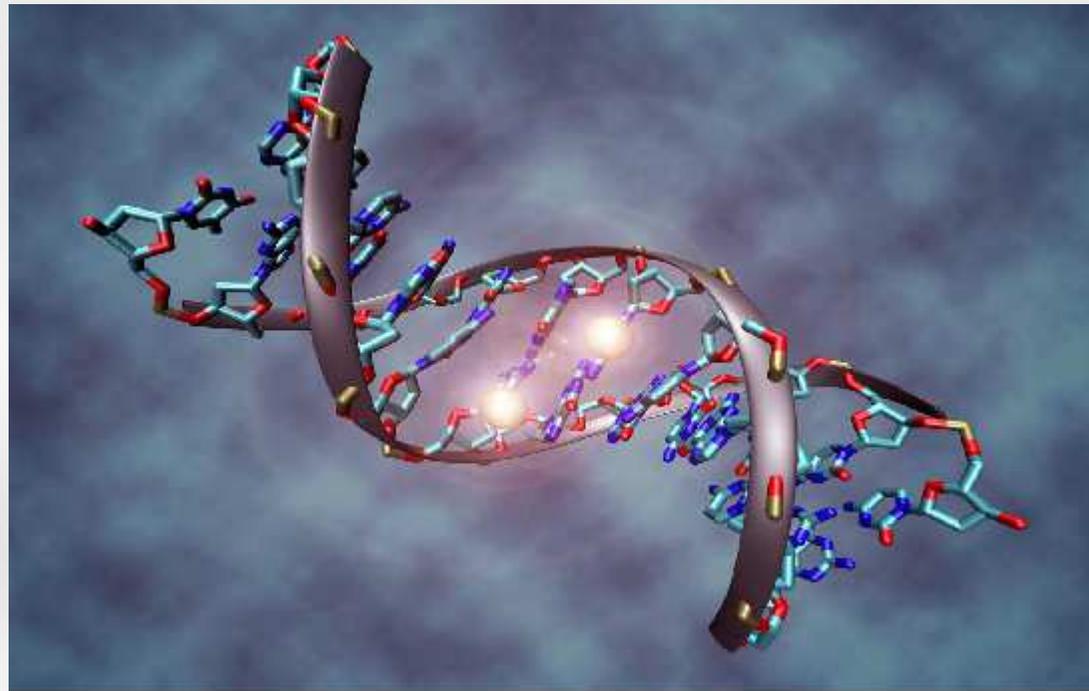


Implantação do teste NAT no HEMOCE



Dra. Richeyla Custódio



DEFINIÇÃO DO TESTE NAT

Teste para detecção de ácido nucléico do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e do vírus da Hepatite C (HCV) em amostras provenientes de serviços de hemoterapia.



IMPORTÂNCIA DO TESTE NAT

- Diminuição da janela imunológica :

HIV (de 22 dias para 10 dias)

HCV (de 60 dias para 12 dias)

- Aumento da segurança transfusional;

- Teste complementar a triagem sorológica.



PORTARIA Nº112, de 29 de janeiro de 2004, M.S.

- Prevê a implantação no Brasil do teste de ácido nucléico (Nucleic Acid Test - NAT) para a detecção de patógenos virais em unidades de doação de sangue e conseqüente aumento da segurança transfusional.



IMPLANTAÇÃO DO TESTE NAT

- O Projeto do teste do ácido nucléico – NAT teve início em 2004, sendo desenvolvido por um consórcio público formado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ e Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP, sob demanda e direção nacional da Secretaria de Atenção a Saúde (SAS) do Ministério da Saúde por meio da sua Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH).
- Realização de um Estudo Piloto no Hemocentro do Estado de Santa Catarina, HEMOSC no ano de 2008, que contou com 5.000 (cinco mil) amostras de serviço de hemoterapia.



IMPLANTAÇÃO DO TESTE NAT

Esse *Estudo Piloto* possibilitou a implantação de melhorias para utilização dos *kits* e plataformas NAT em etapa posterior, no *Estudo Multicêntrico*, ocorrido entre os anos de 2010 e 2011, que objetivou a avaliação do desempenho do conjunto de análise de Bio-Manguinhos, na rotina de trabalho dos hemocentros de Santa Catarina (HEMOSC), Pernambuco (HEMOPE), Rio de Janeiro (HEMORIO), Fundação Pró-Sangue de São Paulo (FPS), estes identificados como sítios testadores do NAT (SIT-NAT), além dos hemocentros do Rio Grande do Sul (HEMORGS), Rio Grande do Norte (HEMONORTE), Paraíba (HEMOIBA), Espírito Santo (HEMOES) e Hemonúcleo de Santos (HEMOSantos), como unidades referenciadoras e coletoras de amostras (respectivamente, URA e UCA). Tal estudo foi finalizado com 219.791 amostras.



