruebas con panel de muestras de individuos con diferentes enfermedades e infecciones (n=29) y con plasma/suero normal (n=20)

 - Ensayos con y sin contaminación HCV.
 - Sin falsos positivos ni negativos.
- **Detección genotipos:**

HCV genotipos 1, 2, 3 y 4

Implementación en Banco de Sangre

NAT ES MÉTODO COMPLETAMENTE NUEVO PARA EL BANCO DE SANGRE

- 1. Puesta en marcha de NAT en el laboratorio**
- 2. Incorporación de NAT en logística de banco de sangre**

Implementación en Banco de Sangre

1. NAT en laboratorio

- **Preparación del laboratorio**
Áreas separadas para NAT
- **Instrumentos y descartables para NAT**
- **Almacenamiento reactivos NAT y controles de calidad.**
- **Entrenamiento de personal para NAT.**
- **Ensayos preliminares HCV y HIV**

Implementación en Banco de Sangre

2. Incorporación de NAT en el banco

- **Toma de muestra separada para NAT**
- **Logística de preparación de pooles**
- **Coordinación de tiempos de trabajo**
 - Serología
 - Bloqueo de unidades en evaluación NAT
- **Adaptación del software e informes de laboratorio.**
- **Redacción de procedimientos operativos**

Diseño de ensayos preliminares

Lineamientos de EMEA y Paul Ehrlich Institute para NAT:

- Detección de 100 UI/ml HCV y HIV
- Detección de una muestra individual con 5.000 UI/ml HCV y 10.000 UI/ml HIV dentro de un pool.

Objetivo de pruebas locales NASBA:

- Verificar detección HCV y HIV en 100 UI/ml utilizando formato de trabajo banco de sangre
- Robustez de ensayo
- Probar logística de trabajo, preparación pooles y apertura de pooles positivos

Preparación de pooles en Hemocentro Bs As

- **Tamaño de pool: 48**
 - Volumen de muestras diarias
 - Logística de apertura de pool positivo
 - Costos de reactivos
- **Pooles se preparan diariamente**
 - Luego de resultados de serología de donantes diarios. Se excluyen los seropositivos.
 - Se conserva pool en buffer de lisis a 4⁰C hasta procesar.

Preparación de pooles en Hemocentro Bs As

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Minipool | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|----------|---|
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | A |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | B |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | C |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | D |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | E |
| ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | F |

Gradilla pipeteador Hamilton

$$8 \times 3 = 24$$

$$24 \times 2 = 48$$

$$8 \times 2 = 16$$

Pool secundario

ABC ● ● ●

Pool primario

ABC ● ● ●

Pool secundario

DEF ● ● ●

DEF ● ● ●

Tamaño pooles:

$$4 \times 8 = 32$$

$$5 \times 8 = 40$$

$$6 \times 8 = 48$$

Ensayos preliminares NAT

"Validación local"

1. Pruebas de sensibilidad y robustez

- Muestras control cuantificadas:
 1. HCV genotipo 1a
 2. HCV genotipo 2a
 3. HIV
- Estándar secundario Acrometrix HCV1a

2. Ensayos de resolución de pools positivos

- Preparación de pool incluyendo una muestra positiva
- Apertura y resolución del pool positivo hasta identificación de muestra individual positiva, a ciegas
- Prueba de riesgo de contaminación.
- Evaluación de tiempos de trabajo: simulación rutina

