

Resultados obtenidos:

Hasta Abril 2008 (incluye muestras testeadas en el trabajo de validación)

	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

Pooles con resultado positivo que, luego abiertos, fueron negativos: 6 para HCV, 1 para HIV.

Corridas que debieron repetirse: 12 (1,1%)

Conclusión: El servicio de NAT por un sistema validado internacionalmente como Ampliscreen ha podido ser implementado con éxito en pooles de 6 muestras de acuerdo a la habilitación del producto, con excelente sensibilidad y rapidez de liberación de bolsas. Se logró el reconocimiento arancelario de todos los financiadores y el sistema funciona hoy con una dinámica correcta de entrega de resultados dentro de las 24 horas de recibida la muestra que permite una adecuada organización de los recursos de los bancos que envían las muestras.

-Experiencia en aplicación de NAT, HCV y HIV en Fundación Hemocentro Buenos Aires durante cuatro años

Dra. Andrea Guichón, Consultora en Biología Molecular para Fundación Hemocentro Buenos Aires

En Fundación Hemocentro Buenos Aires se realiza el tamizaje de rutina por NAT desde el año 2004 con el objetivo de disminuir el riesgo de transmisión de HCV y HIV por transfusiones. Los ensayos de NAT HCV y HIV se hacen de rutina en pooles de plasma de donantes, previa exclusión de unidades con serología positiva y se preparan con pipeteador automático. La metodología NAT utilizada se basa en la amplificación de ácidos nucleicos de HCV y HIV por NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) con reactivos NucliSens de bioMérieux.

En la etapa de implementación de NAT en el laboratorio, se optimizó la preparación de pooles, se verificó la sensibilidad de la técnica y se probó la resolución de pooles positivos con resultados satisfactorios. El laboratorio pudo resolver correctamente los pooles reactivos en tiempos aceptables para nuestra logística de trabajo. Los ensayos de rutina, se validan utilizando controles internos en cada muestra y controles externos de largada. Los pooles reactivos se evalúan según un algoritmo de trabajo en el cual se analizan sus componentes en etapas hasta llegar a muestra individual. Las unidades de sangre son liberadas con resultados NAT negativo o bloqueadas con resultados NAT positivo.

En un período de cuatro años, en nuestro hemocentro se realizó tamizaje por NAT en 62.752 donantes. No se encontraron unidades con serología negativa y NAT positivo para ninguno de los virus estudia-

dos. El tiempo promedio necesario para completar los ensayos de NAT HCV y HIV fue de 7 h, con 7 h adicionales en caso de requerir repetición.

La implementación de NAT HCV y HIV fue realizada satisfactoriamente en nuestro laboratorio. Las complicaciones más importantes a resolver fueron los resultados falsos positivos e inválidos, causando el bloqueo y consecuente retraso en la liberación de las unidades componentes del pool. Consideramos que las causas más probables de estos resultados fueron contaminaciones de laboratorio en el primer caso y errores técnicos, en el segundo. Para lograr minimizar la tasa de repetición de ensayos, recomendamos la aplicación de estrictas medidas de control de contaminaciones y el entrenamiento riguroso del operador de laboratorio

- Alternativas para reducir el riesgo de transmisión de HCV por vía transfusional: Equipos para detección de antígeno de core de HCV (HCV Ag).

Jorgelina Blejer, Sección Medicina Transfusional ICYCC, Fundación Favaloro y Servicio de Medicina Transfusional Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para detección de infecciones transmisibles por vía transfusional, han disminuido significativamente el riesgo de transmisión de estas últimas.

La realización de técnicas de NAT requiere de personal debidamente entrenado en técnicas de biología molecular y equipamiento que no es familiar a un servicio de Medicina Transfusional. Además, para prevenir la contaminación de las muestras, se requiere que la preparación de reactivos, procesamiento de las muestras, extracción, amplificación y detección se realicen en lugares separados, implicando la necesidad de gran espacio físico, siendo necesaria una circulación unidireccional de los materiales.

Por otra parte, la realización de las técnicas de NAT insume mucho tiempo, y si el número de donantes no es elevado, se generan dificultades logísticas para la liberación de los hemocomponentes.

Como alternativa a la implementación de NAT se ha desarrollado un ensayo de ELISA para detección de antígeno del core para el HCV (HCV Ag) (Ortho Clinical Diagnostics) en ausencia de anticuerpos para HCV durante el período de ventana, se ha desarrollado además una prueba capaz de detectar y cuantificar este antígeno (trak-C, Ortho Clinical Diagnostics) y equipos combos que detectan simultáneamente antígeno y

anticuerpos para HCV (Bio-Rad Laboratories y Abbott Murex).

Estos ensayos, muestran una sensibilidad cercana al NAT, con una diferencia de detección de pocos días. Una ventaja evidente de esta prueba es la facilidad de incorporarla en los estudios de rutina en el Banco de Sangre.

Existen numerosos trabajos que demostraron que todas las versiones han sido de utilidad en el manejo de pacientes infectados con HCV. Las técnicas de biología molecular son más sensibles, y con respecto a los ELISA que detectan antígeno de core para HCV, el equipo track "C" presenta la mejor "performance", seguido por el ensayo de detección de HCV Ag y luego por los combos que detectan antígeno y anticuerpo.