CONCEITOS

SIT-NAT: Sítio Testador do NAT - Hemocentro Coordenador do Estado eleito para a realização centralizada dos testes NAT da Hemorrede Nacional, realizando sua própria coleta de amostras para testes NAT, conforme determinação do Ministério da Saúde.

URA: Unidade Referenciadora de Amostra - responsável por receber as amostras das unidades de coleta de amostras de sua Hemorrede, e/ou realizar a coleta de amostras para testes NAT, e também, responsável pelo preparo das amostras para envio aos sítios testadores do NAT.

UCA: Unidade Coletora de Amostra - serviços de hemoterapia que realizam a coleta de amostras para testes NAT, responsáveis pelo preparo das amostras para envio às unidades referenciadoras de amostras

CGSH: Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados



SÍTIOS TESTADORES -SIT

- Expressivo quantitativo de amostras testadas;
- Maior estrutura da rede de serviços públicos no Estado;
- Melhor logística e organização;
- O Ministério da Saúde definiu 14 serviços de Hemoterapia como Sítios Testadores NAT.

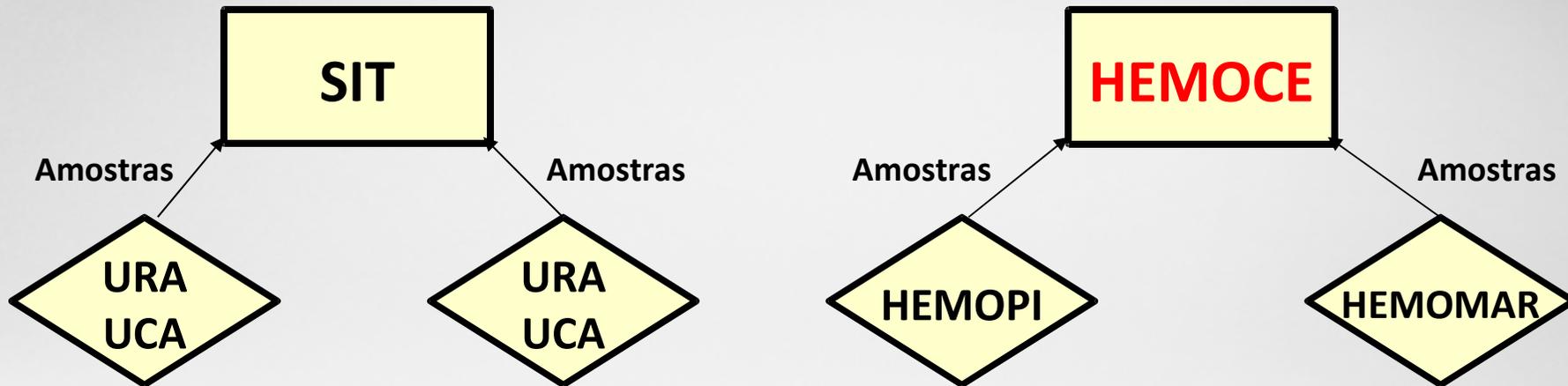


SIT-NAT

Santa Catarina	HEMOSC
Pernambuco	HEMOPE
Rio de Janeiro	HEMORIO
Minas Gerais	HEMOMINAS
Brasília	Fundação Hemocentro de Brasília
São Paulo	Fundação Pró-Sangue
São Paulo	Hemocentro da UNICAMP
São Paulo	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
Paraná	HEMEPAR
Pará	HEMOPA
Manaus	HEMOAM
Campo Grande	HEMOSUL
Fortaleza	HEMOCE



FLUXO DE TRANSPORTE NAT (M.S.)



- **Sítios Testadores (SIT)** – locais escolhidos para realizar o teste NAT (HEMOCE);
- **Unidades Referenciadoras de Amostras (URA)** – locais que enviarão as amostras a serem testadas (HEMOPI, HEMOMAR, Hemonúcleos do HEMOCE);
- **Unidades Coletoras de Amostras (UCA)** – locais que coletarão as amostras a serem testadas (HEMOPI, HEMOMAR, HEMOCE)
- **PIAUÍ:** Teresina.
- **MARANHÃO:** São Luiz, Imperatriz e Balsas.



