IMPLEMENTACIÓN DE NAT EN BANCOS DE SANGRE. 10 AÑOS...

Bioq. María Elina Acevedo
Biología Molecular
Fundación Hemocentro Buenos Aires

Fundación Hemocentro Buenos Aires

OBJETIVO

DETECTAR Y DESCARTAR PRECOZMENTE UNIDADES DE SANGRE DE DONANTES CON VIREMIA PARA HIV, HBV Y HCV, CON PRUEBAS SEROLÓGICAS NO REACTIVAS.

Tamizaje de infecciones transmisibles por transfusión en Argentina

LEY 22990- MSRES 797- ANEXO 1 y 2

- HVB: Enzimoinmunoensayos HBsAg y anti-HBc total
- HCV :Enzimoinmunoensayo anti- HCV + HCV core Ag o NAT
- HIV1/2 : Enzimoinmunoensayo ag-p24 y anti-HIV1/2
- HTLV I/II: Enzimoinmunoensayo anti-HTLV I/II
- Chagas : 2 ELISA de alta sensibilidad y especificidad. (1 recombinante y 1 lisado de parásito) anti- *Tripanosoma cruzi*
- Sífilis: Test de VDRL o Pruebas treponémicas
- Brucelosis: anti-*Brucella abortus*

Fundación Hemocentro Buenos Aires

TAMIZAJE DE INFECCIONES TRANSMISIBLES POR TRANSFUSIÓN

Métodos indirectos: detección en la sangre (suero o plasma) del donante de la presencia de una **respuesta inmune** contra un patógeno dado

- Diagnóstico serológico mediante diferentes técnicas de laboratorio
- Ej.: análisis en búsqueda de anticuerpos específicos contra HIV en el suero del donante (EIA anti-HIV 1/2)

Métodos directos: detección directa de la presencia del patógeno (genoma o antígenos) en la sangre del donante

- Ej.: EIA para detectar p24 HIV, HBsAg o HCV ag
- Técnicas de biología molecular: buscan el DNA o RNA viral

Fundación Hemocentro Buenos Aires

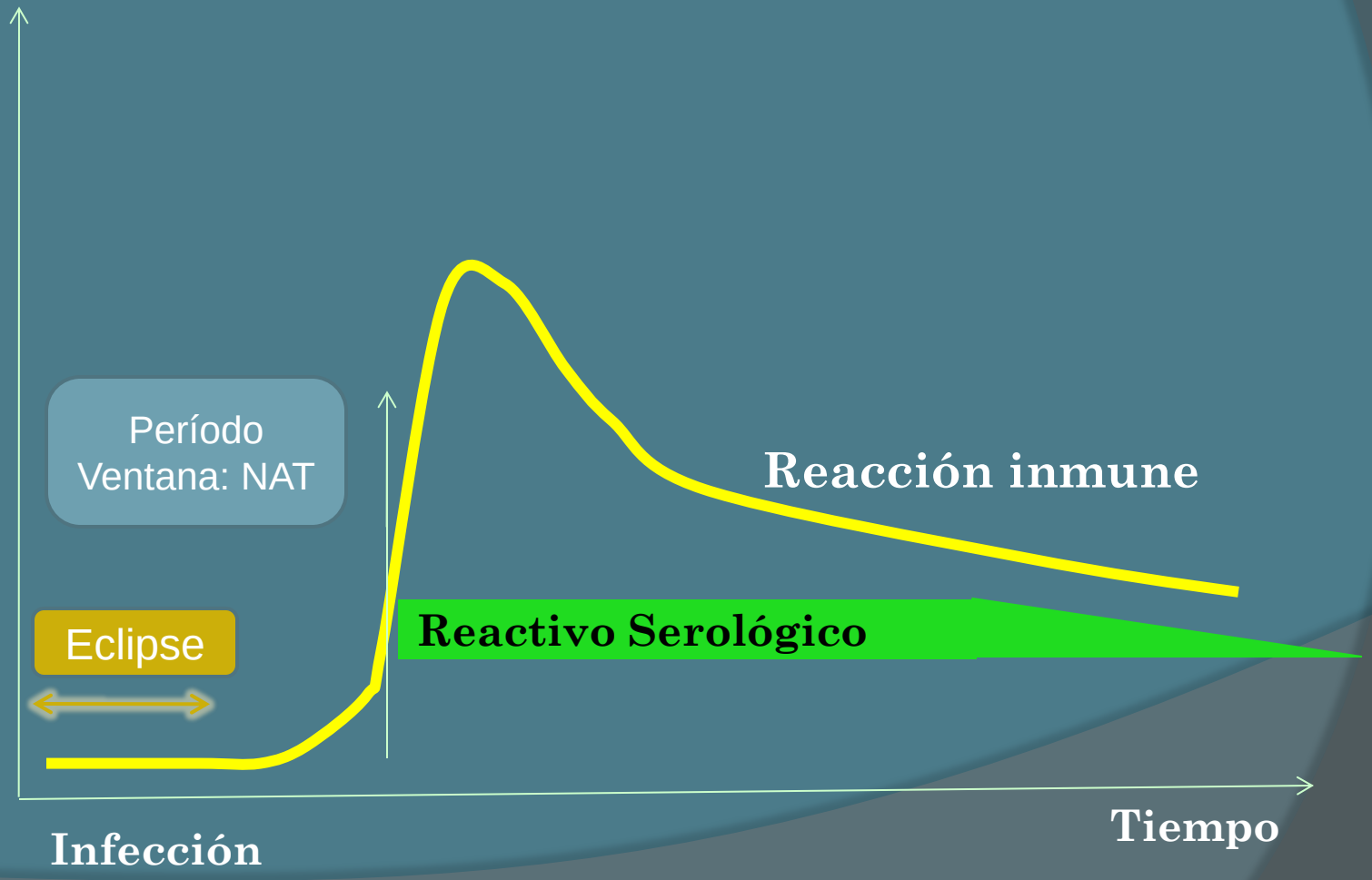
Factores de riesgo en la transmisión de infecciones por transfusión

