



VI CONGRESO DEL GCIAMT

LIMA -PERÚ

6 al 11 de junio 2009

“Implementación de Pruebas Moleculares en Screening Viral: Experiencias en un Centro Hospitalario”

JORGE REY



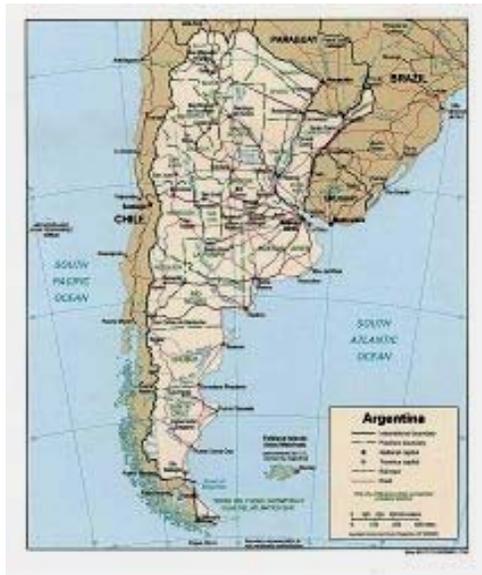
**HOSPITAL DE CLÍNICAS – UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES**



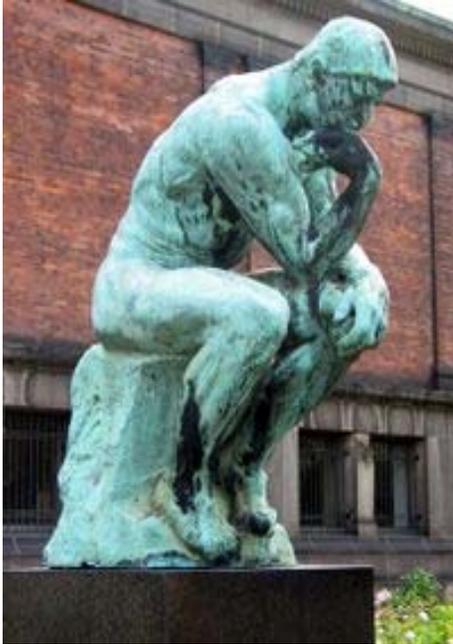


ARGENTINA

País situado en el Cono Sur de América del Sur. Es junto a Chile el país más austral del mundo. Buenos Aires es su capital y la ciudad más poblada.



- La población de la República Argentina censada en noviembre de 2001 ascendía a 36.260.130 habitantes (el 0,59% de la población mundial). La estimación para 2008 es de 39,7 millones de habitantes.
- La Argentina es un país con baja densidad de población (14 hab/km²), muy concentrada en el Aglomerado Gran Buenos Aires (33%), mayoritariamente urbana (89%) y con una gran proporción de personas mayores de 60 años (13,8%).
- Tiene altas tasas de esperanza de vida (75,2 años) y alfabetización (97,4%).



¿POR QUÉ
BIOLOGÍA
MOLECULAR?

AÑO 1995:

- 2 PACIENTES HIV POST TRANSFUSIONAL (detectados por SC y clínica)
- TRANSMISION POR CGR. NO SE TRANSFUNDIERON CP NI PFC
- RESULTADOS DE DONANTES REPETIDOS EN PFC: p24 y anti HIV 3a Gen NEG (por ensayos de diferentes fabricantes)
- CARGAS VIRALES ENTRE 8.000 Y 10.000 cp/ml
- **JUICIOS. AMBOS FALLARON A FAVOR POR POSIBILIDADES METODOLOGICAS EXISTENTES**

Epidemiología para HBV, HCV, y HIV

- 2.000 millones de personas tienen evidencia serológica de infección pasada o presente con el HBV
- 360 millones de portadores crónicos del HBV
- 600.000 personas o más mueren por enfermedades crónicas del hígado relacionadas al HBV
- ~ 170 millones de personas están infectadas con el HCV (OMS)
- ~ 40 millones están infectadas con el HIV (Dec. 2006; UNAIDS)

Riesgo estimado de infección viral en 10^7 donaciones estudiadas

	Ventana	Variantes	Seroconversión Atípica	Errorres de laboratorio
HIV	15(93.7%)	<0.6(<3.7%)	<0.1(<0.6%)	0.4(2.5%)
HCV	80(72.1-87.9%)	<1(<1.1-<0.9%)	0-20(0-21.9%)	11.2(0-21.9%)
HBV	63-150(41.2-98%)	<0 (0%)	1(0.6-1.5%)	1-3(0.6-4.5%)
HTLV	15 (93.7%)	<1 (<6.2%)	1(6.2%)	0.8(5%)
Total	183-260	<1	0-20	15.4
	(61.8-96.8%)	(<0.3-<0.5%)	(0-10.6%)	(5.2-8.1%)