LABORATÓRIO NAT

Equipe:

- Richeyla Custódio (Coordenadora)
- Regina Lúcia (Farmacêutica Bioquímica)
- Newton Benevides (Farmacêutico Bioquímico)
- Emanna Odília (Biomédica)
- Renato Sousa (Biomédico)
- Matildes Lucas (Técnica)
- Fabiane (Técnica)

Horário de Funcionamento:

Segunda à Sábado - 07h às 22h



LABORATÓRIO NAT

Instalações:

- Chegada dos aparelhos: 16.04.12
- Instalação das Plataformas: 24.04 a 08.05 ([PI 01](#))
21.06 a 05.07 ([PI 02](#))
- Liberação das Plataformas: 25.05 ([PI 01](#)) e 16.07 ([PI 02](#))
- Treinamento: 21 a 25.05 (1ª turma)
16 a 18.07 (2ª turma)
- Início das Rotinas: 20.06 ([PI 01](#)) e 17.07 ([PI 02](#))



METODOLOGIA

- Técnica de Biologia Molecular;
- PCR em tempo real- quantificação de moléculas a cada ciclo;
- PCR multiplex HIV/HCV - amplificação ao mesmo tempo.



LABORATÓRIO NAT

- **Processamento de Amostras:**
 - 1.104 amostras/dia (02 rotinas)
 - Média diária:
 - HEMOCE: 350 amostras
 - PIAUÍ: 180 amostras
 - MARANHÃO: 366 amostras
 - Total da amostras dia: 896.



ROTINAS NAT HEMOCE

NAT	INICIO	FINAL	AMOSTRAS
1ª ROTINA	09h	17h	Imperatriz (MA) Balsas (MA) HEMOCE
2ª ROTINA	12h	20h	Teresina (PI) São Luiz (MA) Buffy Coat (HEMOCE)



PIPETAGEM DAS AMOSTRAS



Tubos primários

100µL de cada amostra



600µL de *pool*

Tubo secundário



PLATAFORMA NAT HIV/HCV



TEMPO ESTIMADO DA ROTINA: aproximadamente 8h



LABORATÓRIO NAT

PREPARAÇÃO DO POOLING



LABORATÓRIO NAT

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO



LABORATÓRIO NAT

FREEZER A -80° E -30°C



LABORATÓRIO NAT

DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO



DIFICULDADES ENCONTRADAS



LABORATÓRIO NAT

Dificuldades encontradas na fase de implantação do NAT

- Instalação de somente uma plataforma;
- Conciliar horário de rotinas com coleta de Buffy-coat;
- Horário de funcionamento da Bio-Manguinhos até às 19h;
- Leitura dos códigos de barras das amostras;
- Demora na reposição de etanol (empréstimo);
- Falta da micro-centrífuga (spin feito manualmente);
- Rotinas Inválidas.



COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

- Homogeneização após a coleta (6-8 vezes);
- Centrifugação em até 8h após a coleta (2.700 rpm por 10min);
- Verificação da separação correta do plasma pelo gel;
- Acondicionamento entre 2°e 8°C;
- Centrifugação das amostras de coletas externas, provenientes de qualquer localidade, no ato da chegada ao Hemocentro regional.



ETIQUETAGEM DOS TUBOS



Foto esquemática da etiquetagem ideal.