- Errores humanos o de laboratorio
  - Problemas en los sistemas de análisis/equipos
  - Insuficiencias en la calidad de los análisis
  - Entrenamiento deficitario
- Seroconversiones atípicas
- Variantes o genotipos del patógeno no detectadas
- Cambios epidemiológicos
- **Período de "ventana" serológico**

Fundación Hemocentro Buenos Aires

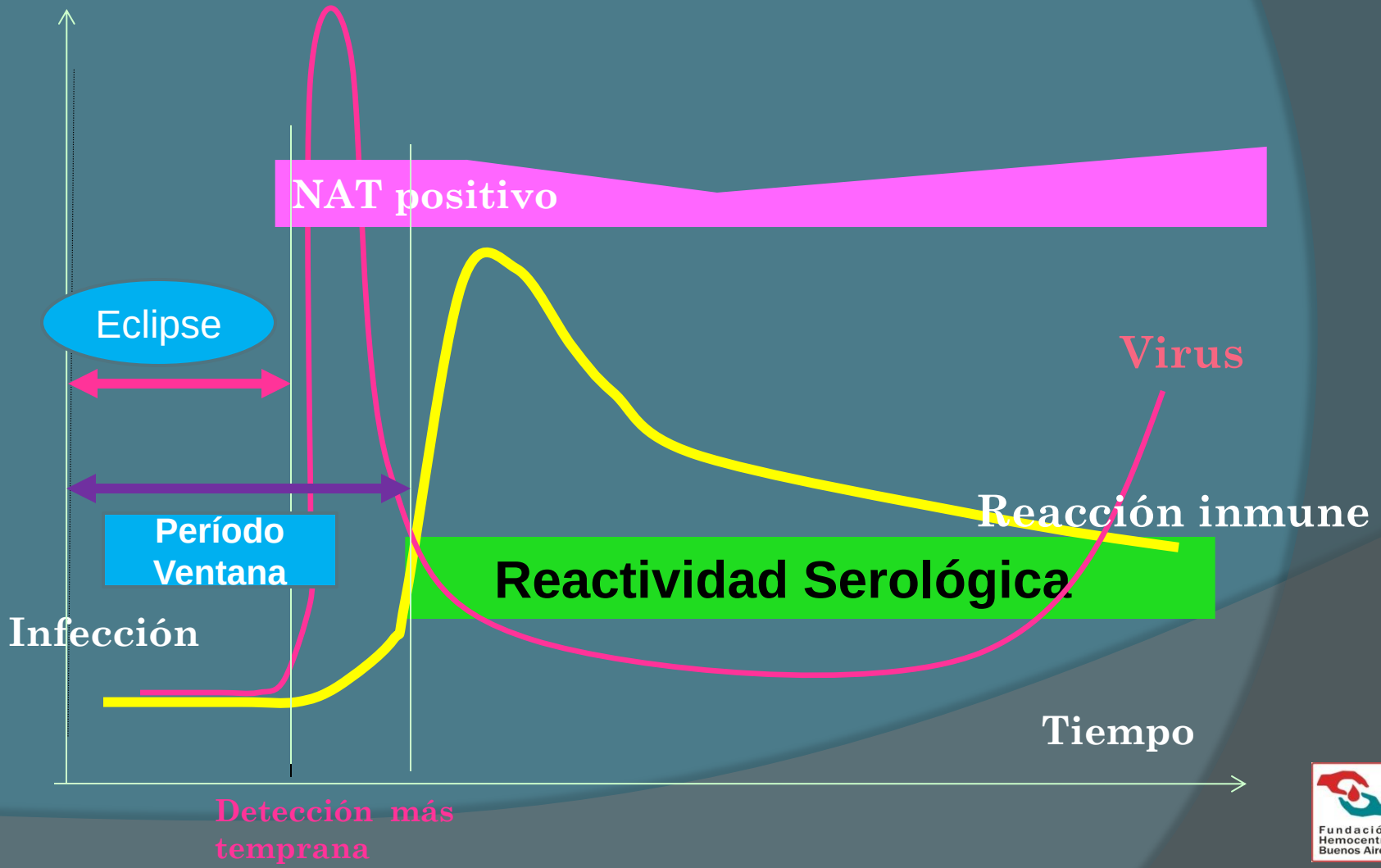
Período Ventana

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



Fundación Hemocentro Buenos Aires

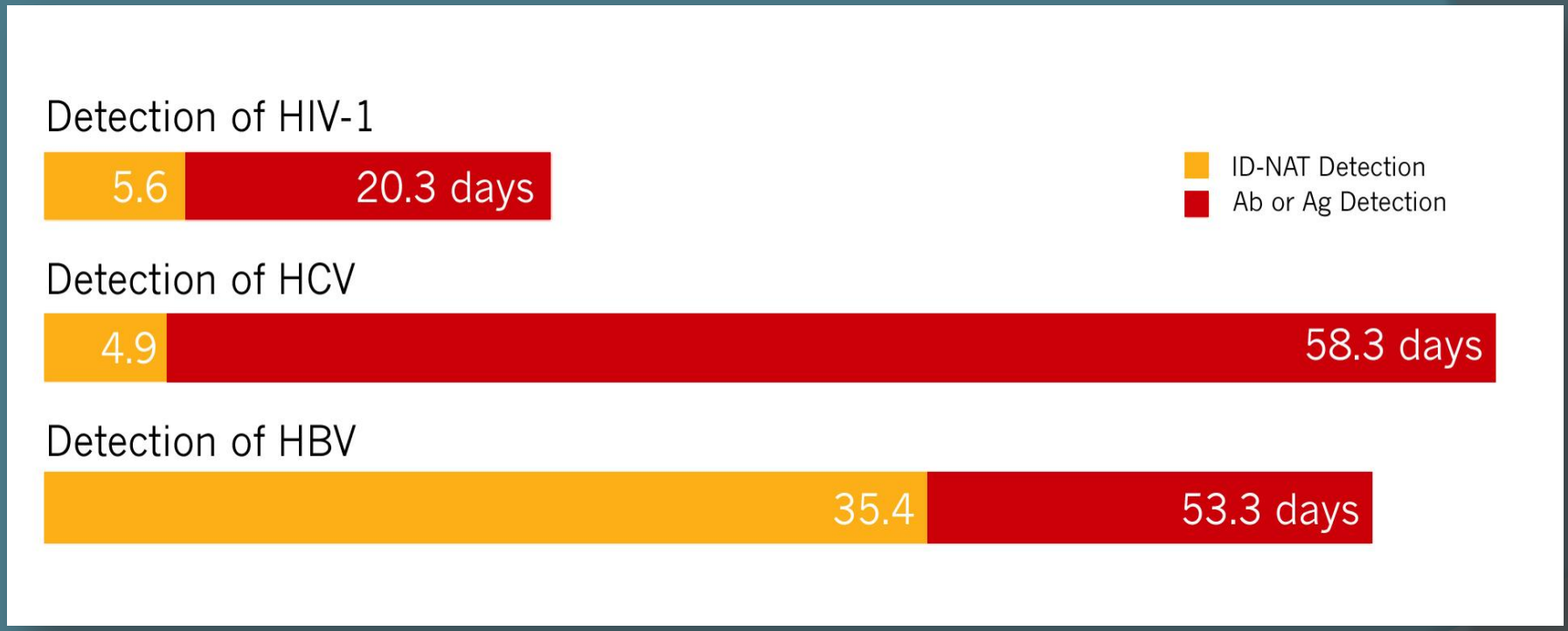
OBJETIVO DE NAT O DGV:
DISMINUCIÓN DEL PERÍODO DE VENTANA



Fundación Hemocentro Buenos Aires

Período Ventana

Model Testing Data



Fuente: Busch et al. Transfusion.2005;45(2):254-264.
Kleinman and Busch. Transfusion. 2006;36:S23-S29

Fundación Hemocentro Buenos Aires

TIEMPO DE DUPLICACIÓN CV

HBV	HCV	HIV
2,6 - 2,8 d	15 – 17 hs	20,5 – 22 hs

Bajas cc de HBV DNA en período de ventana ➡ pooles pequeños o ID test.

Tabor and Epstein- Transfusion –Vol 42, sept 2002

VENTAJAS NAT

VIRUS	Pruebas serológicas	NAT MP (Minipool)	NAT ID (Individual)
VIH (incluye p24)	16 días	10 días	7 días
VHC	70 días	9 días	7 días
VHB	59 días	49 días	38 días

- ✓Acortamiento del período de ventana serológico
- ✓Disminución del riesgo residual

Fundación Hemocentro Buenos Aires

RIESGO RESIDUAL

- Es la probabilidad de que una unidad sea infecciosa y sea transfundida en el período de ventana, antes de la seroconversión.