Busch y col.Applications of molecular biology to blood transfusión.AABB,1997:123-76

DETECCION DEL PERIODO DE VENTANA MEDIANTE NAT

VENTANA	HIV	HCV	HBV
Infección a anticuerpos (días)	22	70	56
Reducción por NAT(días)	10-15	41-60	6-15
Tiempo de duplicación (día)	1	<1	4
Carga viral (geq de virus/ml)	10²-10⁷	10⁵-10⁷	10²-10⁴

**Task Force on NAT testing of Blood Donors. Transfusion,2000;
40:143-159**

SENSIBILIDAD

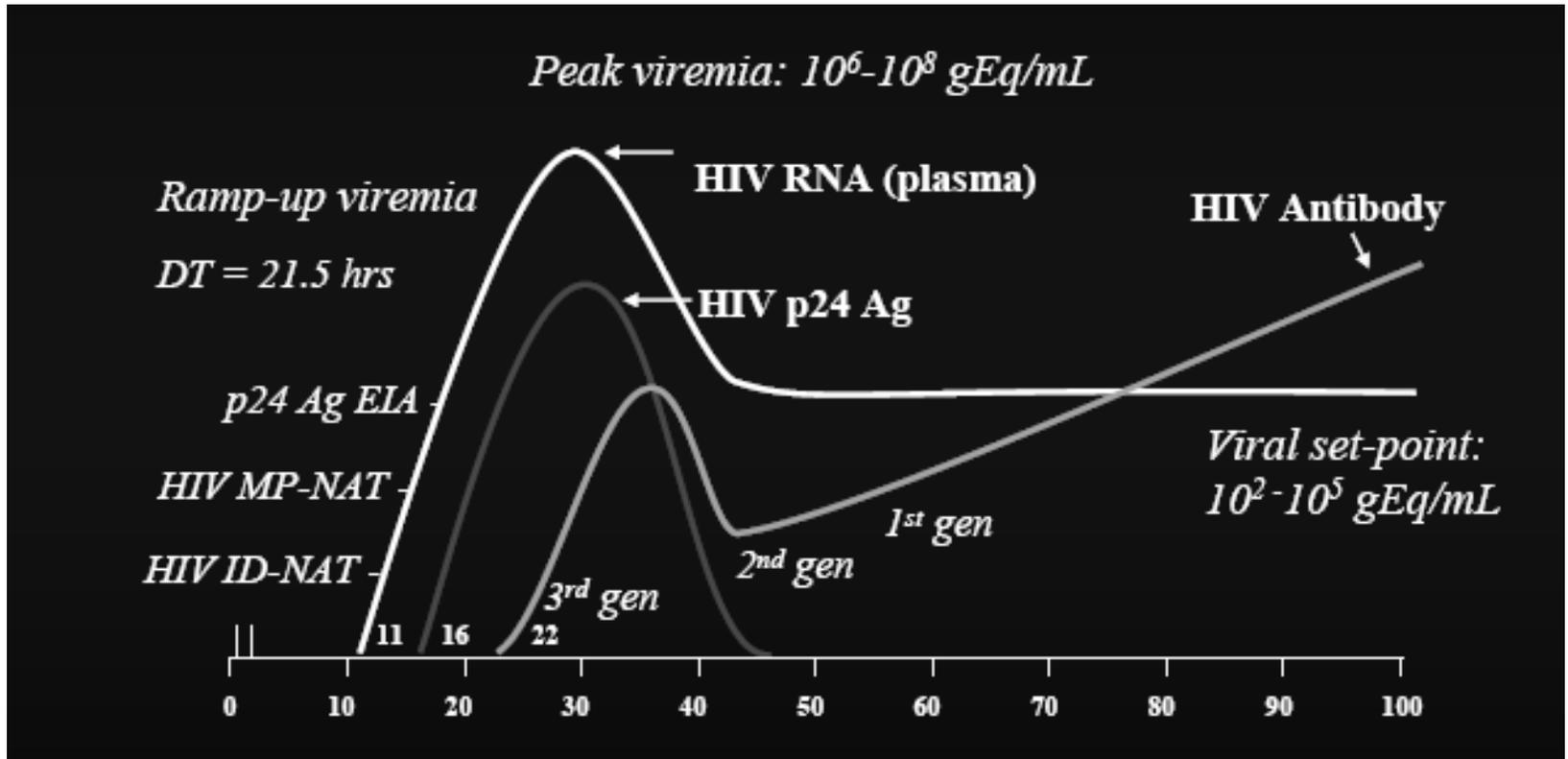
Serología

Del orden de pg/ml-
ng/ml en la
determinación de
