

**FERNANDO VALADARES BASQUES**

**AVALIAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DA TRIAGEM  
SOROLÓGICA PARA HEPATITE C ATRAVÉS DA  
PESQUISA SIMULTÂNEA DE ANTÍGENO E  
ANTICORPO NA ROTINA DE UM BANCO DE SANGUE**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Área de Concentração: Patologia Clínica**

**Nível: Mestrado**

**Faculdade de Medicina**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

Belo Horizonte

**MAIO, 2013**

Basques, Fernando Valadares.  
B316a Avaliação da implementação da triagem sorológica para Hepatite C através da pesquisa simultânea de antígeno e anticorpo na rotina de um banco de sangue [manuscrito]. / Fernando Valadares Basques. -- Belo Horizonte: 2013.

73f.: il.

Orientador: Suzane Pretti Figueiredo Neves.

Coorientador: Silvana Maria Elói Santos.

Área de concentração: Patologia.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hepatite C. 2. Hepacivirus. 3. Transfusão de Sangue. 4. Sorologia. 5. Antígenos. 6. Anticorpos. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Neves, Suzane Pretti Figueiredo. II. Santos, Silvana Maria Elói. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 536

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640  
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FERNANDO VALADARES BASQUES, nº de registro 2011655824. Às quatorze horas e trinta minutos do dia 05 de maio de dois mil e treze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "AVALIAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DA TRIAGEM SOROLÓGICA PARA HEPATITE C ATRAVÉS DA PESQUISA SIMULTÂNEA DE ANTÍGENO E ANTICORPO NA ROTINA DE UM BANCO DE SANGUE", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Investigativa. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>A</u>
Profa. Silvana Maria Elói Santos/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>A</u>
Prof. Pedro Guatimosim Vidigal	Instituição: UFMG	Indicação: <u>A</u>
Profa. Marina Lobato Martins	Instituição: Fundação Hemominas	Indicação: <u>A</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de maio de 2013.

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves Suzane Pretti Figueiredo Neves

Profa. Silvana Maria Elói Santos Silvana Maria Elói Santos

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal Pedro Guatimosim Vidigal

Dra. Marina Lobato Martins Marina Lobato Martins

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) Rosa Maria Esteves Arantes

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina - UFMG

Marques  
Marques Martins de Macedo  
Secretário do Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Suzane Pretti Figueiredo Neves, Silvana Maria Elói Santos, Pedro Guatimosim Vidigal e Marina Lobato Martins aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DA TRIAGEM SOROLÓGICA PARA HEPATITE C ATRAVÉS DA PESQUISA SIMULTÂNEA DE ANTÍGENO E ANTICORPO NA ROTINA DE UM BANCO DE SANGUE”**, apresentada pelo mestrando **FERNANDO VALADARES BASQUES**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Investigativa, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 06 de maio de 2013.

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves  
Orientadora

Profa. Silvana Maria Elói Santos  
Coorientadora

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Profa. Marina Lobato Martins

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **Reitor**

Prof. Clélio Campolina Diniz

## **Vice-Reitora**

Profa. Rocksane de Carvalho Norton

## **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Ricardo Santiago Gomez

## **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Renato de Lima Santos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Francisco José Penna

### **Vice-Diretor**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **Coordenador do Centro de Pós-Graduação**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

# CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

## **Coordenadora**

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

## **Subcoordenador**

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

## **Membros do colegiado**

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Prof. Geraldo Brasileiro Filho

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

Conrado de Oliveira Gamba (representação discente)

## **VIKING LAWS**

### **1. BE BRAVE AND AGGRESSIVE**

- Be direct
- Grab all opportunities
- Use varying methods of attack
- Be versatile and agile
- Attack one target at time
- Use top quality weapons

### **2. BE PREPARED**

- Keep weapons in good conditions
- Keep in shape
- Find good battle comrades
- Agree on important points
- Choose one Chief

### **3. BE GOOD MERCHANT**

- Find out what the market needs
- Don't promise what you can't keep
- Don't demand overpayment
- Arrange things so that you can return

### **4. KEEP THE CAMP IN ORDER**

- Keep things tidy and organized
- Arrange enjoyable activities which strengthen the group
- Make sure everybody does useful work
- Consult all members of the group for advice

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, exemplo e sabedoria

Às minhas irmãs, fraternidade acima de tudo

Aos meus amigos, companheirismo

Às minhas orientadoras Suzane e Silvana

Ao amigo Rosivaldo Evaristo de Souza

Às amigas Sônia, Luciana, Iara e Milena

Aos Mestres de toda vida

A Junia Guimarães Mourão Cioffi

À Dra. Anna Barbara Proietti

À Professora Rosa Maria Esteves Arantes

Às empresas Abbott Laboratórios do Brasil e REM Indústria e Comércio.

## AGRADECIMENTO MAIS QUE ESPECIAL

Sentimentos podem ser substantivos, pessoas podem precisar de adjetivos, ações podem ter advérbios, olhares podem ser conjugados, a vida pede sintaxe, eu resumo tudo em você.

Para Sandra com todo meu amor.

# SUMÁRIO

TABELAS .....	XI
FIGURAS E GRÁFICOS .....	XII
LISTAS DE ABREVIATURA .....	XIII
RESUMO .....	XV
ABSTRACT .....	XVI
I - INTRODUÇÃO .....	1
II – Revisão Bibliográfica .....	3
II.1. Epidemiologia da Hepatite C.....	3
II.2. O Vírus da Hepatite C.....	7
II.3. Quadro clínico da Hepatite C .....	9
II.4. Hepatite C pós transfusional .....	10
II.5. Diagnóstico laboratorial da Hepatite C .....	11
III. OBJETIVOS .....	20
III.1 Objetivo geral .....	20
III.2 Objetivos específicos.....	20
IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
IV.1 Características da Amostra.....	21
IV.2 Descrição do Estudo .....	21
IV.3 Critérios de Inclusão .....	24
IV.4 Critérios de Exclusão .....	25
IV.5 Análise Estatística .....	25

IV.6 - Teste de triagem Combinado para Hepatite C – HCV Ag-Ab.....	26
IV.7 - Teste para Detecção de Anticorpos anti-HCV – HCV-Ab .....	27
IV.8 - Teste para Detecção de Antígeno do HCV – HCV-Ag.....	28
IV.9 – ImunoBlot para o HCV–RIBA 3.0 HCV .....	29
V. RESULTADOS .....	31
V.1 - 1ª amostra .....	31
V.2 - 2ª amostra .....	35
VI.DISSCUSSÃO .....	45
VI.CONCLUSÃO .....	58
VII.BIBLIOGRAFIA .....	59
VII. ARTIGO CIENTÍFICO – ENVIADO .....	65

## TABELAS

Tabela IV.1.....	24
Tabela V.1.....	31
Tabela V.2.....	32
Tabela V.3.....	33
Tabela V.4.....	36
Tabela V.5.....	39
Tabela V.6.....	41
Tabela V.7.....	42
Tabela V.8.....	43

## FIGURAS E GRÁFICOS

Figura II.1.....	6
Figura II.2.....	8
Figura II.3.....	15
Figura II.4.....	16
Figura II.5.....	17
Figura II.6.....	18
Figura IV.1.....	23
Figura VI.1.....	57
Gráfico II.1.....	4
Gráfico V.1.....	34
Gráfico V.2.....	35
Gráfico V.3.....	44

## LISTAS DE ABREVIATURA

Anti-HBc	Anticorpo contra o <i>Core</i> do Vírus da Hepatite B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CHH	Carcinoma Hepatocelular
DO/CO	Densidade Ótica/Ponto de Corte ( <i>Cutoff</i> )
HAV	Vírus da Hepatite A
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HNANB	Hepatite Não A-Não B
HPT	Hepatite Pós Transfusional
HVC-Ab	Vírus da Hepatite C - Anticorpo
HVC-Ag	Vírus da Hepatite C - Antígeno
HVC Ag-Ab	Vírus da Hepatite C - Antígeno e Anticorpo
IC	Intervalo de Confiança
IND	Indeterminado
mL	Mililitro
MP-NAT	NAT em <i>mini-pool</i>
NAT	Teste de Ácido Nucléico
NEG	Negativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

POS	Positivo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIBA	<i>Recombinant Immuno Blot Assay</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
UI	Unidade Internacional
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Hepatite C é considerada uma pandemia, mais de 170 milhões de pessoas estão infectadas pelo Vírus da Hepatite C. O HCV é a principal causa de hepatite crônica e Hepatite pós-transfusional (HPT). O risco de HPT tem se reduzido drasticamente nos últimos anos, conseqüente à utilização de técnicas cada vez mais sensíveis de triagem laboratorial e aos critérios altamente padronizados de seleção de doadores. A introdução de testes combinados antígeno e anticorpo para a triagem de doadores de sangue foi proposta para reduzir o risco de transmissão do HCV em situações em que a utilização do método considerado padrão ouro, biologia molecular, é inviável, quer seja por condições financeiras ou dificuldades técnicas.