- Está directamenete relacionado con la incidencia de la infección y la longitud del período de ventana.

Schreiber et al. NEJM, vol 334; 1684-1690 .Jun 1996

Fundación Hemocentro Buenos Aires

RIESGO RESIDUAL ASOCIADO A LA LONGITUD DEL PERÍODO DE VENTANA

	LONG. DE PERÍODO DE VENTANA (días)	RIESGO RESIDUAL (por millón de donaciones)
HIV	22 (6-38)	2.03
HCV	82 (54-192)	9.70
HBV	59 (37-87)	6.65

Schreiber et al. NEJM, vol 334; 1684-1690 .Jun 1996

Fundación Hemocentro Buenos Aires

TÉCNICAS BASADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

- **Involucran tres etapas:**

1. Extracción o captura del genoma viral
2. Amplificación
3. Detección

Ejemplos:

- **PCR**(*Polymerase Chain Reaction*)
- **q-PCR** (*Real Time PCR*)
- **NASBA** (*Nucleic Acid Based on Amplification*)
- **TMA** (*Transcriptional Mediated Amplification)*

Fundación Hemocentro Buenos Aires

COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LOS TEST NAT

	95% Límite de Detección (95% CI)		
Ensayo	**HIV (Cop/ml)**	**HCV (IU/ml)**	**HBV (IU/ml)**
Procleix TMA*	20.72 (17.15 - 23.16)	2.78 (2.44 - 3.37)	7.46 (6.43 - 8.97)
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)
Cobas TaqScreen MPX Test - S201	49 (42.4 - 58.1)	11 (7.0 - 21.7)	3.8 (3.3 - 4.4)
Cobas TaqScreen MPX Test - S201 V2.0	50.3 (43.3-59.9)	6.8 (5.8-8.3)	2.3 (2.0-2.8)

* Roche's COBAS AmpliScreen , TaqScreen MPX test S201 and MPX v2.0 US Package Inserts or Procleix Ultrio CE Package Insert