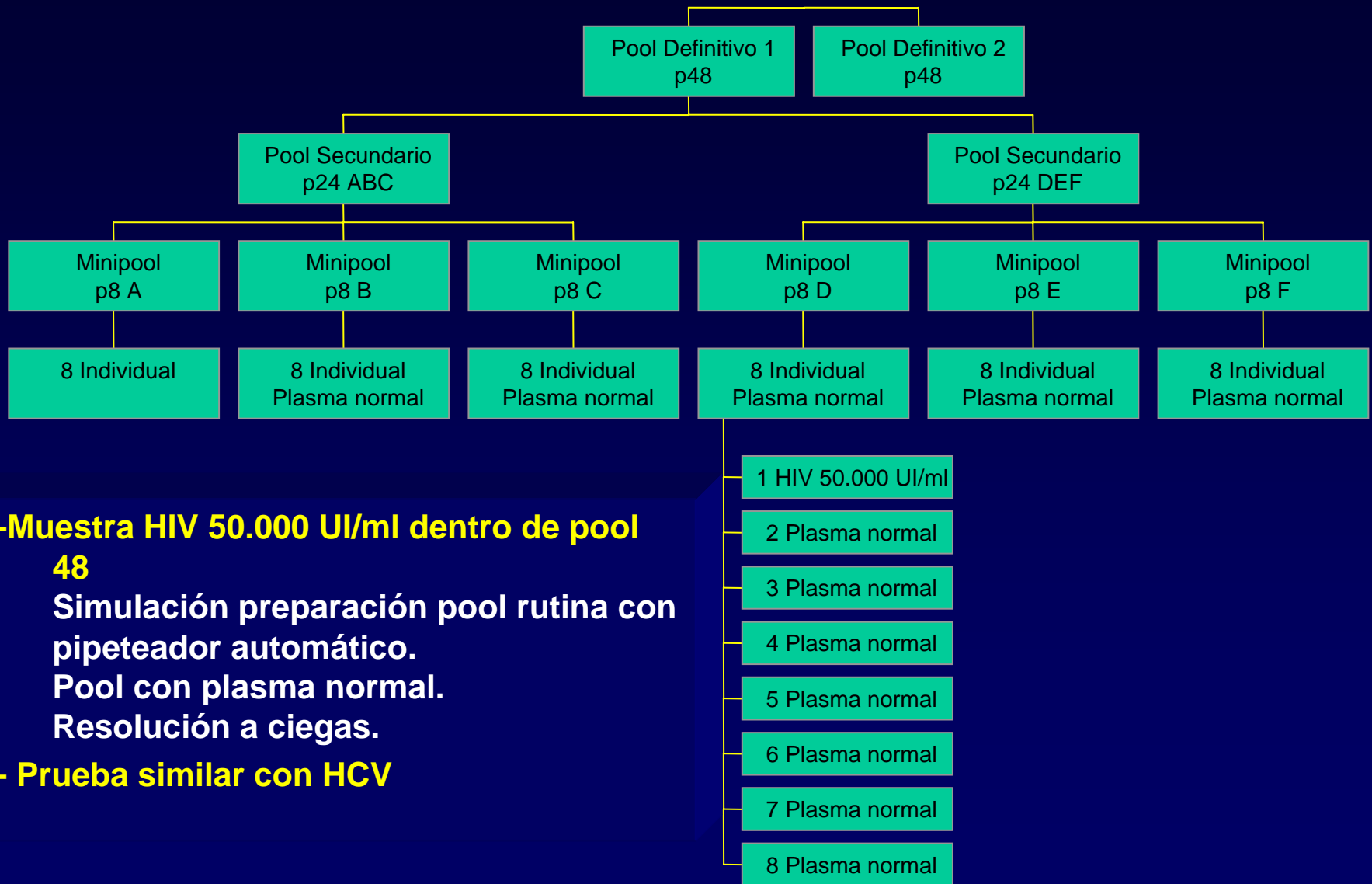
Detección de muestras control HCV y HIV

| Muestra control | Dilución | Concentración | Resultado |
|----------------------------|-----------|------------------|---------------------|
| | pool | UI/ml | |
| | | | HCV |
| Control A | 8 | 600 UI/ml | Positivo |
| HCV 1a | 24 | 200 UI/ml | Positivo |
| dilución 5000 UI/ml | 48 | 100 UI/ml | Positivo |
| | | | |
| | | | HIV |
| Control B | 8 | 600 UI/ml | Positivo |
| HIV | 24 | 200 UI/ml | Positivo |
| dilución 5000 UI/ml | 48 | 100 UI/ml | Positivo |
| | | | |
| | | | HCV + HIV |
| Control C | | | |
| HCV 1a + HIV | 48 | 100 UI/ml | Positivo x 2 |
| dilución 5000 UI/ml | | | |

DetECCIÓN DE EST. SECUNDARIO HCV1a Y CONTROL HCV GENOTIPO 2a

| Concentración | Repeticiones distintos días | Resultado |
|----------------|--------------------------------|-----------|
| Estándar HCV1a | | |
| 100 UI/ml | 15 | + (15/15) |
| Control HCV2a | | |
| 100 UI/ml | 6 | + (6/6) |
| | | |