Coroucé y colaboradores llegaron a la conclusión de que la prueba para HCV Ag permite detectar la infección con HCV alrededor de un mes y medio antes que las técnicas para tamizaje para anticuerpos y dos días después que NAT. Por otra parte,

Tobler y colaboradores estimaron que la diferencia en reducción del período de ventana del ensayo para antígeno de core de HCV con respecto al NAT fue de 5,2 días y con el track C de 3,8 días.

Laperche y colaboradores utilizando ensayos que detectan simultáneamente antígeno y anticuerpos comprobaron que de 44 muestras colectadas durante el período de ventana que eran NAT positivas, 31 fueron positivas para el ensayo de Bio-Rad y 39 par el de Murex.

Luke y colaboradores también comprobaron que los equipos combinados son menos sensibles que NAT y que los que detectan sólo antígeno dependiendo no sólo de la carga viral sino también del genotipo de HCV.

En nuestro país, Pascuccio y colaboradores, publicaron el primer caso de un donante no reactivo para Ac anti-HCV pero positivo para HCV Ag. En una población de 4.272 donantes, 30 unidades fueron repetidamente reactivas para HCVAg siete de ellas con anticuerpos. Una con sólo HCVAg presentó neutralización positiva, ALT y AST elevadas y RNA de HCV positivo. Dieciséis días después fue repetidamente reactiva para antígeno y anticuerpos y 35 y 67 después sólo para anticuerpos.

En la Sección Medicina Transfusional de la Fundación Favaloro, se han estudiado 16.677 muestras desde el 2 de junio de 2005 al 30 de abril de 2008. Setecientos nueve muestras (4,25%) fueron inicialmente reactivas y de ellas sólo 25 muestras (0,15%) fueron repetidamente reactivas, pero ninguna de ellas fue positiva por técnicas de detección de RNA para HCV, ni se detectó seroconversión en los donantes.

Por otra parte, 2 (0,012%) presentaron tanto antígeno viral como anticuerpos anti-HCV,

Para algunos países, la realización de estos ensayos alternativos también resultan muy costosos. Sarov, y colaboradores, en un Banco de Sangre en Gaza evaluaron la realización de tamizaje por HCVAg en "pooles" de 3 y 6 muestras y analizaron el costo-beneficio. Observaron que la realización de pooles de 6 muestras anti-HCV negativas fue beneficioso en esa población

que tiene una prevalencia de HCVAg que excede las 3-4.2/10.000 donaciones.

Concluyendo, como ventajas de la utilización de equipos de ELISA que detectan HCVAg para disminuir el riesgo de transmisión de HCV por vía transfusional podemos mencionar las siguientes:

- Adaptación inmediata a la rutina de trabajo del Banco de Sangre.
- No requiere un área especializada.
- No requiere material accesorio ni pretratamiento de muestra.
- Se mantiene el mismo tiempo para la liberación de los hemoderivados.
- No requiere ni personal adicional ni cambios de turno de trabajo.
- Fácilmente automatizable.

En países en desarrollo, el uso de ensayos para detectar HCV Ag durante el período de ventana de la infección por HCV resultaría en una solución práctica y efectiva para aumentar la seguridad transfusional. Esto no requiere de la logística ni los costos necesarios para implementación de NAT. Si la tecnología requerida y el personal entrenado ya están disponibles para ensayos de ELISA, el costo de agregar esta técnica es mucho menor. Por el contrario, la utilización de NAT es más costosa pero aumenta la seguridad transfusional y puede utilizarse para otros agentes transmisibles (HIV, HBV, WNV, parvovirus, emergentes).

Referencias

- Coroucé, AM, et al. (2000) Efficacy of HCV core antigen detection during the pre-seroconversion period. *Transfusion*;40:1198-202.
- Laperche S, et al. (2005) Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion*; 45:1965-72.
- Tuke, PW, et al (2008) Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on hepatitis C virus. *Transfusion*;48:594-600.
- Sarov B, et al. (2007) Feasibility and cost-benefit of implementing pooled screening for HCV Ag in small blood bank settings. *Transfusion Medicine*;17:479-87.
- Pascuccio MS, et al. (2007) Seroconversión para hepatitis C en donantes de sangre. *Medicina*;67:771-4

Reingreso de donantes: ¿cuándo sí y cuándo no?

- Diagnóstico en infección por HIV

M. Alejandra Monticelli. Sub-Jefa de la Unidad Enfermedades Infecciosas. Hospital Francés

Los métodos diagnósticos en la infección por HIV pueden ser virológicos o serológicos. Dentro de los primeros tenemos el antígeno p24, el cultivo viral y la PCR para detectar ARN o ADN proviral. Dentro de los segundos tenemos el test de Elisa, Aglutinación, Western Blot e IFI, que son los más utilizados.

Las pruebas virológicas son más usadas en la etapa de infección aguda mientras que las serológicas lo son en la etapa de infección temprana y crónica.