Fundación Hemocentro Buenos Aires

DISEÑO, ACONDICIONAMIENTO E INFRAESTRUCTURA DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Metas principales para la instalación:

- Proporcionar el espacio suficiente para el flujo de trabajo y mantenimiento de equipos
- Evitar la contaminación
- Mantener la correcta temperatura , humedad y presión del ambiente

Fundación Hemocentro Buenos Aires

ÁREAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

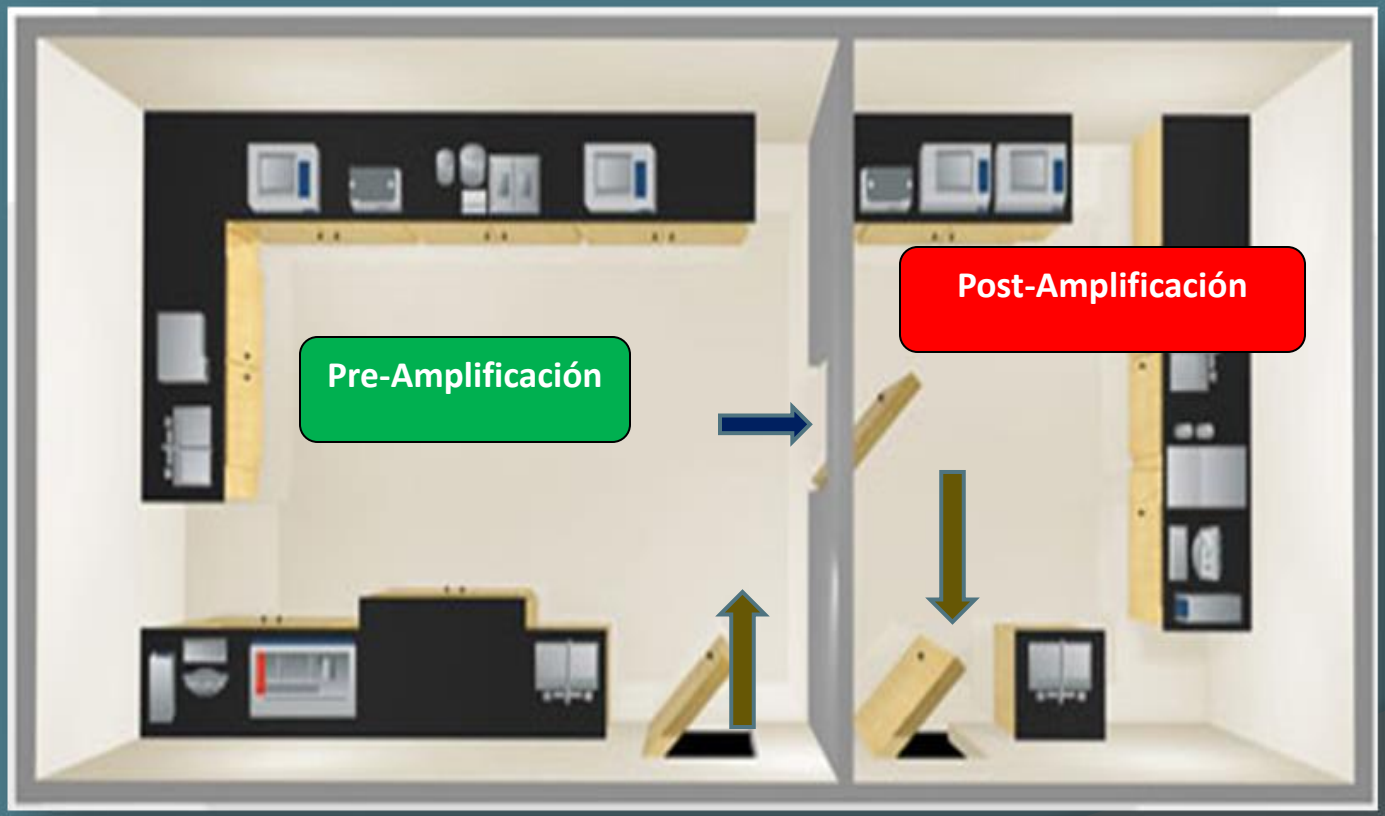
- Área de preparación de reactivos y muestras
- Área pre-amplificación
- Área post-amplificación y detección

Se definen las diversas áreas mediante barreras físicas o protocolo de barreras entre un área de trabajo y otra.