**OBJETIVO:** Avaliar o desempenho do teste combinado HCV Ag-Ab na triagem sorológica de doadores de sangue quando comparado ao imunoensaio para anticorpos de 3ª geração.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram testados 263.581 doadores voluntários de sangue da Fundação Hemominas utilizando um imunoensaio combinado HCV Ag-Ab. Todos os doadores reativos/indeterminados foram também testados com um teste para detecção de anticorpo e outro para detecção de antígeno. Os doadores reativos/indeterminados foram convocados para coleta de 2ª amostra para confirmação do resultado. através de um imunoblot.

**RESULTADOS:** Após a triagem inicial de 263.581 doadores com um teste capaz de detectar a presença de antígeno e anticorpos do HCV, 341 ( $129/10^5$ ) doadores foram classificados como reativos/indeterminados. Entre os 341 doadores, 42 (12,3%) apresentaram resultados reativos/indeterminados nos dois testes complementares, HCV-Ab (somente anticorpo) e HCV-Ag (somente antígeno), 79 (23,2%) apresentaram pelo menos um dos testes complementares reativos/indeterminados. Duzentos e sessenta e dois doadores (76,8%) apresentaram resultados não-reativos para ambos os testes complementares. Um doador ( $3,8/10^6$ ) estava no período de janela para detecção de anticorpo. A relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab foi capaz de separar os resultados reativos de acordo com a presença de anticorpos e ou antígeno e também de identificar os resultados falso positivos no teste de triagem.

**CONCLUSÕES:** A introdução do teste de triagem HCV Ag-Ab foi capaz de detectar mais amostras positivas em relação ao teste de 3ª geração. Com base nos resultados do estudo, um novo algoritmo para triagem de doadores na Fundação Hemominas foi proposto.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Hepatitis C is considered a pandemic, more than 170 million people are infected with Hepatitis C. HCV is the main cause of chronic hepatitis and post-transfusion hepatitis (PTH). The risk of HPT has declined dramatically in recent years, consequent to the use more sensitive laboratory screening methods and highly standardized blood donor selection criteria. The introduction of antigen and antibody combo test for screening blood donors has been proposed to reduce the risk of transmission of HCV in situations in which the use of a gold standard method, molecular biology, is not feasible, whether by financial or technical issues.

**OBJECTIVE:** To evaluate the performance of the HCV Antigen and Antibody assay (HCV Ag-Ab) for serological screening of blood donors when compared to a third generation HCV antibody immunoassay (HCV-Ab).

**MATERIALS AND METHODS:** We tested 263,581 voluntary blood donors from Hemominas Foundation with a combo immunoassay HCV Ag-Ab. All reactive/indeterminate donors were also tested with an antibody (HCV-Ab) only and an antigen only (HCV-Ag) assay. Donors reactive/indeterminate were called to collect a second sample to confirm the results with immunoblot assay

**RESULTS:** After initial screening of 263,581 donors with HCV (HCV Ag-Ab), 341 (129/10<sup>5</sup>) were classified as reactive/indeterminate. Among the 341 donors, 42 (12.3%) were reactive/indefinite two additional tests, HCV-Ab (antibody only) and HCV-Ag (antigen only), 79 (23.2%) had at least one complementary reactive/indeterminate result. Two hundred and sixty-two donors (76.8%) were non-reactive for both additional tests. One donor (3.8/10<sup>6</sup>), who was in window period for HCV antibody, had both HCV Ag-Ab and HCV-Ag reactive results, and a nonreactive HCV-Ab. The HCV Ag-Ab ratio S/CO was able to separate the results according reactive antibodies or antigen and also to identify false positive results in the screening test.

**CONCLUSIONS:** The screening test HCV Ag-Ab was able to detect more positive samples than the third generation assay. Based on the study results, a new algorithm for donor screening in Hemominas Foundation has been proposed.

## I - INTRODUÇÃO

A Hepatite C é considerada uma pandemia. Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 170 milhões de pessoas estão infectadas pelo Vírus da Hepatite C (HCV).

(1) A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) estima que, no Brasil, 0,94 a 1,89% da população é portadora de anticorpos anti-HCV. (2) E, de acordo com os dados do DATASUS, aproximadamente 11.000 novos casos de Hepatite C foram diagnosticados no Brasil em 2010. (3) Nos Estados Unidos, Japão e Itália, a prevalência pode chegar a 2,2%. (4)

Até o final dos anos 60, apenas dois agentes etiológicos das hepatites virais eram conhecidos: o vírus A (HAV) e o vírus B (HBV). (5) Na ausência de diagnóstico laboratorial específico disponível, os casos eram identificados pelos sintomas clínicos, tempo de incubação e forma de contágio. A padronização de testes específicos para as Hepatites A e B também permitiu definir um novo tipo de hepatite pós transfusional, a Hepatite não-A não-B (HNANB). Quinze anos mais tarde, a identificação do HCV e o desenvolvimento de um teste sorológico específico confirmaram que os pacientes então classificados como portadores de HNANB tinham, na realidade, Hepatite C. (6)

Os principais fatores associados à infecção pelo HCV são o uso de drogas injetáveis e a transfusão de hemocomponentes e

hemoderivados. Aproximadamente 85% dos pacientes infectados evoluem para doença crônica e, após 30 anos de doença, 20% dos pacientes evoluem para fibrose e cirrose. Destes últimos, 20% evoluirão para o carcinoma hepatocelular. (7)

Conhecer o risco de transmissão de doenças através da transfusão de hemocomponentes e hemoderivados é uma importante ferramenta para monitorar a segurança transfusional. (8) O risco residual para a transmissão da Hepatite C e de outras doenças infecciosas, definido como aquele que ainda permanece após a instituição de todas as medidas preventivas possíveis, depende diretamente: da prevalência da doença na população doadora, do período de janela imunológica, da carga de patógeno presente no componente infundido e da sensibilidade dos métodos utilizados no rastreamento das doenças infecciosas pelo banco de sangue. Desta forma, a utilização de testes com elevada sensibilidade pode reduzi-lo consideravelmente. (9)

A necessidade de avaliar os benefícios de uma técnica mais sensível para a triagem de doadores de sangue para a Hepatite C na Fundação Hemominas motivou a realização do presente estudo.

## II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1. EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

A Hepatite C é a causa mais comum de hepatite pós transfusional (HPT) e também a doença hepática crônica mais prevalente no mundo. (1) Estima-se que mais de 170 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas com o HCV e que de 3 a 4 milhões (10) adquirem a infecção anualmente. A prevalência global pode chegar a 2,35% da população. (11)

A OPAS estima que, no Brasil, 0,94 a 1,89% da população é portadora de anticorpos anti-HCV. (2) Segundo Kershenobich e colaboradores, a prevalência de Hepatite C na população brasileira é de 1,5% e, analisando apenas a população adulta, esta taxa pode chegar a 2,5%. (12) De acordo com o DATASUS, entre 2001 e 2010 foram registrados mais de 110.000 casos novos de Hepatite C no Brasil. A média de casos foi crescente até 2005 e, em 2010, foram registrados 11.448 casos novos, (3) conforme mostrado no Gráfico II.1. A maior parte dos indivíduos infectados (90%) está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para São Paulo e Rio Grande do Sul, com 56,9% (46,6 mil) e 13% (10,6 mil) dos casos, respectivamente. (13) Além disso, os indivíduos afetados são, em sua maioria, homens com mais de 20 anos. (14) Segundo Focaccia e colaboradores, a prevalência de Hepatite C na população de São

Paulo, em 2002, era de 1,42%, com idade média de 46 anos e maior frequência no sexo masculino (62%). (15) Um estudo de Rodrigues Neto e colaboradores em São José dos Pinhais, Paraná, demonstrou uma prevalência de 0,30% (95% IC 0,12-0,40%). (16) Pereira e colaboradores, em uma análise de indivíduos de 10 a 69 anos conduzida nas cinco macro regiões do Brasil, de 2005 a 2009, encontraram uma prevalência de 1,38% ajustada por idade e região. (17)