NÃO CONFORMIDADES – ETIQUETAS HEMOCE

NÃO CONFORMIDADES	2012	%	2013	%
ALTAS	7.597	14,43	6.242	18,37
DESALINHADAS	659	1,25	686	2,02
CORTADAS	943	1,79	32	0,09

	2012	2013
TOTAL DE AMOSTRAS	52.652	33.981



NÃO CONFORMIDADES – AMOSTRAS HEMOCE

NÃO CONFORMIDADES	2012	%	2013	%
LIPÊMICAS	397	0,75	627	1,85
HEMOLISADAS	115	0,22	70	0,21

	2012	2013
TOTAL DE AMOSTRAS	52.652	33.981



MELHORIAS NO KIT NAT HIV/HCV HEMOCE

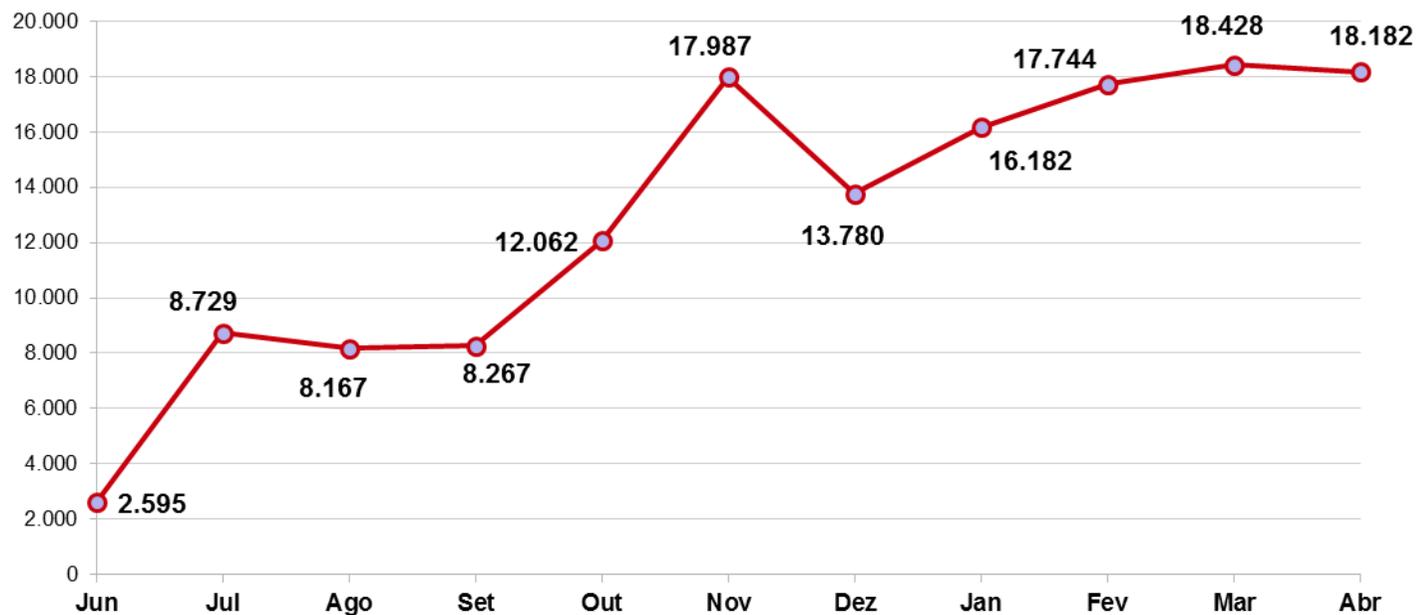
- Incorporação de iniciador reverso adicional;
- Melhora na cinética de amplificação para as amostras positivas;
- Limite de detecção do kit NAT HIV/HCV DE 5.000UI/mL para 300UI/mL para o vírus do HIV e HCV;
- Ajuste da reação de amplificação e detecção para 50 ciclos;
- Diminuição da ocorrência de perfis de background;
- Diminuição do tempo de processamento total do KIT NAT HIV/HCV em 25min.