Objetivo: evitar la contaminación entre áreas de trabajo diferentes

Fundación Hemocentro Buenos Aires

ÁREAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



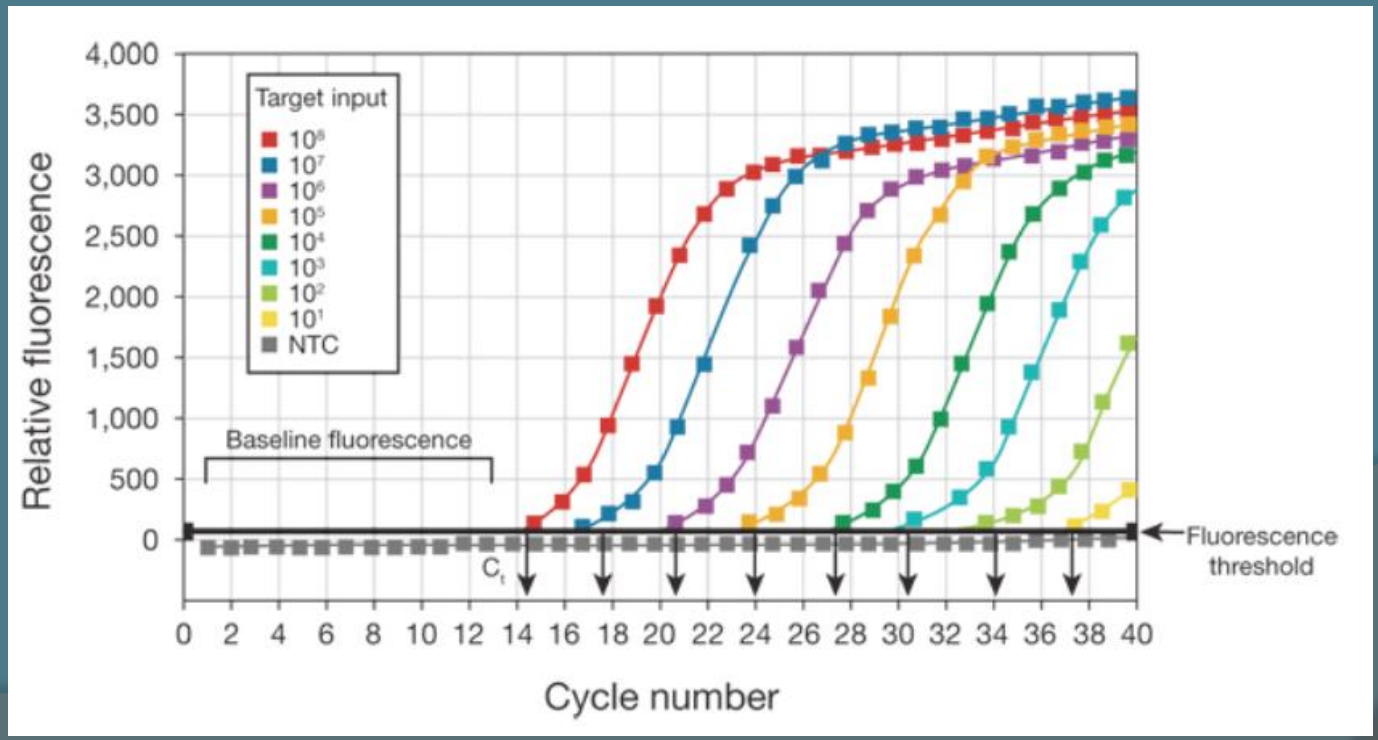
Fundación Hemocentro Buenos Aires

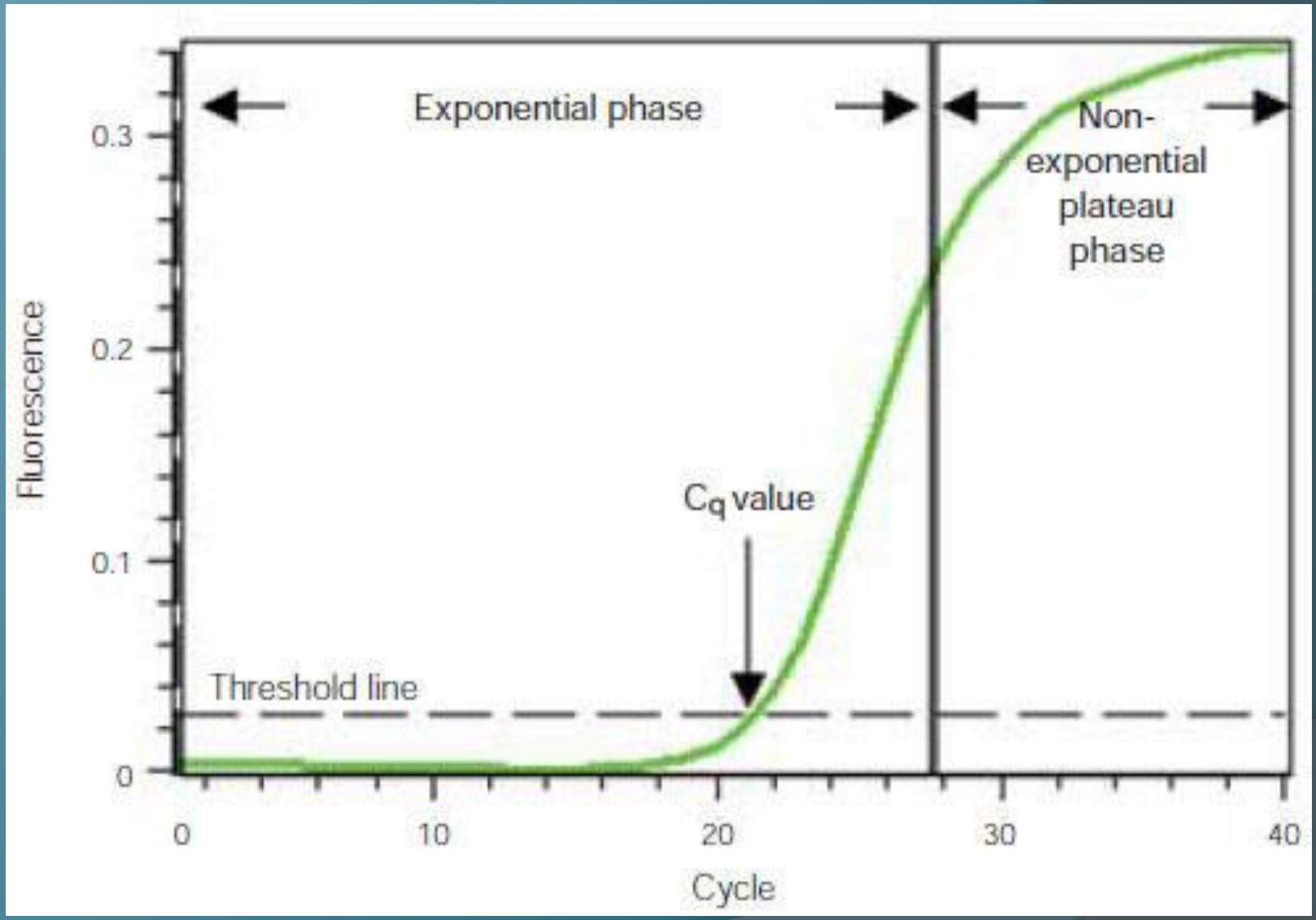
Cobas TaqScreen MPX v2.0 en cobas TaqMan s201