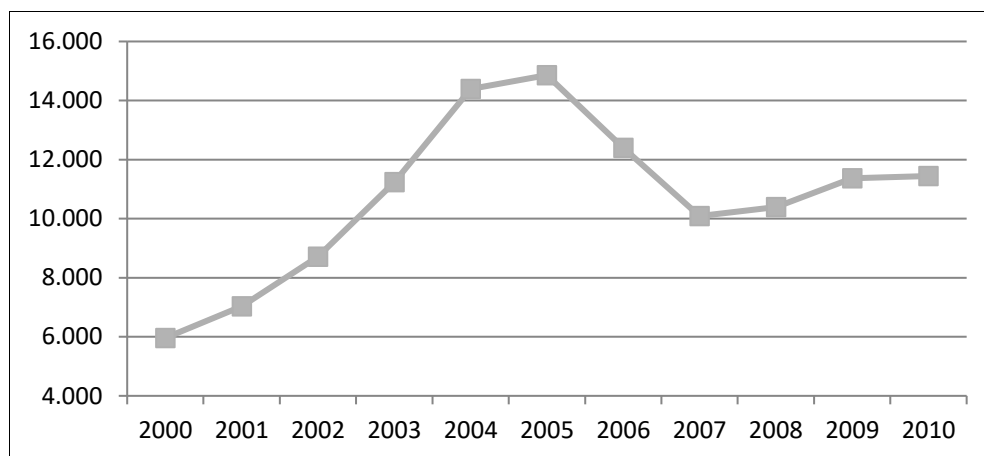


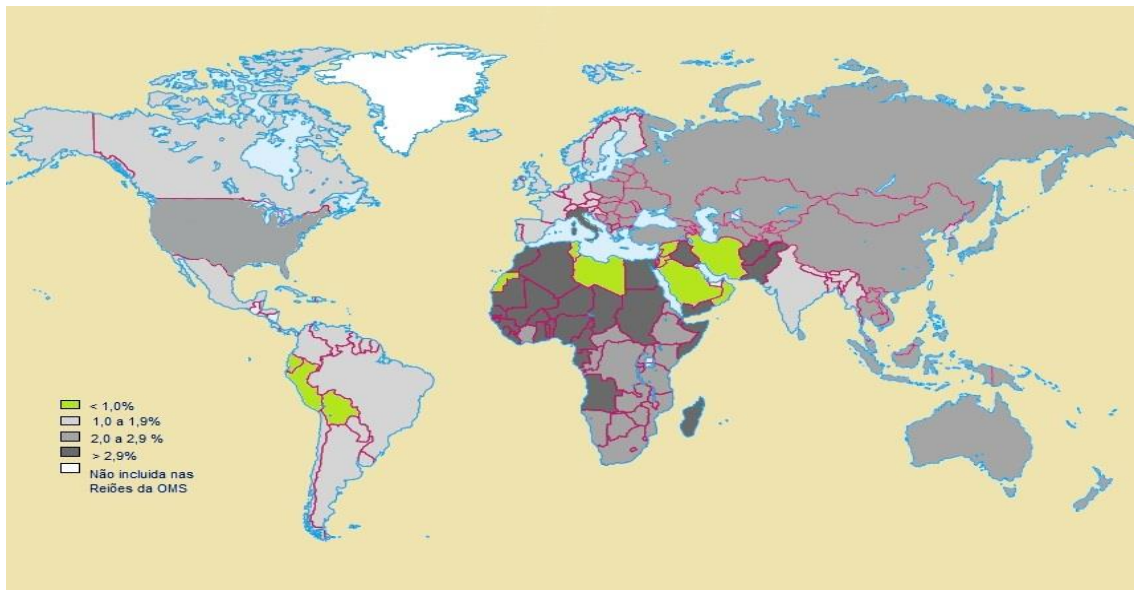
Gráfico II.1 - Incidência de Hepatite C entre 2000 e 2010, segundo o DATASUS.(3)

Segundo a OMS, 3 a 4 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo HCV anualmente, e mais de 350 mil morrem com doenças relacionadas à infecção no mesmo período.(18) Os países com as maiores prevalências da doença são Egito (15%), Paquistão (4,8%) e China (3,2%). Nos países desenvolvidos, a prevalência da doença varia muito (Figura II.1). Alemanha, Canadá, França e Austrália apresentam baixas prevalências da doença, com taxas que variam de 0,6 a 1,1%.(1,19) Nos Estados Unidos e Japão, a

prevalência pode chegar a 2,2%.<sup>(4)</sup> Segundo Ciccozzi, a prevalência na Itália é de 3-4,4%, podendo chegar até 26% na região sudeste e nas Grandes Ilhas. A Itália é o país europeu com maior prevalência de Hepatite C.<sup>(20)</sup>

A transmissão da Hepatite C ocorre através do contato com o sangue contaminado. A transfusão de hemocomponentes e hemoderivados e os transplantes de órgãos sólidos, antes da década de 90, eram as principais causas de transmissão do vírus C na população.<sup>(21)</sup>

Em países desenvolvidos, atualmente, a principal forma de transmissão da Hepatite C é o compartilhamento de seringas e agulhas entre usuários de drogas endovenosas. A prevalência da infecção pelo HCV nesse grupo pode chegar a 94% após 6 anos de drogadição.<sup>(1)</sup> Até 90% dos usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos são soro-positivos para o HCV <sup>(22)</sup> e, na China, essa prevalência é de 61,4% (95% IC 55,7-67,2%).<sup>(23)</sup>



**Figura II.1 – Estimativa da prevalência de infecção pelo Vírus da Hepatite C, segundo a Organização Mundial da Saúde. Adaptado de Shepard, 2005 (1)**

Nos países em desenvolvimento, a falha em utilizar sistematicamente métodos seguros para a prevenção da infecção em ambientes hospitalares, como o uso de materiais descartáveis e técnicas seguras de esterilização de equipamentos médicos, são as principais causas de infecção pelo vírus C.(1) Acidentes com agulha contaminada também representam uma fonte de risco para a transmissão do vírus C nas equipes de saúde. Nesse contexto, a pobreza, o comportamento sexual de risco e o baixo grau de educação formal estão associados à infecção, porém não estão claras as razões destas associações.(17)

A transmissão vertical da Hepatite C é rara e está geralmente associada com outras infecções e com a diminuição da imunidade materna, principalmente secundária à infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).(24) A Hepatite C raramente é

transmitida por via sexual. Nos últimos anos a incidência de infecção por essa via aumentou significativamente, principalmente entre homossexuais masculinos portadores de HIV.(25)

## II.2. O VÍRUS DA HEPATITE C

Até meados dos anos 70, a maioria das hepatites pós-transfusionais era causada pela então denominada HNANB.(26) Somente em 1975, após a padronização de ensaios específicos para as Hepatites A e B, a HNANB teve seu agente etiológico identificado - o Vírus da Hepatite C.(27) Choo e colaboradores isolaram o vírus pela primeira vez em 1989 através da ampliação do genoma do vírus.(28)

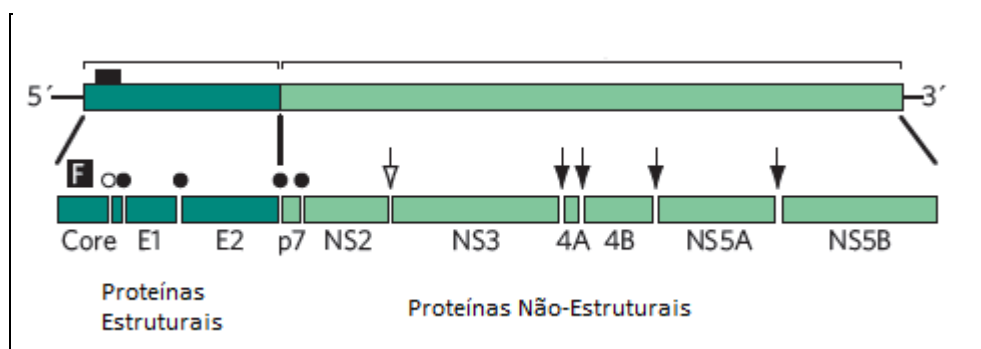
O HCV é um vírus RNA de cadeia simples pertencente à família *flaviviridae* e membro único do gênero *Hepacivirus*. Trata-se de um vírus hepatotrófico que se replica preferencialmente no citoplasma dos hepatócitos, embora existam evidências de sua replicação em linfócitos, células do epitélio da vesícula biliar e do sistema nervoso central.(29)

A porta de entrada para o vírus é o receptor CD81, uma proteína de membrana da família das tetraspaninas.(30) Outras proteínas estão envolvidas na infecção e replicação viral: a SR-BI (*human scavenger receptor BI*) e três proteínas de junção da família das claudinas. A replicação viral é extremamente rápida, mais de  $10^{12}$

de cópias do vírus podem ser formadas diariamente - 100 vezes mais do que é relatado para o HIV.(31)

O genoma do HCV codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada em 10 proteínas virais, estruturais e não estruturais (Figura II.2). O terço terminal do genoma codifica três proteínas estruturais: proteína do *core*, e glicoproteínas E1 e E2. O restante do genoma codifica as proteínas não-estruturais (NS): p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que coordenam o ciclo de vida intracelular do vírus.(29)

São reconhecidos 6 genótipos diferentes e mais de 50 subespécies do HCV. Devido à altíssima velocidade de replicação e à inexistência de um mecanismo para impedir erros de replicação, 1 a 5% dos genomas virais são mutantes.(32)



**Figura II.2: Organização esquemática do genoma do HCV e as proteínas codificadas utilizadas como alvo nos testes sorológicos para Hepatite C.**  
Adaptado de *Lindenbach*, 2005.(29)

Na população brasileira, são encontrados os genótipos 1, 2, 3, 4 e 5. Cerca de 65% dos pacientes estão infectados com o genótipo 1 e, em torno de 30%, com o 2.(13)

### II.3. QUADRO CLÍNICO DA HEPATITE C

A sintomatologia inicial da Hepatite C é leve ou inexistente na maioria dos pacientes. Portanto, raramente o diagnóstico é realizado na fase aguda, o que favorece a transmissão da doença, principalmente relacionada à transfusão.(33) Os sintomas habitualmente começam 50 a 70 dias após o contato inicial com o vírus, e até 20% dos pacientes apresentam resolução espontânea da infecção (21). Mais de 85% dos pacientes infectados com o HCV progridem para a doença crônica, estágio reconhecido como fator de risco para cirrose e carcinoma hepatocelular.(32)