LABORATÓRIO NAT

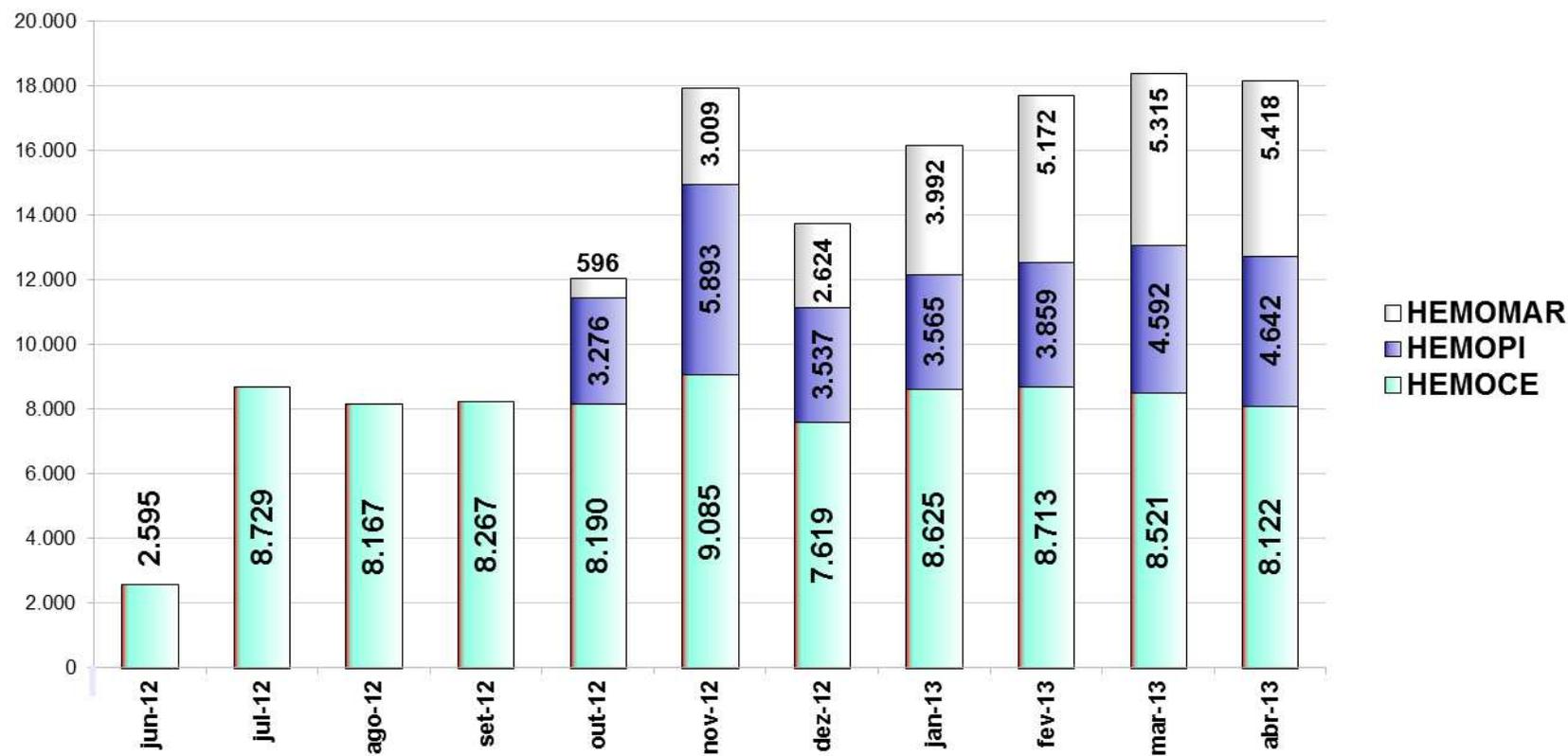
TESTES NAT REALIZADOS NO HEMOCE

Quantidade total de amostras analisadas por mês, no período de Junho de 2012 a Abril de 2013