antígenos

Biología Molecular

Del orden de las 10
cop/ml

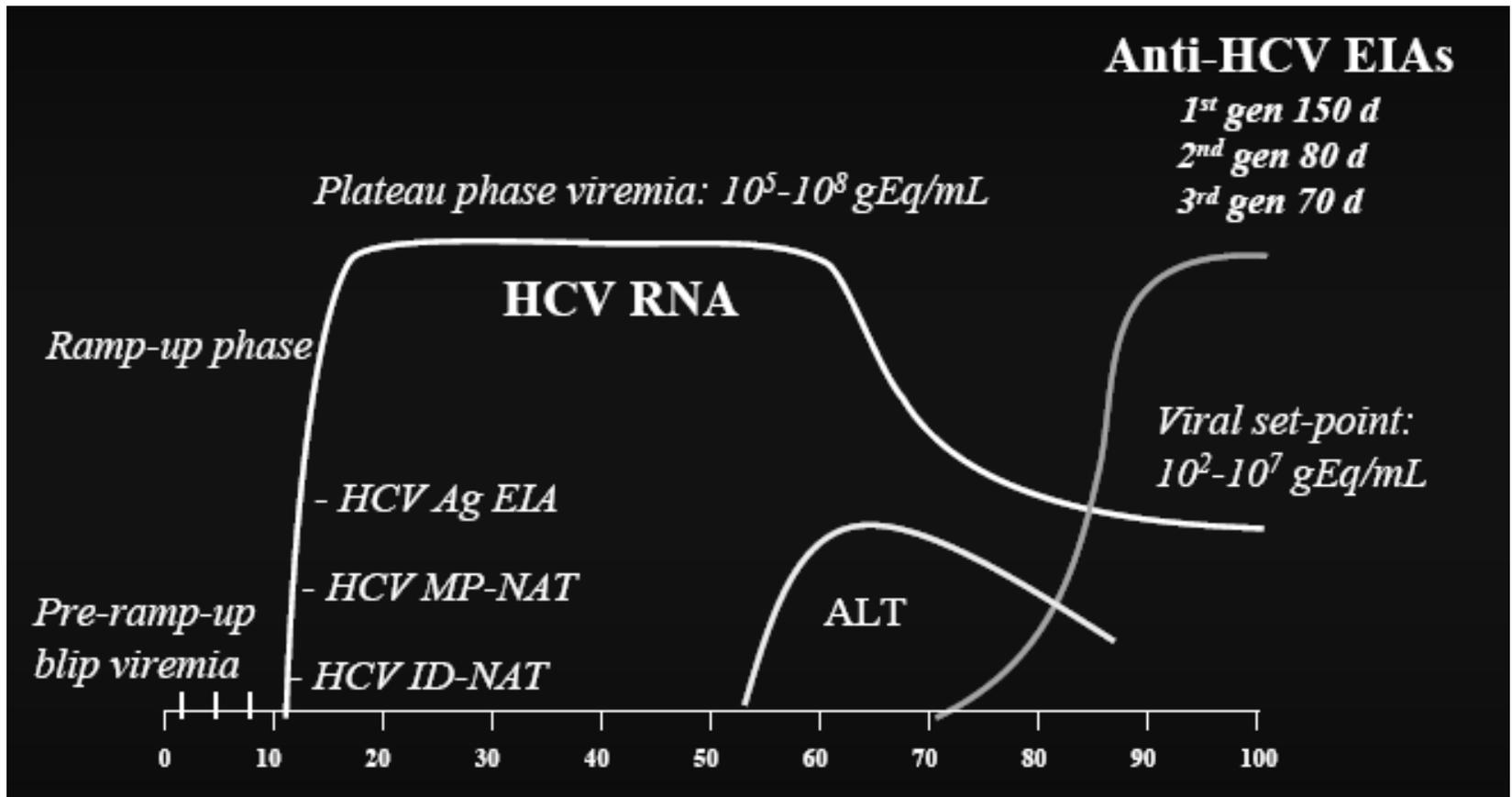
Marcadores de HIV



Comportamiento intermedio entre HCV y HBV

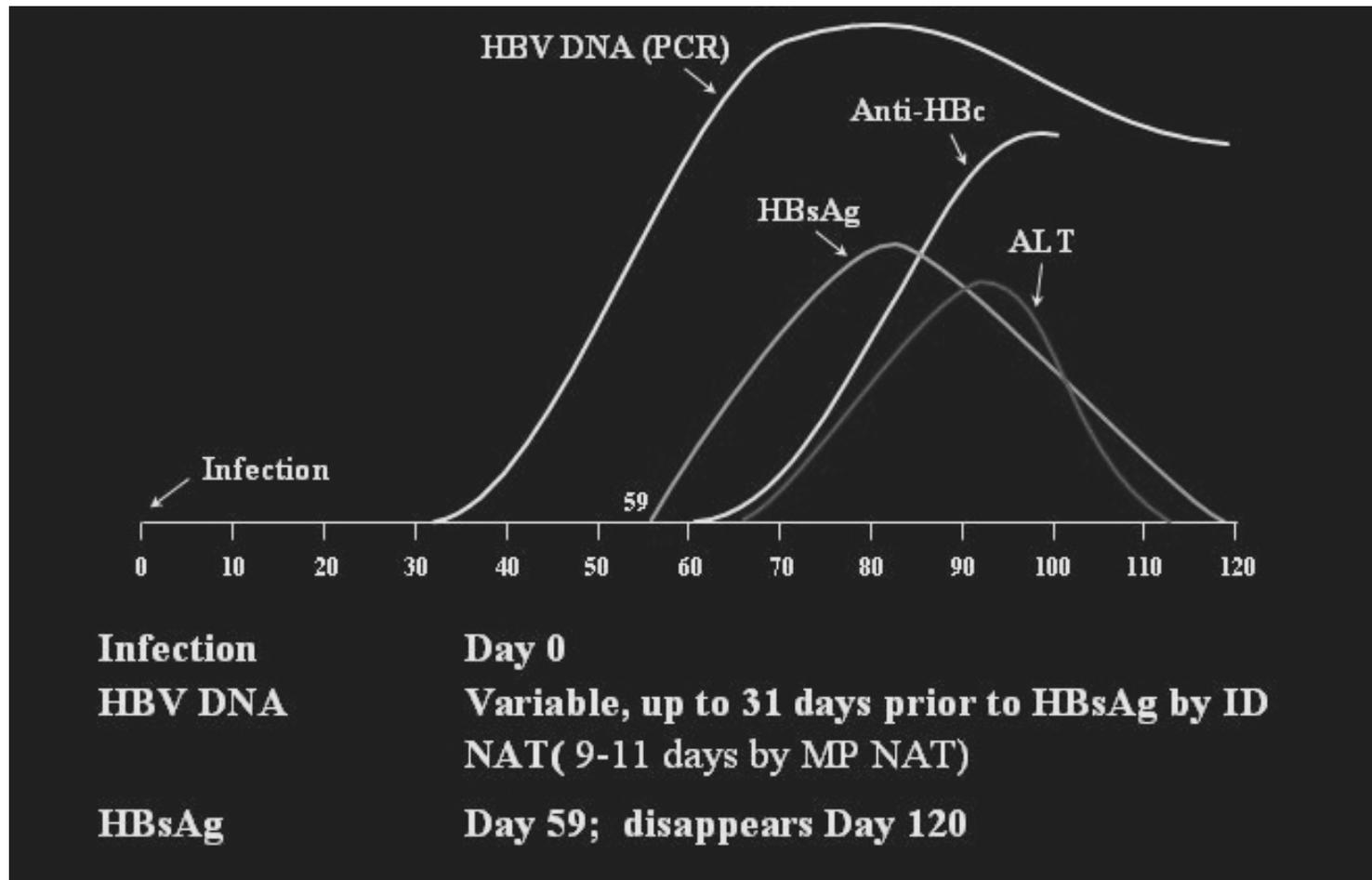
- Período de ventana de antígenos cercana al NAT
- Moderada viremia durante el período de ventana (3000 Cp/ml)
- Alta velocidad de duplicación exponencial (21 hs)

Marcadores de infección por HCV



- **Período de ventana de anticuerpos muy grande: 66-70 días**
- **Alta viremia durante el período de ventana (100.000 Cp/ml)**
- **Alta velocidad de duplicación exponencial (10-17 hs)**

Marcadores de infección por HBV



- **Período de ventana de antígenos cercana al NAT**
- **Baja viremia durante el período de ventana (2000 Cp/ml)**
- **Baja velocidad de duplicación exponencial (2-4 días)**

LA JUSTICIA OTRO PUNTO DE OBSERVACION DE LA REALIDAD

Al 2007 existen por lo menos 6 juicios con sentencia final (5 en la CNCIV y 1 en la SC de Mendoza) vinculados a transmisión de HIV por vía transfusional en período de ventana.