Os pacientes cronicamente infectados apresentam uma carga viral que tipicamente varia entre  $10^3$  e  $10^7$  de genomas por mL de soro. Uma alta carga viral pode ser observada nas semanas iniciais da infecção, entretanto a resposta inflamatória hepática ocorre 2 a 3 meses após a infecção.(29)

A Hepatite C dura, em média, duas a quatro décadas, e diversos fatores são responsáveis por acelerar seu curso para um desfecho desfavorável, sendo o consumo de álcool e a co-infecção com o HIV e com o HBV os principais.(32)

## II.4. HEPATITE C PÓS TRANSFUSIONAL

Nas décadas de 70 e 80, o risco de HPT nos Estados Unidos era de 5 a 18%. Nos anos 80, a chance de um paciente desenvolver hepatite, usualmente HNANB, após transfusão de qualquer hemocomponente, era de 7 a 12%.<sup>(34)</sup> A prevalência e a incidência em doadores de sangue nos Estados Unidos em 2008 foram, respectivamente, de  $163,4/10^5$  e  $5,14/10^5$ .<sup>(9)</sup>

No início dos anos 2000, o risco de transmissão de Hepatite C no Brasil era de 1 para 13.721 doações.<sup>(35)</sup> Em 2007, foi observada uma prevalência global de  $191/10^5$  em doadores de 1ª vez, sendo esta taxa 30 vezes maior em adultos com mais de 55 anos quando comparada com doadores menores de 25 anos. O risco residual foi calculado em 1 para 201.000 doações, utilizando para o cálculo a janela imunológica dos testes de detecção de anticorpo, 58,3 dias.<sup>(36)</sup>

O risco de HPT tem se reduzido drasticamente nos últimos anos, o que se deve, em grande parte, à utilização de técnicas cada vez mais sensíveis e de critérios altamente padronizados de seleção e triagem de doadores. Entretanto, o risco de transmissão de infecção durante o período de janela ainda existe. Estima-se que chance de transmissão de HCV em um concentrado de hemácias contendo 1 genoma viral/20 mL de plasma é de 100%.<sup>(37)</sup>

## II.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE C

O diagnóstico laboratorial da Hepatite C pode ser dividido em duas categorias básicas: ensaios imunológicos e moleculares. Desde a padronização do primeiro teste em 1989 (19), os ensaios imunológicos enzimáticos ou quimiluminescentes para a detecção de anticorpos anti-HCV evoluíram muito no que se refere à sensibilidade e são, atualmente, a forma mais comum de diagnóstico.

Os ensaios de 1ª geração foram os primeiros a serem padronizados, no final da década de 80. Estes testes possuíam apenas uma proteína recombinante, NS4, derivada da região não estrutural do vírus.(38) A NS4 é a proteína viral que apresenta maior imunogenicidade (39) e a resposta a ela permanece mesmo quando o material genético do vírus C, HCV RNA, deixa de ser detectado.

Segundo Tokeshi e colaboradores, os ensaios de 1ª geração apresentavam sensibilidade de 71 a 85%, quando comparados com ensaios de 2ª geração, em pacientes com Hepatite C crônica. (40) Já a especificidade e o valor preditivo positivo (VPP) destes testes eram de 89% e 59%, respectivamente, conforme observado no estudo de Barrera e colaboradores. (41)

Apesar da baixa sensibilidade dos ensaios de 1ª geração, a introdução destes testes na triagem e seleção de doadores de sangue foi responsável por uma importante redução do risco de transmissão

do HCV em pacientes que receberam hemocomponentes e hemoderivados a partir dos anos 90.

Os testes de 2ª geração incorporaram antígenos recombinantes do *core* e a proteína NS3 ao antígeno NS4, levando a uma melhora significativa na sensibilidade (92-95%) bem como na especificidade. Estes ensaios eram capazes de detectar mais indivíduos positivos, tanto em populações de baixa como de alta prevalência de infecção pelo HCV.(42) A janela imunológica, estimada em 16 semanas para os testes de 1ª geração, foi reduzida para 10 semanas, (43,44) o que possibilitou outra grande redução da incidência da HPT. O estudo de Huang e colaboradores demonstrou que apesar dos testes de 2ª geração terem reduzido significativamente a transmissão do HCV por via transfusional ela ainda ocorria e que estes testes ainda deveriam melhorar a sensibilidade de detecção do vírus para erradicar a HPT.(45)

O primeiro ensaio de 3ª geração para a detecção de anticorpos anti-HCV foi licenciado em 1996.(46) A esse teste foi adicionada mais uma proteína não estrutural do HCV, a NS5. Esta proteína foi responsável por um aumento significativo na sensibilidade e na especificidade do teste. A presença de proteínas recombinantes e antígenos sintéticos conferem maior especificidade aos testes de 3ª geração. (47) (Figura II-3)

No estudo de Tobler e colaboradores, 761 entre 292,549 doadores (260/10<sup>5</sup>) de hemocentros norte americanos foram inicialmente reativos na 1ª testagem e, destes, quinhentos e um (66%) tiveram os resultados confirmados através do teste confirmatório RIBA 3.0. Dentre os 501 resultados verdadeiramente positivos utilizando testes de 3ª geração, 15 (3,0%) tiveram resultados negativos em testes de 2ª geração para o HCV.(48)

Shrama e colaboradores estudaram o impacto da introdução de testes mais sensíveis para triagem sorológica de doadores sangue e demonstraram que os testes de 2ª geração para detecção de anticorpos anti-HCV detectava mais amostras reativas que os testes de 1ª geração. Após a implementação dos testes de 3ª geração em 1996, houve aumento na prevalência de testes verdadeiramente positivos, confirmados através do RIBA 3.0. Este aumento, no entanto, não foi significativo. Também foi demonstrada uma redução significativa de testes indeterminados em doadores de 1ª vez.(49)

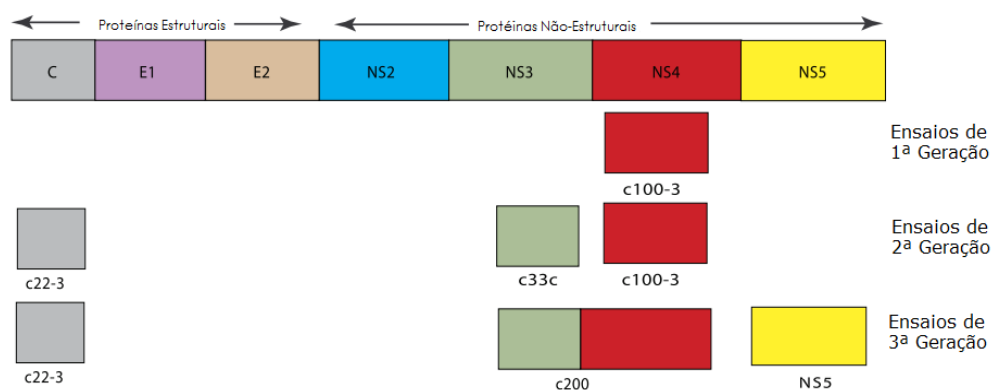
Vrieling e colaboradores compararam a performance das três gerações de ensaios para HCV em doadores de sangue. Aproximadamente 100.000 doadores foram testados com um teste de 1ª geração, 170.000 utilizando o de 2ª geração e 262.000 doadores através do teste de 3ª geração. Também foram testados pacientes com infecção aguda pelo HCV. Duzentos e quarenta doadores foram inicialmente reativos com teste de 1ª geração, somente 8% se

confirmaram verdadeiramente reativos. Entre os doadores testados com ensaio de 2ª geração 22 (10%) entre 214 inicialmente reativos confirmaram resultado verdadeiramente reativo. Entre os 262.000 doadores triados através do teste de 3ª geração 387 (0,1%) foram classificados como inicialmente reativos. Destes, 18 (5%) tiveram os resultados confirmados através do RIBA 3.0. A especificidade calculada para os três métodos foi 99,8%, 99,7% e 99,7% respectivamente para os ensaios de 1ª geração, 2ª geração e 3ª geração. O teste de 1ª geração foi capaz de detectar 7 pacientes em fase de soroconversão, 23 semanas após a transfusão. Os testes de 2ª geração e 3ª geração foram capazes de detectar 9 pacientes nesta mesma condição. A soroconversão foi detectada pelo teste de 3ª geração em média 8 semanas após a transfusão enquanto nos testes de 1ª geração e 2ª geração ela ocorreu 19 e 14 semanas, respectivamente, após a transfusão.(50)

Outros estudos também demonstraram que os testes de 3ª geração eram capazes de detectar mais amostras reativas quando comparados aos testes de 2ª geração. O aumento da sensibilidade foi demonstrado tanto para doadores de sangue como para pacientes de hemodiálise. (51-53)