MICROLAB STAR IVD
HAMILTON

REAL TIME PCR - qPCR

- Mide fluorescencia en cada ciclo
- Aumento en F es directamente proporcional al nº amplicones generados en fase exponencial




Exponential phase
Non-exponential plateau phase
C_q value
Threshold line
Fluorescence
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
Cycle

EXPERIENCIA EN FHBA

Fundación Hemocentro Buenos Aires

NASBA – NucliSens Basic kit y Nuclisens HIV QL y HIV QT BioMerièux

- **NAT HCV/ HIV** desde Junio de 2004 hasta octubre de 2008.
- Método: NASBA (BioMeriéux)
- Completamente manual.
- Muestra: Pooles de plasma de 48 dtes.
- Serología ➡ NAT

Fundación Hemocentro Buenos Aires

NOVARTIS

- **NAT HIV/HCV/HBV** desde octubre de 2008 hasta noviembre 2012.
- Método: Procleix Ultrio (Novartis)
- Semiautomatizado.
- Muestra; Single test, pool 4 y pool 8.
- NAT y serología en paralelo

Fundación Hemocentro Buenos Aires

ROCHE

NAT HIV 1-2 / HCV/ HBV

- Desde Noviembre de 2012 hasta la fecha.
- Método: qPCR
- Kit: cobas TaqScreen MPX test y cobas TaqScreen MPX v2.0 test en cobas s201.
- Totalmente automatizado
- Muestra: single test – pool 6
- Multi dye (sin discriminatorio)
- NAT y serologia en paralelo

Fundación Hemocentro Buenos Aires

AMPLILINK 3.3 Report: Sample Result Detail

Order

Order Number:	Ord-10092710
Order Date/Time:	04/04/2014 11:14:08
Ordered by:	LIS
Sample ID:	10092710
Diluted:	No

Patient

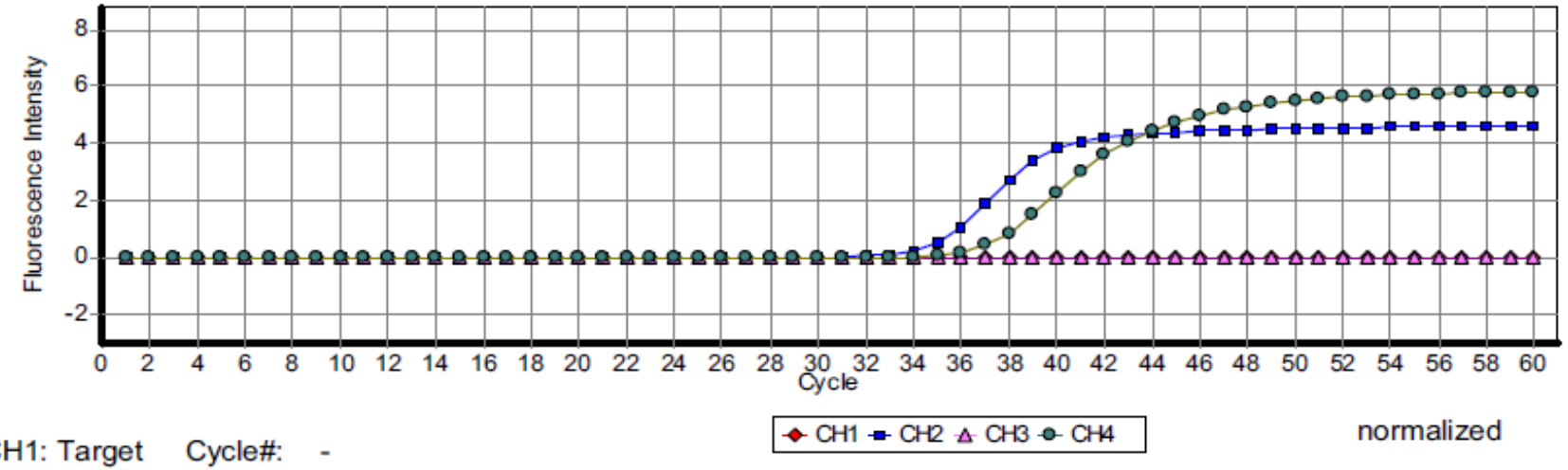
Patient Name:	
Date of Birth:	
Sex:	
PatientCom1:	
PatientCom2:	

Test	Result	Flag Remark	Timestamp
MPX2	HIV-NR,HBV-R,HCV-NR		04/04/2014 16:10:23

Workflow

Process Steps	Name	System ID	Position	Timestamp	Clip#
Primary Pipetting	MPX2	Manual	n/a	n/a	n/a
AmpliPrep Preparation	MPX2	394622	0007 - 07	04/04/2014 12:34:09	$SB0F48C69
TaqMan Amplification	MPX2	392720	TCB 007 - 16	04/04/2014 16:10:10	$SB0F48C69
TaqMan Detection	MPX2	392720	0007 - 07	04/04/2014 16:10:23	$SB0F48C69

Measurement Details



CH1: Target	Cycle#:	-
CH2: Target	Cycle#:	32.8
CH3: Target	Cycle#:	-
CH4: QS/IC	Cycle#:	35.3

TOTAL DONANTES ESTUDIADOS

NASBA BIOMERIÈUX	PROCLEIX ULTRIO NOVARTIS	COBAS TSCREEN MPX v2.0 ROCHE	TOTAL DONANTES
68609	289625	73632	431866

Fundación Hemocentro Buenos Aires

FHBA…De las técnicas manuales a la automatización total.