En aquellos con fallo favorable para el demandado el argumento que sentó jurisprudencia fue la no existencia de pruebas de mayor sensibilidad que la detección de Ac y Ag al momento del hecho.

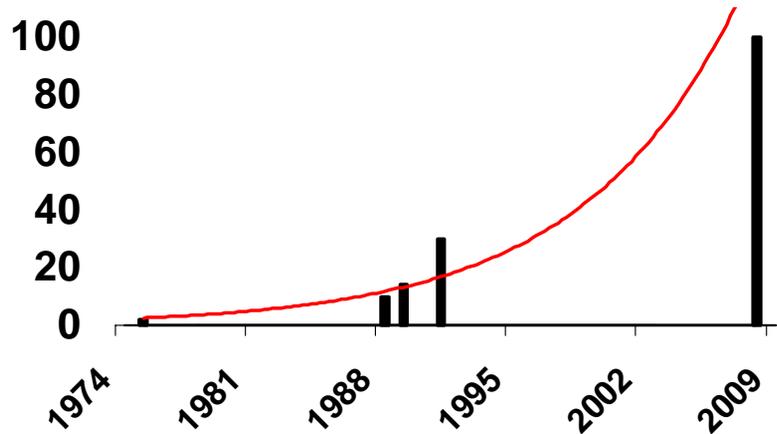
¿POR QUÉ EN ARGENTINA
NO ES UNA PRÁCTICA
OBLIGATORIA?

ARGUMENTOS:

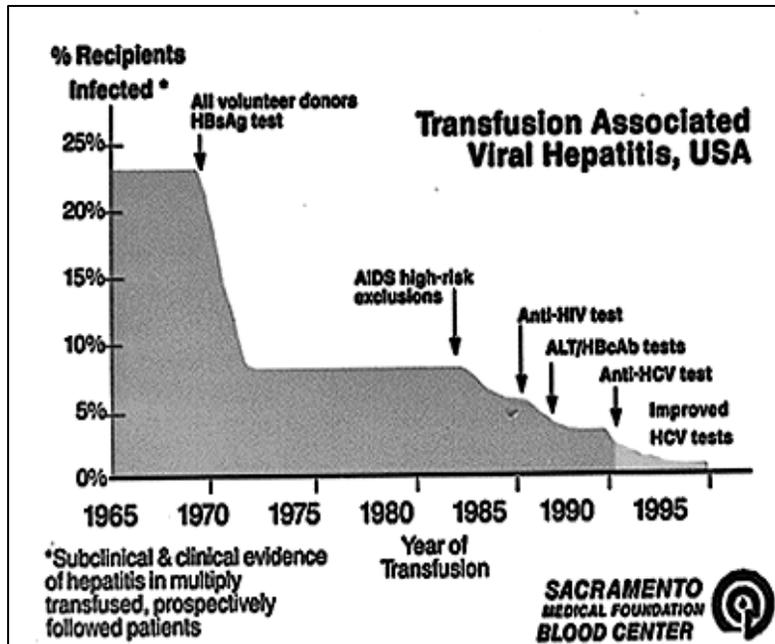
• **COSTO DEL SCREENING POR NAT**

- LABORATORIOS ADECUADOS
- CAPACITACIÓN DEL PERSONAL

COSTO DEL SCREENING



EL COSTO DEL SCREENING SE HA INCREMENTADO EN FORMA EXPONENCIAL



EL RIESGO RESIDUAL A CAÍDO A VALORES INFERIORES 1/1.000.000

ESTRATEGIA DESARROLLADA PARA EL LOGRO DE LA IMPLEMENTACIÓN

- 1. FUNDAMENTO: EXISTENCIA DE TRANSMISIONES TRANSFUSIONALES Y CASOS DE LITIGIO**
- 2. DESARROLLO DE UN PLAN DE INVESTIGACIÓN**
- 3. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**
- 4. PROCESAMIENTO RUTINARIO**

Protocolo de investigación aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas y el Consejo Superior de la UBA y presentado ante el ANMAT

Evaluación del kit Procleix® Ultrio™ en la selección de donantes de sangre del Departamento de Hemoterapia e Inmunohematología del Hospital de Clínicas de la U.B.A.