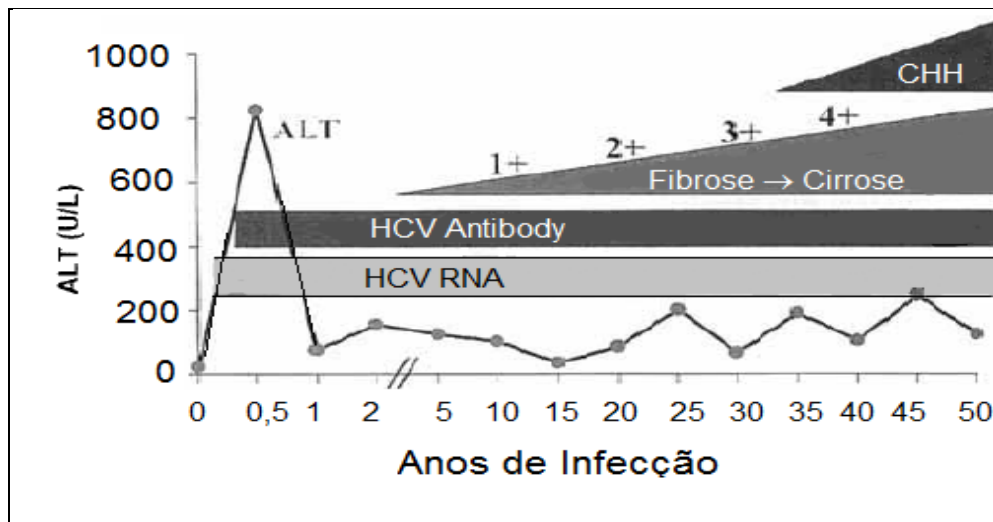
Stramer e colaboradores avaliaram a introdução do teste NAT em bancos de sangue norte americanos durante 3 anos (1999 e 2002) estudado mais de 37 milhões de doações de sangue. Quando

testes de 2ª geração e 3ª geração para detecção do HCV foram comparados ficou demonstrado que os testes de 3ª geração eram capazes de detectar mais amostras reativas. De 156 doações HCV NAT reativas, 17 eram negativas no teste de 2ª geração e teriam sido detectadas se um teste de 3ª geração tivesse sido utilizado. (54)



**Figura II.3 – Organização genômica e antígenos licenciados para o diagnóstico da Hepatite C.**

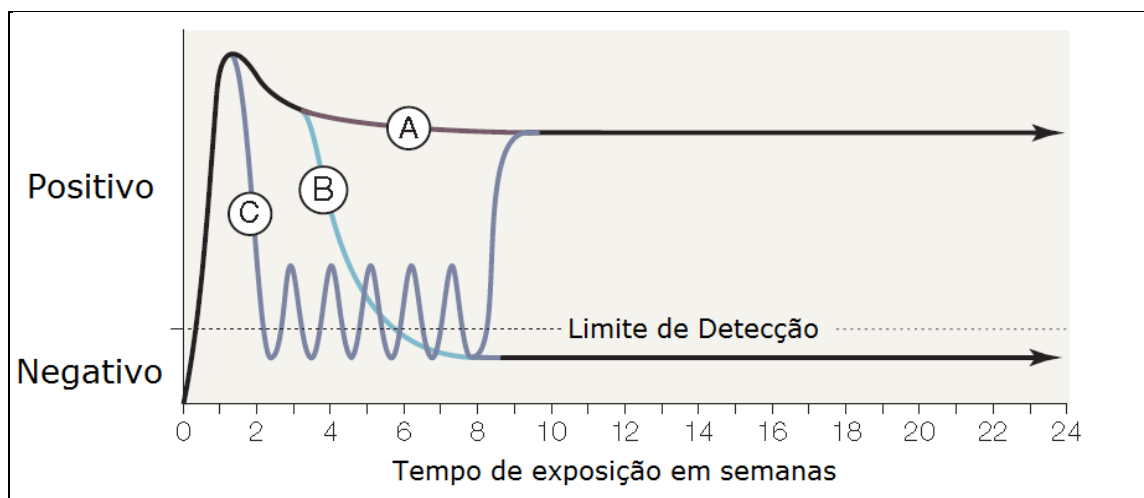
Os testes para detecção de RNA, genericamente conhecidos como NAT (Testes de Ácido Nucléico – *Nucleic Acid-based Tests*), se tornaram padrão para a triagem de doadores de sangue em países desenvolvidos desde o início dos anos 2000 (55-57) O HCV-RNA é sempre o primeiro marcador da infecção, seguido pelo aparecimento dos anticorpos anti-HCV, após um período de incubação que varia de acordo com o método utilizado (Figura II.4). Ocasionalmente, após a infecção aguda, pode ocorrer o desaparecimento do HCV-RNA, levando à resolução do quadro. (58)



**Figura II.4 – História natural da Hepatite C crônica após 50 anos de evolução.**  
 Adaptado de Hoofnagle, 2002. (32)  
**HCV Antibody:** Anticorpo anti-HCV; **CHH:** Carcinoma Hepatocelular

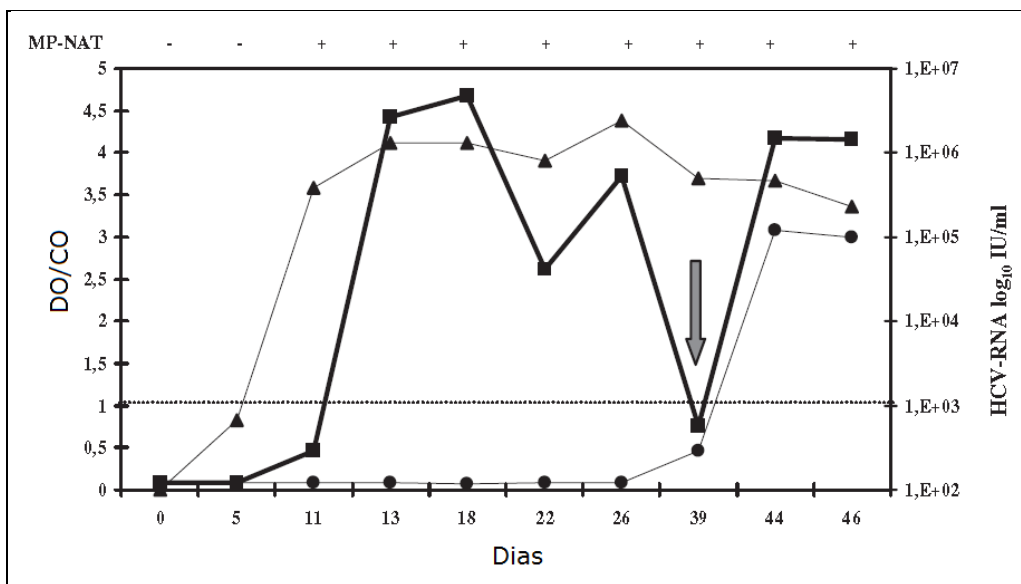
O NAT para o HCV (NAT HCV) é realizado em *pool* de amostras e é sempre realizado em conjunto com um teste para detecção de anticorpos. Após três anos de implementação do NAT HCV e HIV nos Estados Unidos, quando foram triados aproximadamente 40 milhões de doadores de sangue, 170 doações foram positivas no NAT e negativas na pesquisa de anticorpos anti-HCV. O risco residual para a infecção pelo HCV, quando utilizados apenas testes para detecção de anticorpos, era de 1 para 230.000 doações. A introdução dos testes de 3ª geração em substituição aos de 2ª geração, durante os três anos do estudo e utilizado nos diversos serviços de hemoterapia teria reduzido esse risco para 1 para 270.000 doações. Já a utilização da triagem molecular para a Hepatite C em doadores de sangue reduziu o risco residual para menos de 1 em 2 milhões de doações.(54)

O NAT HCV inclui testes qualitativos que apresentam limite de detecção muito baixo,  $< 50$  UI HCV RNA/mL, e que são utilizados tanto na triagem sorológica de doadores de sangue, como na confirmação da infecção pelo vírus.(59) O RNA viral pode ser detectado de 1 a 3 semanas após a infecção e aproximadamente 1 mês antes do aparecimento dos anticorpos anti-HCV. Ademais, o NAT pode permanecer positivo nos casos de hepatite crônica, ser indetectável quando ocorre a resolução espontânea ou cura e, ainda, oscilar entre positivo e negativo durante todo o curso da doença (Figura II.5).(60) A presença do RNA viral na amostra é definidora da infecção pelo HCV, independente da presença de anticorpos ou de alteração nas enzimas hepáticas. Entretanto, um teste de HCV RNA negativo isolado não pode ser considerado como ausência de infecção.(46)



**Figura II.5. Padrão de Positividade de HCV RNA de teste quantitativo. A:** Padrão Contínuo, **B:** Resolução espontânea e **C:** Padrão oscilante. Adaptado de Scott, 2007 (59)

Os testes combinados para detecção de antígeno e anticorpo (Ag-Ab) surgiram em meados dos anos 2000, como alternativa à implementação dos testes moleculares.(61) Laperche e colaboradores mostraram em seu estudo que o HCV Ag-Ab é capaz de detectar 40,8 a 75% das amostras RNA HCV positivas e anti-HCV negativas. Os testes HCV Ag-Ab podem reduzir o período de janela para 20,6 dias e, em até 30,1 dias, quando comparados a ensaios que detectam apenas anticorpos (Figura II.6).(62,63) No mesmo trabalho, os autores identificam uma oscilação no sinal de detecção do ensaio Ag-Ab, queda que coincide com o aumento na concentração de anticorpos livres e o início da capacidade de detecção do imunoenensaio para anticorpos apenas.(63)



**Marcadores de soroconversão de painel comercial (BCP 6225) para o HCV.** (▲) HCV-RNA (em log UI/mL) (■) HCV Antígeno e Anticorpo [Biorad Monolisa HCV Ag-Ab] e (●) HCV Anticorpo [Biorad Monolisa Antibody Plus].