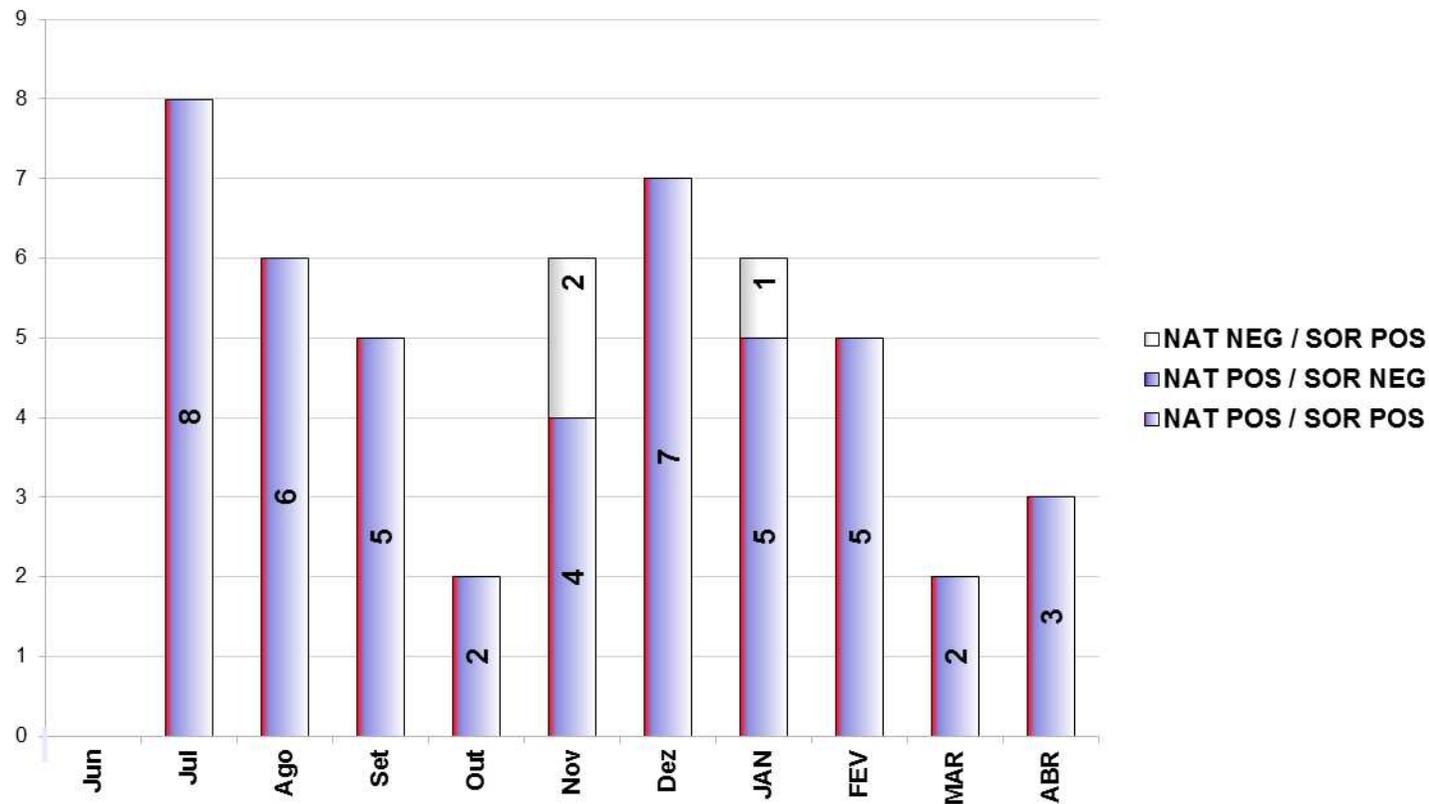
LABORATÓRIO NAT

Quantidade de amostras realizadas entre os meses de Junho de 2012 a Abril de 2013



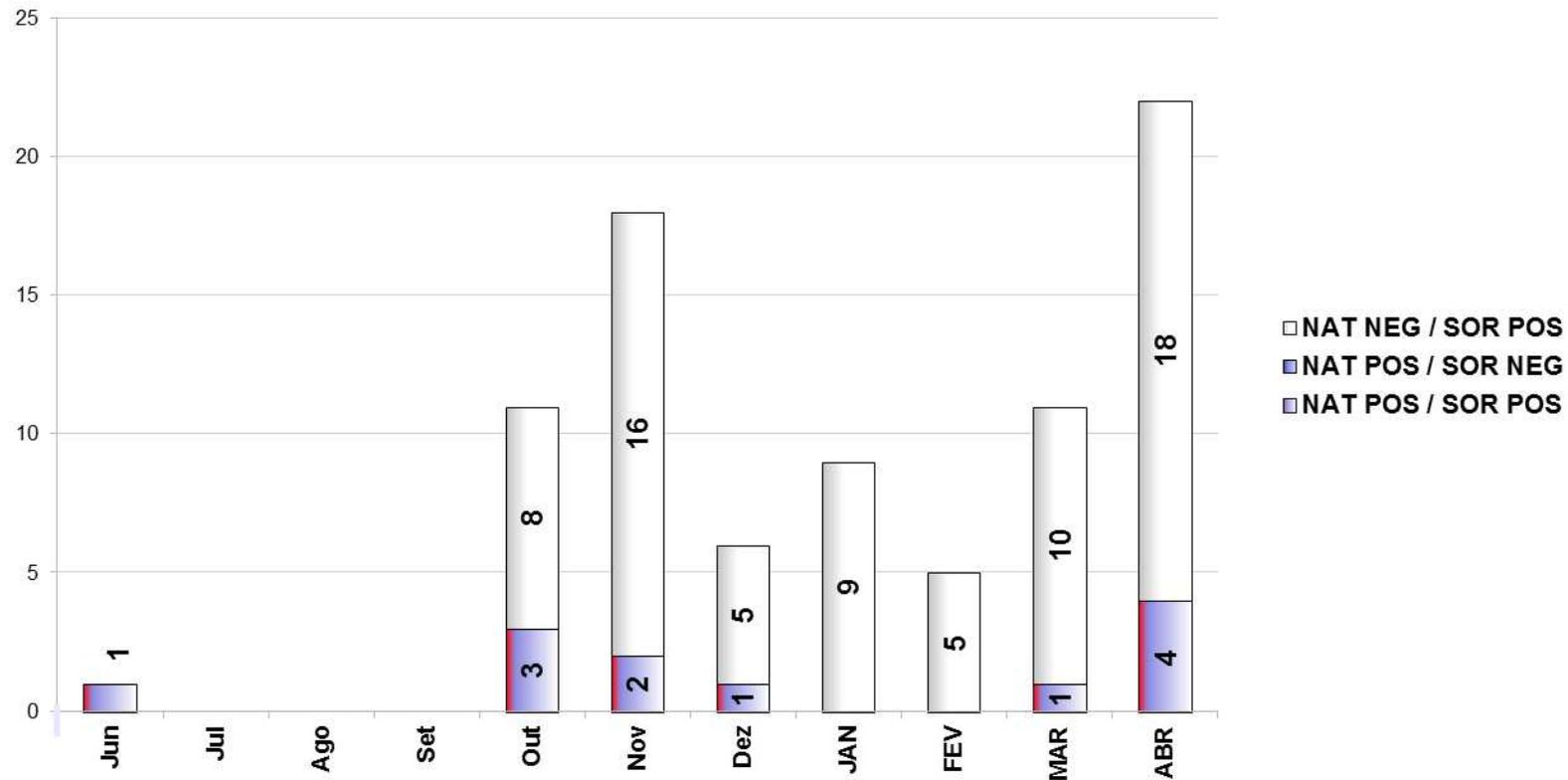
LABORATÓRIO NAT

Correlação entre os resultados de Sorologia e NAT para **HIV**, do HEMOCE, entre os meses de Junho de 2012 a Abril de 2013