	NASBA BioMerièux	Procleix Ultrio® Novartis	Taq Screen® MPX Roche
PERÍODO	2004-2008	2008-2012	Desde 2012
CARACTERISTICAS	manual	semiautomatizado	Automatizado
METODO	NASBA	TMA	q PCR
Nº DONANTES	68609	289625	18052
LD HCV (UI/ml)	150	2.78	11
LD HIV (c/ml)	100	20.72	49
LD HBV (UI/ml)	X	7.46	3.8
POOL	manual	manual	Hamilton
TAMAÑO POOL	48	ID/4/8	6
RUN	8 pooles X	2 x 91 pooles X	3 batch x 18 pooles carga continua
P. VENTANA	0	8	0
CODIGO BARRA	no	si	si
KIT	semicerrado	cerrado	cerrado

PROCLEIX ULTRIO:
PERÍODOS DE VENTANA DETECTADOS EN 431.866 DONANTES

- 4 HBV
- 3 HIV
- 1 HCV

Fundación Hemocentro Buenos Aires

VENTANAS HBV

DONANTE	FECHA	HBsAg	HBc	Anti HBs	HbeAg	Anti HBe	ULTRIO	Discriminatorio	CV	GENOTIPO
1	1/6/09	NR	NR	X	X	X	R RP=12.97	HBV RP=24.10	146 UI/ml	F
	28 dias	NR	NR	X	X	X	X	X	ND	
	45 días	NR	R	R	NR	NR	X	X	ND	
2	9/06/09	NR	NR	X	X	X	R RP= 13.98	HBV RP= 25.31	30 UI/ml	A
	17 días	R	NR	X	X	X	X	X	X	

VENTANAS HBV

DONANTE	FECHA	HBsAg	HBc	Anti HBs	HbeAg	Anti HBe	ULTRIO	Discriminatorio	CV	GENOTIPO
3 SIN DATOS	14/10/09	NR	NR	X	X	X	R RP=14.73	HBV RP=13.09	X	X
4	16/07/10	NR	NR	R	X	X	R RP= 17.10	HBV RP= 15.11	X	X
	15 días	NR	R	R	X	X	X	X	X	X

Fundación Hemocentro Buenos Aires

VENTANA HIV

DONANTE	FECHA	HIV COMBO Ag/Ac	Ag p24	HIV Ac	HIV CombFirm	ULTRIO	DISCRIMI NATORIO	CV C/ml
5	25/09/09	NR	NR	NR	X	R RP=12.60	HIV RP=14.50	297
41 años	7 días	NR	R	NR	NR	R	X	
	14 días	R	R	ZG	NR	x	X	
6 VDRL= R	11/11/10	NR	NR	X	X	R	HIV	16547
	12	R	X	X	X	R	X	
7	07/04/11	NR	NR	X	X	R	HIV	ND
	16	R	X	R	X	X	X	

Fundación Hemocentro Buenos Aires

VENTANA HCV

DONANTE	FECHA	Anti- HCV	ULTRIO	Discriminatorio	CV	GENOTIPO
1 SIN DATOS	18/2/10	NR	R RP= 9.02	HCV RP= 20.44	X	X
	9 dias	NR	X	X	X	X