Nota: A linha serrilhada indica o limiar de detecção estabelecido pelo fabricante. A seta vertical representa a queda no sinal de detecção. DO/CO: Densidade Óptica/Cutoff; MP-NAT: NAT em *mini-pool*. Extraído de Laperche, 2005. (63)

Desta forma, em países onde há limitações práticas e financeiras à implementação do NAT HCV, os testes combinados Ag-Ab podem representar uma alternativa para aumentar segurança transfusional em bancos de sangue.

### III. OBJETIVOS

#### III.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o desempenho do teste HCV Ag-Ab na triagem sorológica de doadores de sangue quando comparado ao imunoensaio para anticorpos de 3ª geração.

#### III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a redução do período de janela do teste combinado HCV Ag-Ab comparado ao método de 3ª geração, dentro do contexto econômico do país e da segurança transfusional.

- Verificar a frequência de testes verdadeiro positivos e falso positivos, bem como calcular os valores preditivos positivo e negativo para a Hepatite C em doadores de sangue da Fundação Hemominas, utilizando como método de triagem o teste combinado HCV Ag-Ab .

- Definir um algoritmo para a triagem sorológica de doadores de sangue na Fundação Hemominas baseado nas relações DO/CO do teste combinado HCV Ag-Ab e dos testes complementares HCV-Ab e HCV-Ag.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram estudados 263.581 doadores aptos clínicos, de acordo com a legislação vigente na época, Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 153 de 14 de junho de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que compareceram à Fundação Hemominas no período de julho de 2009 a junho de 2010. Os critérios de aptidão levavam em consideração condições clínicas e epidemiológicas com o objetivo de reduzir a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas.

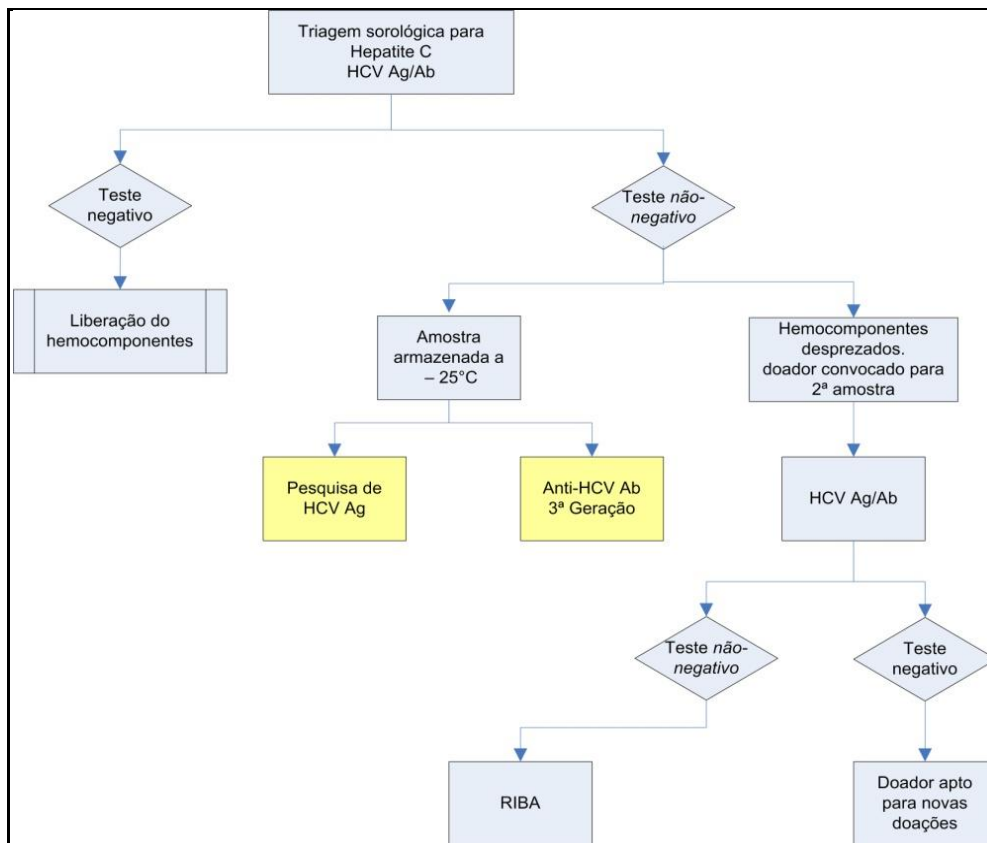
### IV.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Todos os procedimentos e testes realizados neste estudo foram feitos observando-se as normas definidas pela RDC 153. Os doadores incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido padronizado pela Fundação Hemominas.

Uma amostra de sangue em tubo vácuo com ativador de coagulação e gel separador foi coletada de cada doador apto clínico no mesmo momento da doação do sangue, sendo denominada 1ª amostra. Após centrifugação no sítio de coleta (Tabela IV.1), as amostra foram encaminhadas para a Central Sorológica da Fundação

Hemominas e testadas individualmente para Hepatite B (HBsAg e Anti-HBc Total), Vírus Linfotrófico T Humano I/II (HTLV I/II), Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2, duas metodologias diferentes), Hepatite C, Doença de Chagas e Sífilis, como estabelecido na RDC 153. Todos os testes utilizados na rotina foram previamente validados pela Central Sorológica da Fundação Hemominas, procedimentos que incluem a testagem de painéis comerciais de soroconversão e performance, painéis com amostras verdadeiramente positivas da rotina de doadores e de, no mínimo, 2.000 amostras não reativas de doadores de sangue.

Após a testagem inicial com o ensaio de triagem para o HCV (HCV Ag-Ab), as amostras reativas ou indeterminadas foram separadas e repetidas em duplicata. Aquelas repetidamente reativas/indeterminadas HCV-Ag foram aliquotadas em criotubos e congeladas a uma temperatura inferior a  $-25^{\circ}\text{C}$  (Figura IV.1) estes doadores foram convocados através de carta para repetição e confirmação do resultado inicial.



**Figura IV.1 – Algoritmo do estudo**

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção Anticorpos Anti-HCV; **HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio para detecção Antígenos e Anticorpos Anti-HCV; **RIBA:** *Recombinant Immuno Blot Assay*

Ao final do período de coleta estipulado pelo estudo, as amostras separadas foram testadas, em uma única bateria, utilizando dois testes com metodologias diferentes para o HCV: Um teste de 3ª geração para a detecção exclusiva de anticorpos anti-HCV (HCV-Ab) e um teste para detecção exclusiva de antígeno do *core* do HCV (HCV-Ag), denominados neste estudo genericamente de testes complementares.

Os doadores que retornaram à Fundação Hemominas para coletar a amostra para confirmação dos resultados, denominada 2ª amostra, foram novamente testados com o ensaio de triagem, HCV

Ag-Ab. Aqueles que mantiveram resultados repetidamente reativos foram submetidos ao teste confirmatório, HCV Imuno Blot - RIBA.

**Tabela IV.1 - Distribuição por sítio de coleta dos doadores de Sangue da Fundação Hemominas de julho de 2009 a junho de 2010**

Unidade	Aptos clínicos (%)
Posto de Coleta de Além Paraíba	3.252 (1,23)
Posto de Coleta de Betim	10.217 (3,88)
Hemonúcleo de Divinópolis	15.644 (5,94)
Hemonúcleo de Diamantina	39.03 (1,48)
Hemocentro de Belo Horizonte	68.963 (26,16)
Posto de Coleta Júlia Kubistchek	11.249 (4,27)
Hemocentro de Governador Valadares	12.850 (4,88)
Hemonúcleo de Ituiutaba	3.708 (1,41)
Hemocentro de Juiz de Fora	28.619 (10,86)
Hemonúcleo de Manhuaçu	5.343 (2,03)
Hemocentro de Montes Claros	15.591 (5,92)
Hemocentro de Pouso Alegre	12.364 (4,69)
Hemonúcleo de Passos	6.939 (2,63)
Hemonúcleo de Patos de Minas	6.070 (2,30)
Hemonúcleo de Ponte Nova	5.993 (2,27)
Posto de Coleta de Poços de Caldas	3.449 (1,31)
Hemonúcleo de São João Del Rei	5.521 (2,09)
Hemonúcleo de Sete Lagoas	9.006 (3,42)
Hemocentro de Uberlândia	19.084 (7,24)
Hemocentro de Uberaba	15.807 (6,00)
Total	263.581 (100)

### IV.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos todos os doadores aptos clínicos que doaram sangue dentro das unidades da Fundação Hemominas entre 01/07/2009 e 30/06/2010, período de coleta da 1ª amostra. A coleta da 2ª amostra foi realizada até agosto de 2012.

O critério de corte para a definição de resultado indeterminado foi a relação Densidade Ótica/Ponto de Corte (*Cutoff*) (DO/CO) do teste de triagem HCV Ag-Ab entre 0,8 e 1,2. Aqueles doadores cuja relação DO/CO foi maior que 1,2 foram considerados reativos.