Preparación pool ensayo



Ensayos preliminares NAT

Resumen de resultados

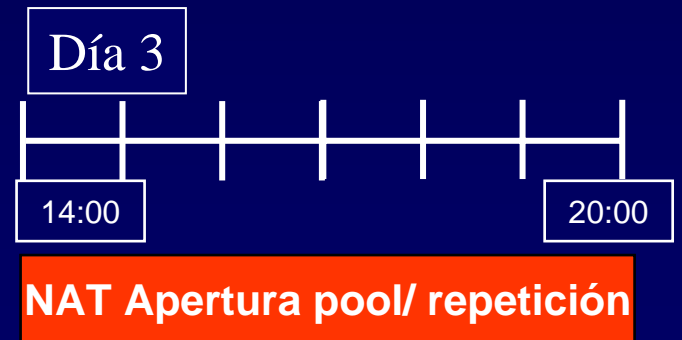
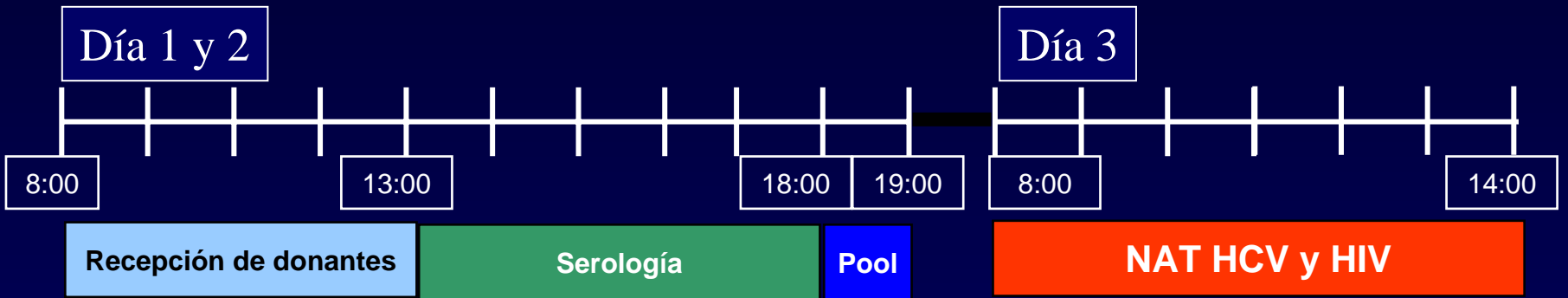
1. Resultados satisfactorios en pruebas de sensibilidad y robustez

NASBA HIV y HCV detecta de manera consistente 100 UI/ml

2. Resultados de resolución de pooles positivos Simulación trabajo de rutina

- Tiempo adecuado en trabajo preparación de pool
- Identificación correcta de muestras positivas en cada etapa
- Tiempo adecuado en obtención de resultados
- Sin contaminaciones

Rutina de trabajo NAT



NAT Negativo DESBLOQUEA

Controles de calidad y criterio de validación NAT de rutina

CONTROL INTERNO de POOL

Monitoreo de inhibidores de pool y procesamiento técnico

- Resultado válido OK
- Resultado inválido REPETIR POOL

CONTROL EXTERNO de CORRIDA

Monitoreo de sensibilidad y procesamiento técnico

- Resultado positivo OK
- Resultado negativo REPETIR CORRIDA

Resultados NAT HCV y HIV

jun 2004- abr 2008

No se obtuvieron resultados NAT positivos con serología negativa.

| NAT | donantes | pooles | % pooles inválidos | % pooles falsos + |
|-----|----------|--------|--------------------|-------------------|
| HCV | 62.752 | 1.303 | 1,4 | 3,1 → 1,1 |
| HIV | 62.752 | 1.303 | 0,5 | 0,4 |

*Datos: Bioq Ma Elina Acevedo
Fund. Hemocentro Bs As, mayo 2008*

Interpretación de resultados

Posibles causas

Pool falso positivo

Interpretación:

- contaminación de laboratorio
- inespecificidad de ensayo

DESCARTE DESECHOS CONTAMINADOS
PROCESAMIENTO CONTROLES POSITIVOS
CAMBIO PERSONAL LIMPIEZA

Pool inválido por Control Interno

Interpretación:

- CI bajo- error técnico o muestra con inhibición
- CI alto- fuera de rango en el software

CAMBIO DE OPERADOR SECUNDARIO
CAMBIO LOTES DE REACTIVOS

Corrida inválida por Control Externo

Interpretación:

- error técnico
- decaimiento del ARN control

CAMBIO DE OPERADOR SECUNDARIO
CORTES ELECT. FREEZER CON CONTROLES

Inconvenientes

**Pooles con resultados falsos positivos e inválidos,
causaron**

BLOQUEO de unidades

RETRASO en liberación de hemocomponentes

Medidas adoptadas

Minimizar contaminaciones

- Limpieza estricta para decontaminar luego de cada corrida
- Respeto a circulación en áreas, restringido en NAT
- Respeto al uso de materiales exclusivos para NAT y uso de batas en cada área

Otras

- Entrenamiento personalizado a operadores de NAT, aprox. dos semanas con supervisión
- Cuidado en preparación y almacenamiento de controles de corrida, ej. sin congelar/descongelar

Conclusiones

- 1. Ensayos preliminares y controles demostraron sensibilidad esperada, NASBA HCV y HIV 100 UI/ml**
- 2. Pruebas de apertura de pool lograron buena resolución de resultados**
- 3. Implementación e incorporación de NAT en el Hemocentro Bs As fue satisfactoria**
- 4. NAT requirió dedicación intensiva en primeros meses**

Transición a futuro en FHBA

Actualmente tenemos posibilidad de acceso a otras metodologías:

Cambio al sistema de Chiron

- Aprobado para NAT banco de sangre con experiencia de uso internacional
- Tamizaje NAT triple HCV, HIV y HBV
- Mejora en sensibilidad y especificidad
- Testeo diario sin bloqueo significativo de unidades de pool



Gracias