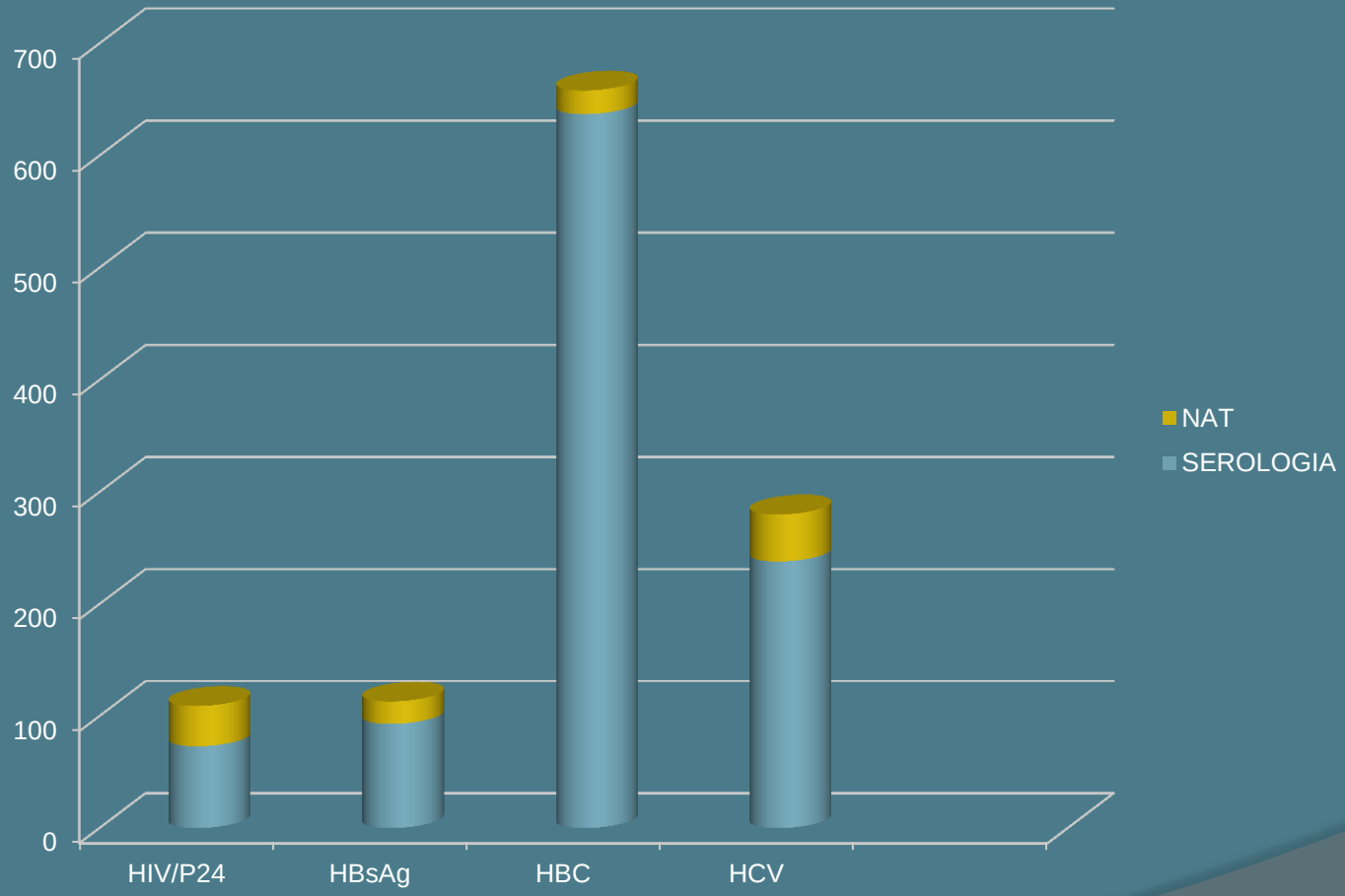
Fundación Hemocentro Buenos Aires

CONCORDANCIA SEROLOGÍA- NAT

	SEROLOGIA	NAT	%
HIV/P24	73	36	49
HBSAG	93	20	22
HBCT	637	21	3
HCV	238	42	18

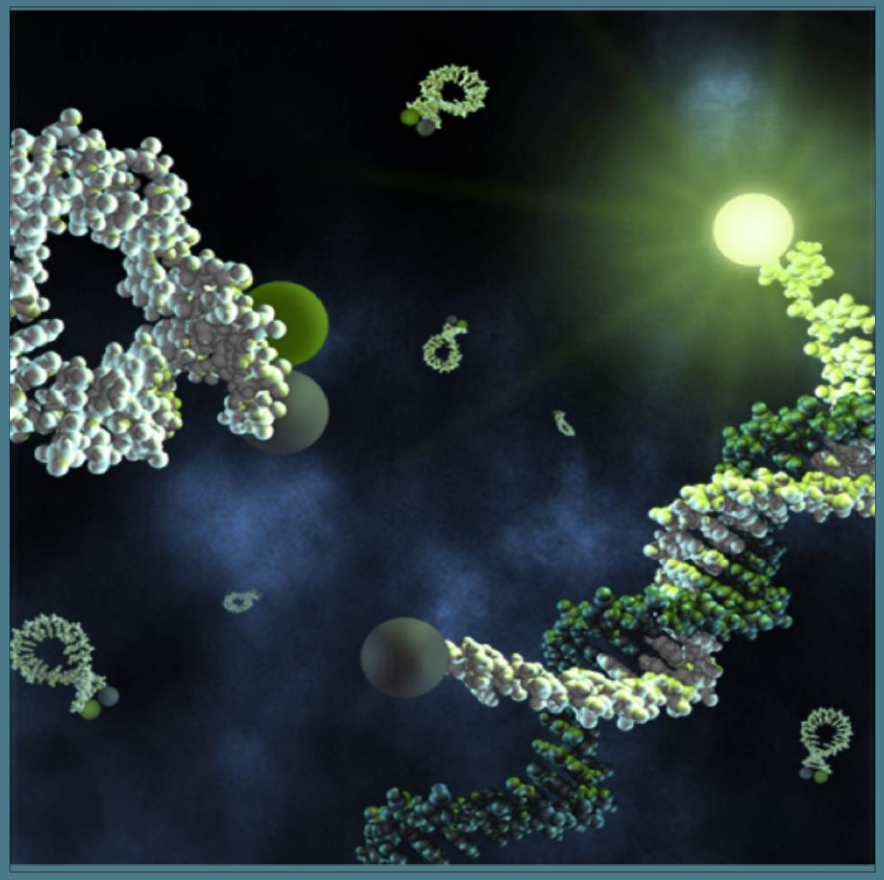
Fundación Hemocentro Buenos Aires

CONCORDANCIA SEROLOGÍA- NAT



Fundación Hemocentro Buenos Aires

CONCLUSIONES



- No se encontraron períodos de ventana en pooles de 48 con método NASBA
- PV HBV ➡ 1: 91.000
- PV HIV ➡ 1: 144.000
- PV HCV ➡ 1: 432.000
- Trabajar en muestra individual o minipool de 4 como máximo.

Fundación Hemocentro Buenos Aires

MUCHAS GRACIAS!!!