#### IV.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os doadores inaptos clínicos e aqueles que coletaram amostras fora das unidades de coleta da Fundação Hemominas (Coletas Externas). Este critério foi utilizado porque a maior parte dos doadores de Coletas Externas não retornam para coletar 2ª amostra e confirmação dos resultados.

#### IV.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações de distribuição de valores entre variáveis foram analisadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados usando o programa *GraphPad Prism 5 software package* (San Diego, CA, USA) e *Microsoft Excel 2007*.

## IV.6 - TESTE DE TRIAGEM COMBINADO PARA HEPATITE C – HCV AG-AB

Atualmente a triagem da infecção pelo HCV na Fundação Hemominas é feita usando o teste combinado HCV Ag-Ab, capaz de detectar simultaneamente antígeno e anticorpo contra o vírus. No estudo foi utilizado o **Abbott Murex® HCV Ag-Ab combination assay** (Murex Biotech S.A, Kyalami, África do Sul), imunoensaio tipo sanduíche em microplaca para detecção de antígeno e anticorpo anti-HCV. Os testes foram realizados no processador automático de microplacas, **Tecan Evolyzer® 150** (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suíça), exatamente como recomendado pelo fabricante. Resumidamente, amostras dos doadores, controles do kit e amostras para controle interno da qualidade são incubadas por 60 minutos para permitir a ligação do antígeno do *core* do HCV e/ou anticorpos contra o vírus na fase sólida da reação, cujos micropoços são revestidos com anticorpos monoclonais *anti-core* e antígenos recombinantes da região NS3 do genoma viral. Após o período de incubação e na presença de antígenos e/ou anticorpos específicos, ocorre a formação de complexo antígeno/anticorpo na fase sólida da reação. Proteínas não específicas do soro ou plasma são lavadas. Imediatamente após a adição do conjugado marcado com peroxidase, segue nova fase de incubação por 60 minutos. O conjugado não ligado é lavado e então o substrato é adicionado. Na presença de antígeno ou anticorpo anti-

HCV, há formação de cor, que é detectada através da leitura espectrofotométrica a 450 nm de comprimento de onda.

#### IV.7 - TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HCV – HCV-AB

O ensaio para a detecção isolada de anticorpos anti-HCV utilizado no presente estudo foi um teste de 3ª geração, **ORTHO® HCV Version 3.0 ELISA Test System** (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, USA). Trata-se de um imunoensaio enzimático que utiliza microplaca com antígenos recombinantes da região estrutural, C22-3, correspondente ao *core* do vírus, e das regiões não estruturais NS5 e c200, esta última correspondente às regiões NS3 e NS4 do genoma viral. Todos os testes foram realizados em processador semi-automático **Hamilton® Microlab Fame** (Hamilton Robotics).

Os controles do kit, amostras dos doadores e controle interno da qualidade são incubadas durante 60 minutos a 37°C. Na presença de anticorpos anti-HCV específicos contra os reagentes aderidos à fase sólida da reação, ocorre a formação de complexo antígeno/anticorpo. Após procedimento de lavagem, em que são retiradas proteínas plasmáticas não relacionadas ao HCV, o conjugado (anticorpo contra IgG humana conjugada a uma peroxidase) é adicionado e incubado novamente por 60 minutos.

Novo processo de lavagem para remoção do conjugado não ligado e a adição de peroxidase de hidrogênio se seguem. A formação de cor é indicativa de reação, que é quantificada através de leitura por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm.

#### IV.8 - TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO DO HCV – HCV-AG

O teste para a detecção de antígeno do HCV usado neste estudo foi o imunoensaio **ARCHITECT HCV-Ag** (Abbott, Wiesbaden, Alemanha). Trata-se de imunoensaio em dois passos que utiliza tecnologia de micropartículas quimiluminescentes para quantificação do antígeno do *core* do HCV em soro humano. São usados anticorpos anti-HCV marcados com acridina na fase líquida e anticorpos monoclonais anti-HCV ligados a micropartículas paramagnéticas como fase sólida. O sistema analítico **Abbott® ARCHITECT HCV-Ag** (Abbott, Wiesbaden, Alemanha) trata previamente as amostras a serem testadas para dissociação do complexo antígeno/anticorpo, permitindo a detecção não só de antígeno livre, mas também do antígeno do HCV ligado. O limite de detecção do teste é equivalente a 0,06 pg/mL de antígeno recombinante c11. Os testes são realizados em sistema fechado totalmente automatizado.

#### IV.9 – IMUNOBLOT PARA O HCV–RIBA 3.0 HCV

O teste confirmatório utilizado neste estudo foi o **CHIRON RIBA HCV 3.0 SAI Strip Immunoblot Assay** (Chiron Corporation Emirville, Califórnia). Trata-se de um imunoensaio cuja fase sólida é constituída por tiras de alta especificidade para a detecção de anticorpos anti-HCV de forma individual, pois cada região da tira é impregnada com antígenos recombinantes (c33c e NS5) e proteínas sintéticas (c10Op e 5-1-1p) derivados de regiões não estruturais do vírus e com uma proteína do capsídeo viral (c22p), derivada da região estrutural.

As amostras foram processadas no **Tecan® Profiblot** (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suíça) como padronizado pelo fabricante do ensaio. O primeiro passo da reação é a incubação das tiras, amostras e controles. No segundo passo as tiras são incubadas com anti-IgG humana marcada com peroxidase. Após novo período de incubação e lavagem, é adicionado o substrato cromógeno. Caso haja ligação dos antígenos em anticorpos do paciente e destes com a anti-IgG humana marcada, observa-se a formação de banda corada pela ação da enzima sobre o substrato. Cada banda identifica um anticorpo específico. A leitura manual do conjunto de bandas da tira, como estabelecido pelo fabricante do kit, permite a interpretação do teste como positivo, indeterminado ou negativo. O teste é considerado negativo quando nenhuma banda com padrão 1+ ou

superior em relação ao controle positivo do kit está visível, ou apenas quando apenas a banda controle hSOD (Superóxido Dimutase Humana) apresenta o padrão igual ou superior a 1+. É interpretado como indeterminado, se for detectada apenas uma banda com padrão igual ou superior a 1+, ou ainda a presença de uma banda 1+ mais a banda hSOD com o padrão igual ou superior a 1+. Se mais de uma banda com o padrão igual ou superior a 1+ for detectada, o teste é definido como positivo. A banda controle hSOD possibilita a detecção de anticorpos contra a hSOD que não são específicos para os antígenos do HCV.

## V. RESULTADOS

### V.1 - 1<sup>A</sup> AMOSTRA

Entre julho de 2009 e junho de 2010 348.626 indivíduos se candidataram à doação de sangue na Fundação Hemominas, período de coleta do estudo. Após a entrevista clínico-epidemiológica realizada por profissionais qualificados e treinados para esta atividade, 263.581 (75,6%) foram considerados aptos clínicos e coletaram material para doação de sangue e triagem sorológica. Destes, 81.976 (31,1%) se candidataram pela 1<sup>a</sup> vez à doação de sangue na Fundação Hemominas (doador de 1<sup>a</sup> vez).

Trezentos e quarenta um doadores (129/10<sup>5</sup>) tiveram resultados repetidamente reativos/indeterminados para o teste HCV Ag-Ab (Tabela V.1).

**Tabela V.1 - Resultados das amostras testadas com o teste combinado HCV Ag-Ab nos doadores aptos clínicos**

	n (%)	n por 100.000 doadores
HCV Ag-Ab Reativo <sup>Ω</sup>	226 (0,086%)	86/10 <sup>5</sup>
HCV Ag-Ab Indeterminado <sup>Ω</sup>	115 (0,044%)	44/10 <sup>5</sup>
HCV Ag-Ab Não-Reativo	263.240 (99,87%)	

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV Ag-Ab:** Imuno Ensaio Combinado HCV Antígeno e Anticorpos.  
(Ω) Amostras repetidamente reativas/indeterminadas em 1<sup>a</sup> amostra.

Dos 341 doadores reativos/indeterminados para HCV Ag-Ab, 42 (12,3%) apresentaram resultado reativo/indeterminado para os testes HCV-Ab (somente anticorpo) e HCV-Ag (somente antígeno). Neste grupo, daqui em diante denominado Grupo 1, a mediana

DO/CO do teste HCV Ag-Ab foi 11,22. Trinta e seis (10,6%) doadores apresentaram HCV-Ab reativo/indeterminado, porém HCV-Ag não-reativo (Grupo 2) e a mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab neste grupo foi 2,11. Setenta e nove (23,2%) doadores apresentaram pelo menos um dos testes complementares, HCV-Ab ou HCV-Ag, reativo/indeterminado (Grupo 3). A mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab neste grupo foi 8,32. Duzentos e sessenta e dois (76,8%) doadores (Grupo 5) apresentaram resultados não-reativos para ambos os testes, HCV-Ab e HCV-Ag, e a mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab neste grupo foi 1,30.

Um doador (3,8/10<sup>6</sup>) estava no período de janela imunológica para detecção de anticorpo. O teste HCV-Ab foi negativo, enquanto o HCV-Ag foi positivo (Grupo 4). A relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab para este doador foi 9,81 (Tabela V.2).