LABORATÓRIO NAT

Correlação entre os resultados de Sorologia e NAT para **HCV**, do HEMOCE, entre os meses de Junho de 2012 a Abril de 2013



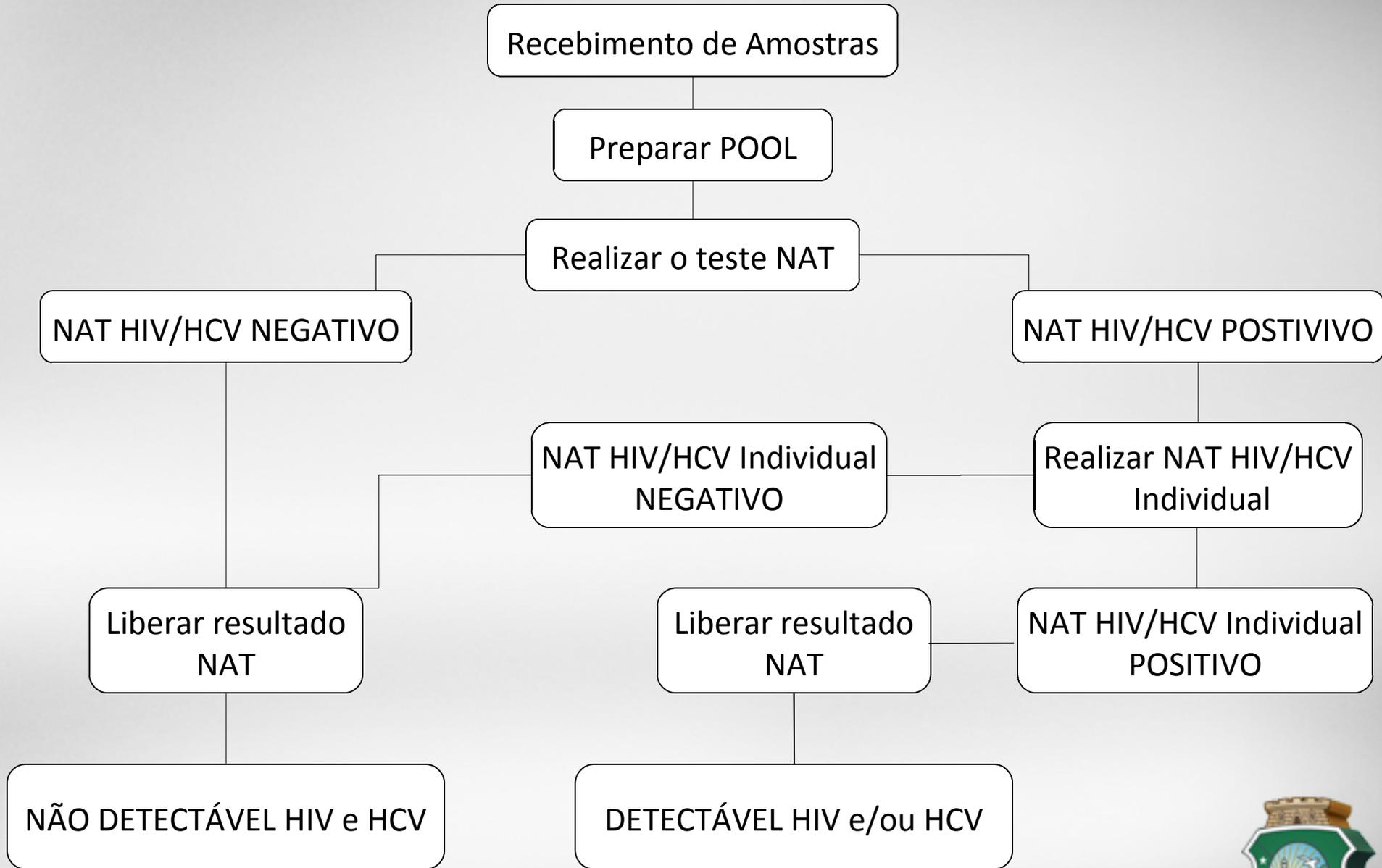
CORRELAÇÃO NAT x SOROLOGIA (HEMOCE)