Protocolo: ULT-020-AR1

CAPACITACIÓN DEL PERSONAL

- **FORMACIÓN DE GRADO ADECUADA**
- **EXPERIENCIA EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**
- **ENTRENAMIENTO EN LA METODOLOGÍA ESPECÍFICA NAT UTILIZADA: ENTRENAMIENTO POR EL FABRICANTE DEL EQUIPO**
- **USO DE PANELES DE EFICIENCIA**

IMPLICANCIAS:

- **DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE CORRIDAS INVÁLIDAS**
- **DISMINUCIÓN DE CROSS CONTAMINACIÓN**
- **SENSITIVIDAD ADECUADA**

DISEÑO DEL PROCESAMIENTO:

- **TESTEO INDIVIDUAL O EN POOLES:**
 - ❖ **SENSITIVIDAD**
 - ❖ **OPERATIVIDAD**
 - ❖ **REQUERIMIENTO DE PRODUCTO**

- **PROCESAMIENTO SEMI O AUTOMATIZADO**

ADECUACIÓN DEL LABORATORIO

- **PROCESAMIENTO SEMI AUTOMATIZADO**

- **PROCESAMIENTO AUTOMATIZADO**

LOGROS PRIMARIOS DE LA DIVISIÓN **EN ÁREAS**

- EVITAR CONTAMINACIÓN DE TEMPLADOS**
- EVITAR CONTAMINACIÓN DE AMPLICONES**
- MANTENER UNA CORRECTA TEMPERATURA Y HUMEDAD**

PRINCIPALES REQUISITOS DE LAS ÁREAS:

- **FLUJO DE TRABAJO UNIDIRECCIONAL**
- **BARRERAS PARA SEPARAR ÁREAS CON DIFERENTES CONDICIONES**
- **ÁREAS CON PRESIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS**
- **TEMPERATURA DE ÁREAS:**
 - **POST AMPLIFICACIÓN: 21-27°C**
 - **ÁREAS RESTANTES: 15-30°C**

CONCEPTO DE LAS ÁREAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

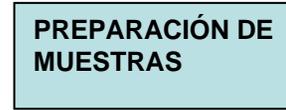
Flujo ideal de aire desde las áreas libre de templado hacia las de transición