HIV	JAN	FEV	MAR	ABR
NAT NEG / SOR IND	15	12	18	8
NAT POS / SOR IND	0	0	0	0

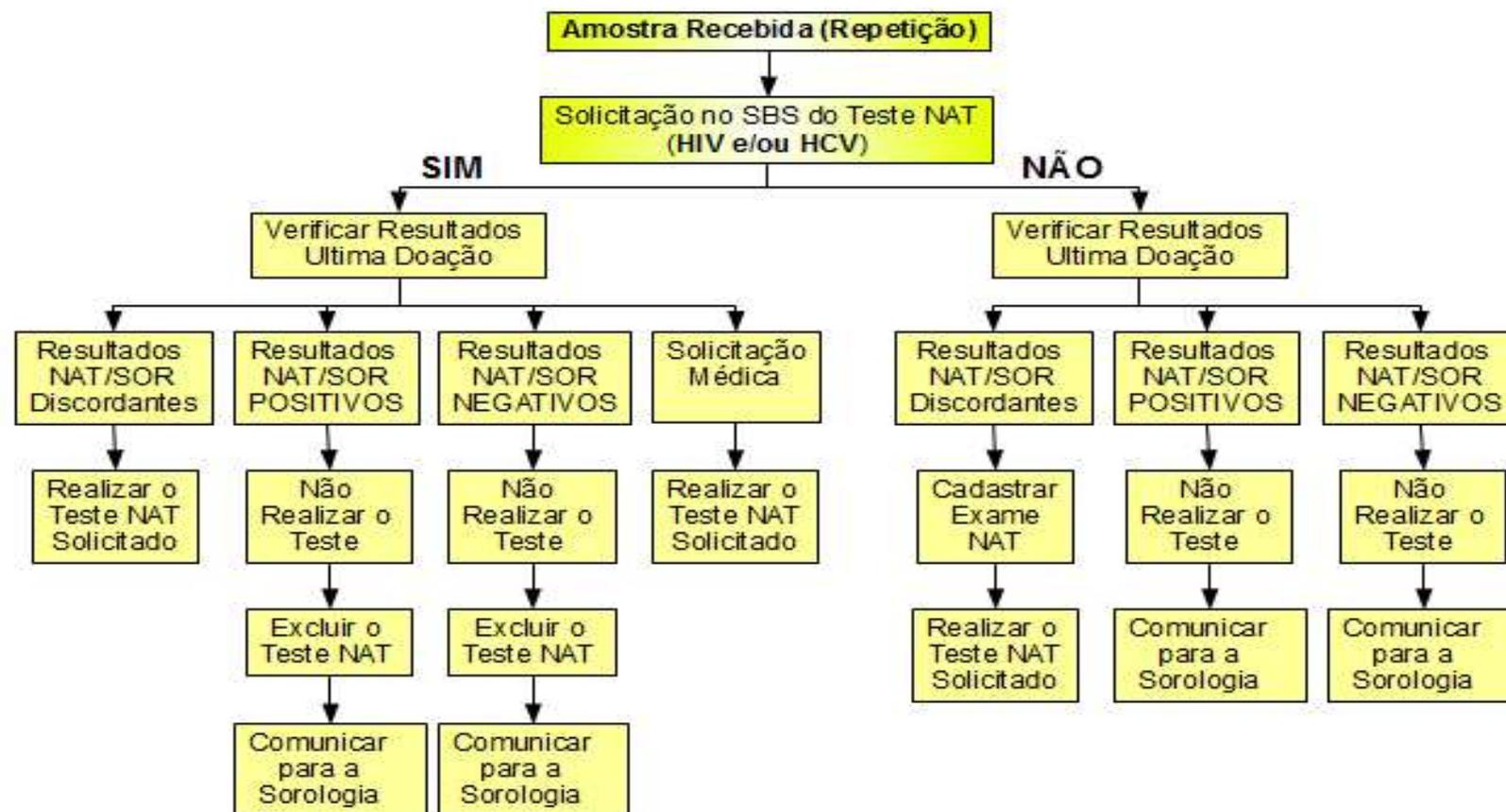
HCV	JAN	FEV	MAR	ABR
NAT NEG / SOR IND	22	14	19	33
NAT POS / SOR IND	0	0	0	0



FLUXOGRAMA DE LIBERAÇÃO DE RESULTADOS



FLUXOGRAMA DE REPETIÇÃO DE DOADORES





Obrigado!