ÁREA GENERAL DEL LABORATORIO



BARRERA



ÁREA LIBRE DE AMPLICONES

ÁREA LIBRE DE TEMPLADO

BARRERA



ÁREA LIBRE DE AMPLICONES

BARRERA

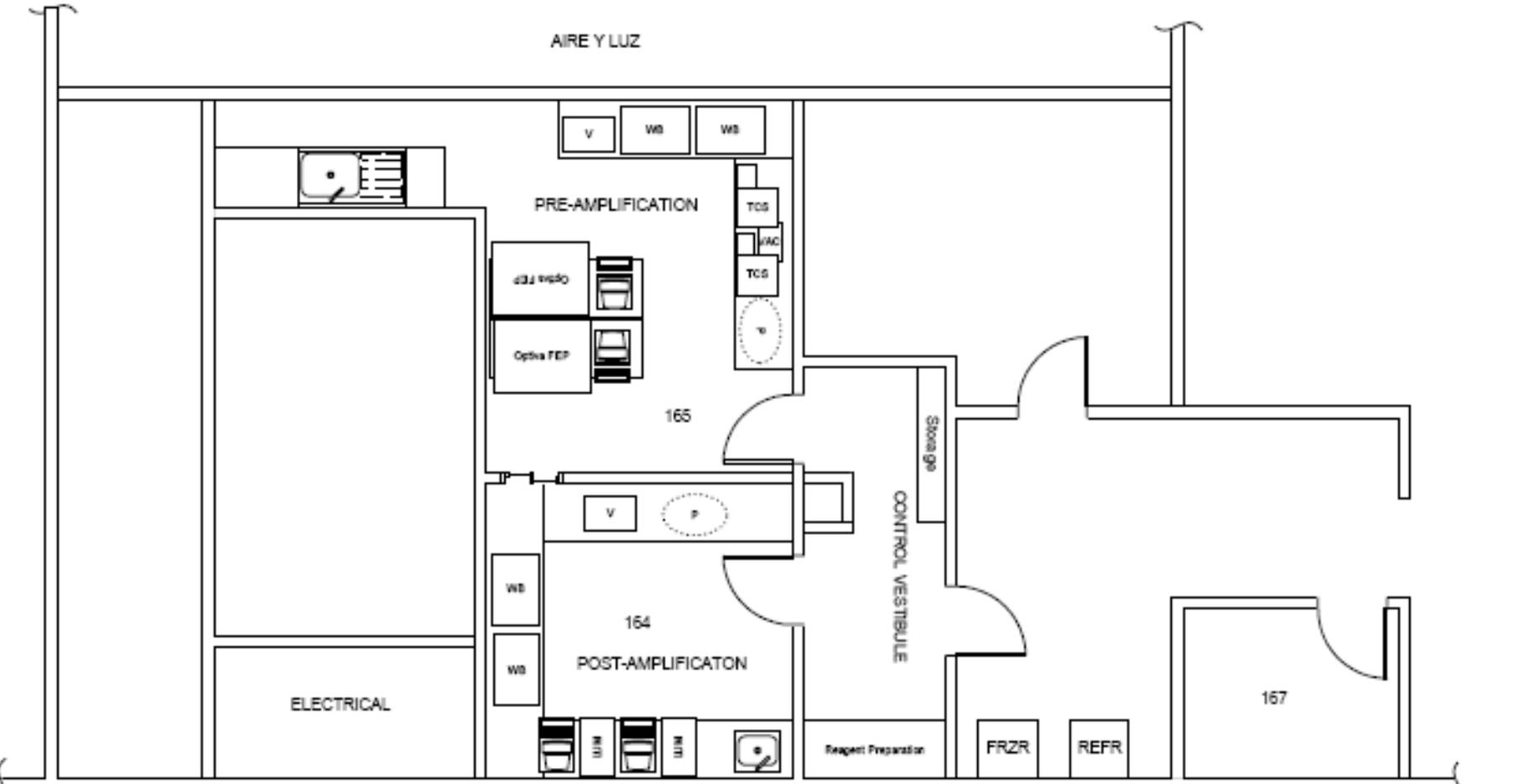


BARRERA



ÁREA GENERAL DEL LABORATORIO

LABORATORIO DE BM DEL HCUBA



Chiron Blood Testing	
Hospital de Clinicas, Buenos Aires	UoBA Hosp de Clin plan 1. rev 28 Nov, 2005
Proposed Layout for Proclix Lab	
The information contained in this sketch is intended for informational purposes only, and is not intended as specific economic advice or construction. All dimensions are approximate at best, and existing conditions must be verified in the field.	

Protocolo: ULT-020-AR1

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo principal del estudio es determinar si el HIV-1 RNA, el HCV RNA y/o el HBV DNA pueden ser detectados, en donantes de sangre en período de ventana, con el Ensayo Ultrio en el Procleix® System.

2. POBLACIÓN Y REACTIVOS

5868 donantes Procleix Ultrio: Muestra individual

Perfil Serológico:

MARCADOR	METODOLOGÍA/FABRICANTE
HBsAg	EIE/Murex United Kingdom
anti HBc	MEIA/Abbott Germany
anti HCV	EIE/Murex South Africa
anti HIV1/2	MEIA/Abbott Germany
Combo HIV	EIE/Murex United Kingdom
anti HTLV	EIE/Murex United Kingdom
anti TC HAI	HAI/Lemos Argentina
anti TC EIE	EIE/Wiener Argentina
anti TP	USR/Wiener Argentina
anti Bruc.	Aglut/Wiener Argentina

Protocolo: ULT-020-AR1

3. RESULTADOS

- 15 Muestras EIE + NAT +:

AÑO	DADOR	SEROLOGIA REACTIVA	DISCRIMINATORIO
2007	3369	Anti HCV /anti HBc	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	3559	Anti HCV	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	3647	HBsAg/anti HBc	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	3891	HBsAg/anti HBc	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	4118	Anti HIV/Combo HIV	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	4247	Anti HIV/Combo HIV	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	4789	Anti HIV/Combo HIV/anti HBc	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado
2007	5537	Anti HCV	Ultrio reactivo, discriminatorio no realizado

3. RESULTADOS (cont.):

- 15 Muestras EIE + NAT +:

AÑO	DADOR	SEROLOGIA REACTIVA	DISCRIMINATORIO
2007	5638	Anti HIV/Combo HIV/anti HBc	HIV
2007	5830	HBsAg	HBV
2007	6264	Anti HCV	HCV
2008	1575	Anti HIV/Combo HIV	HIV
2008	1680	Anti HCV	HCV
2008	3578	HBsAg / anti HBc	HBV
2008	3590	Anti HCV	HCV

Protocolo: ULT-020-AR1

3. RESULTADOS (cont.)

- Muestras EIE + NAT - :

MARCADOR	n
HBsAg	2
Anti HBc<10	23
Anti HBc>10	54
Anti HCV<3	7
Anti HCV>3	1
HIV COMBO	13
COMBO+ aHIV+ WB -	1
aHIV+ WB -	7

Protocolo: ULT-020-AR1

3. RESULTADOS (cont.):

- **1 Muestra EIE – NAT + :**

Anti- HIV 3rd generation Axsym : No Reactivo

Anti-HIV/p24Ag Combo test Murex: No Reactivo

Procleix Ultrio : Reactivo RP 17.0

**Procleix Ultrio Discriminatorio: Reactivo para RNA de HIV,
No Reactivo para HCV/HBV**

Anti-HCV Murex: No Reactivo

HBsAg Murex: No Reactivo

anti-HBc AxSym Abbott: No Reactivo

anti HTLV I/II: No Reactivo

HAI Chagas Polychaco: No Reactivo

EIE Chagas Wiener: No Reactivo

Sifilis USR Wiener: No Reactivo

Brucelosis (Aglutinación en placa) Wiener: No Reactivo

Protocolo: ULT-020-AR1

3. RESULTADOS (cont.):

- 1 Muestra EIE – NAT + :

	bDNA	NASBA Real Time	QPCR (Quest Diagnostics)
RNA HIV (cp/ml)	91	105	99

Genotipificación:

Summary Data:

Sequence includes PR: codons 1-99

Sequence includes RT: codons 1-400

There are not insertions o deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

PR: B (93,9%)

RT: B (95,2%)

4. CONCLUSIONES:

OBJETIVO PRIMARIO

- **EFFECTIVIDAD EN LA DETECCIÓN DE PERÍODO DE VENTANA**

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- **IMPORTANCIA DEL TESTEO INDIVIDUAL**
- **INTERPRETACIÓN DE FALSOS RESULTADOS REACTIVOS POR SEROLOGÍA**
- **CORROBORACIÓN DE VERDADEROS RESULTADOS REACTIVOS**

4. CONCLUSIONES (cont.):

APORTES DEL TESTEO INDIVIDUAL

- **ADECUACIÓN DE LOS TIEMPOS DEL ENSAYO DE LA METODOLOGÍA INDIVIDUAL**
- **SENSITIVIDAD**

APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA SELECCIÓN DE DONANTES DE SANGRE, TEJIDOS Y ÓRGANOS

- **RIQUEZA DE LA INFORMACIÓN**
- **EPIDEMIOLOGÍA: DISMINUCIÓN DE LA MASA DE PORTADORES**
- **EVALUACIÓN CLÍNICA DEL DONANTE:**
 - ✓ **ESTADÍO DE LA HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN EN EL DONANTE**
 - ✓ **POSIBILIDADES DE TRATAMIENTO PRECOZ Y ELIMINACIÓN DEL VIRUS**

“Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid-amplification technology”

P. S. P. Scuracchio,* M. C. C. Poli,* M. M. M. Lemos,* A. G. Oliveira Filho,* N. A. Salles,†D. A. F. Chamone,†‡ M. Magri,§ N. J. F. Cavalcante§ & R. Collela* *

Banco de Sangue de São Paulo,†Fundacxaõ Pro´-sangue/Hemocentro de São Paulo, ‡Department of Hematology and Hemotherapy, Universidade de São Paulo, and §Reference and Training Center–AIDS, São Paulo, Brazil

Received 1 November 2006; accepted for publication 2 February 2007

Transfusion Medicine, 2007, 17, 200–204

- **El número de NAT + / EIA negativo fue mayor que el estimado:**
 - **1,1 casos / 100.000 CI 95% (7,1-14,5) estimado**
 - **4,18 casos / 100.000 (encontrado)**
- **Aumento del riesgo puede ser explicado por “dadores buscadores de pruebas”, puede ser la explicación para este aumento del riesgo calculado.**
- **Ambos casos ocurrieron antes de los síntomas de fase aguda del HIV.**

NAT para HIV y HCV en Hemocentros Argentinos

Institución	Marca	DS/ pool	Sens HCV UI/ml	Sens HIV Cp/ml	Inicio		N	Casos NAT+/ Serol-
FUHESA	NucliSens	48	NE	NE	2004		?	0
Hemocentro Buenos Aires	NucliSens	48	NE	NE	2004		48.944	0
CDCBios	NucliSens	96/48	NE	NE	200		80.000	0
CIBIC	Ampliscreen	6	21	50	2005		9.726	0

NAT para HIV y HCV en Hemocentros Argentinos

Institución	Marca	DS/ pool	Sens HCV UI/ml	Sens HIV Cp/ml	Inicio	N	Casos NAT+/ Serol-
Hospital Italiano Rosario	PCR "in house"	1	NE	NE	2005	5.500	1
Fundación BS Cba	Ampliscreen	6	NE	NE	2006	6.388	0
Hospital Garrahan	Ampliscreen	5	23	86	2007	4.469	0



Muchas gracias!!!!



jrey@hospitaldeclinicas.uba.ar