**Tabela V.2 - Resultados dos testes HCV-Ab e HCV-Ag e medianas da relação DO/CO dos 341 resultados reativos/indeterminados no ensaio combinado HCV Ag-Ab.**

Grupos	n (%)	Mediana DO/CO HCV Ag-Ab	P (25-75) <sup>&amp;</sup>
Grupo 1	42 (12,3)	11,22	8,25-13,05
Grupo 2	36 (10,6)	2,11	1,37-6,75
Grupo 3	79 (23,2)	8,32	2,13-11,71
Grupo 4	1 (0,3)	9,81	-
Grupo 5	262 (76,8)	1,30	0,98-2,12

Grupo 1: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag POS

Grupo 2: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag NEG

Grupo 3: HCV-Ab POS/IND ou HCV-Ag POS

Grupo 4: HCV-Ab NEG e HCV-Ag POS

Grupo 5: HCV-Ab NEG e HCV-Ag NEG

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção de Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio Combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **IND:** indeterminado; **NEG:** negativo; **POS:** positivo; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*

(&) Intervalo entre os Percentis 25 e 75

Os resultados das relações DO/CO do teste HCV Ag-Ab nos Grupos 1, 2, 3, e 5 foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney, mostrando diferenças significativas (Tabela V.3).

**Tabela V.3 – Comparação das medianas da relação DO/CO no teste combinado HCV Ag-Ab entre os diferentes grupos de reatividades nos testes isolados HCV-Ab e HCV-Ag**

Grupos	Valor <i>p</i>	Medianas HCV Ag-Ab
Grupo 1 x Grupo 2	< 0,0001	11,22 x 2,11
Grupo 1 x Grupo 5	< 0,0001	11,22 x 1,30
Grupo 3 x Grupo 5	< 0,0001	8,32 x 1,30
Grupo 2 x Grupo 5	< 0,0001	2,11 x 1,30

Grupo 1: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag POS

Grupo 2: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag NEG

Grupo 3: HCV-Ab POS/IND ou HCV-Ag POS

Grupo 5: HCV-Ab NEG e HCV-Ag NEG

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção de Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:**

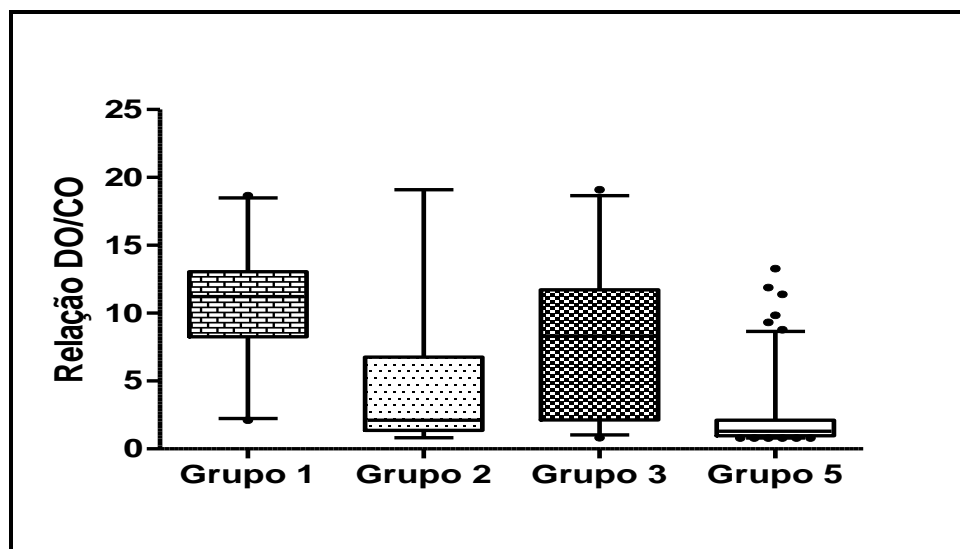
Imunoensaio Combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV;

**POS:** positivo; **IND:** indeterminado; **NEG:** negativo; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*.

Nota: Realizado teste de Mann-Whitney.

O Gráfico V.1 apresenta a distribuição dos resultados dos Grupos 1, 2, 3 e 5 bem como os limites dos percentis 25 e 75.

**Gráfico V.1 - Distribuição dos resultados das relações DO/CO do teste HCV Ag-Ab reativo/indeterminado agrupados de acordo com os resultados dos testes complementares HCV-Ab e HCV-Ag**



Grupo 1: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag POS

Grupo 2: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag NEG

Grupo 3: HCV-Ab POS/IND ou HCV-Ag POS

Grupo 5: HCV-Ab NEG e HCV-Ag NEG

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção Anticorpos Anti-HCV;

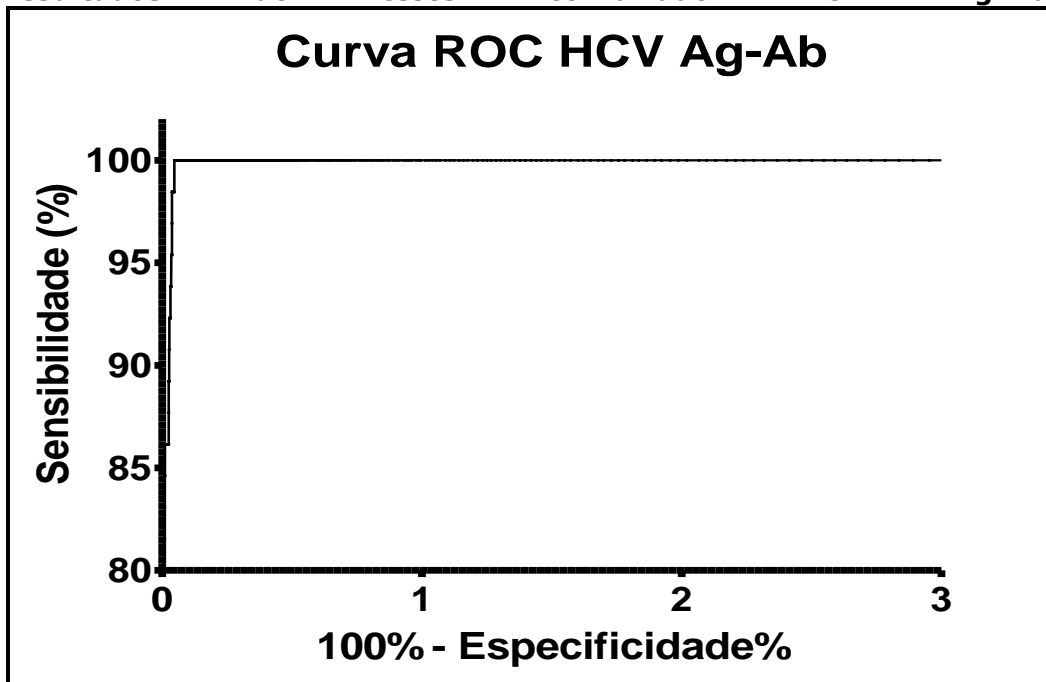
**HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio

Combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **POS:** positivo;

**IND:** indeterminado; **NEG:** negativo; **DO/CO:** relação densidade óptica/cutoff.

A especificidade do ensaio HCV Ag-Ab foi 99,95% quando consideradas como verdadeiras positivas as amostras que apresentaram pelo menos um dos testes complementares reativos. O valor de corte da relação DO/CO para a sensibilidade de 100% (IC 94,48 – 99,99) foi 1,333. A área sob a curva foi 0,9999, com o valor  $p < 0,0001$  (Gráfico V.2). O Valor Preditivo Positivo (VPP) do HCV Ag-Ab na população de doadores de sangue da Fundação Hemominas, foi 37,5% e o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi maior que 99,99%.

**Gráfico V.2 - Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) dos resultados do teste combinado HCV Ag-Ab**



**HCV Ag-Ab:** Imunoensaio Combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV

Nota: Área sob a curva: 0,9999 (IC 95%: 94,48-99,99)

## **V.2 - 2<sup>a</sup> AMOSTRA**

Todos os 341 doadores com teste HCV Ag-Ab reativo/indeterminado foram considerados inaptos sorológicos temporários e convidados a retornar à Fundação Hemominas para coleta de uma nova amostra para repetição do teste de triagem e, se necessário, o teste confirmatório (2<sup>a</sup> amostra). Destes, 237 (69,5%) compareceram a uma das unidades da Hemominas e o tempo médio de retorno foi de 106 dias (IC 95% 91,8-120,4).

Conforme mostrado na Tabela V.4, dos 237 doadores que retornaram para coleta da 2<sup>a</sup> amostra, 114 (48,1%) mantiveram resultado HCV Ag-Ab reativo. As medianas das relações DO/CO do

HCV Ag-Ab foram 3,31 e 3,64 na 1ª e 2ª amostra, respectivamente, e não houve diferença estatística entre os resultados da 1ª amostra quando comparados aos da 2ª amostra. Cinquenta e dois (21,9%) doadores tiveram resultado indeterminado e a mediana das relações DO/CO deste grupo foi 0,88 (P25-75: 0,84-1,01). Na amostra da doação, 1ª amostra, estes doadores haviam apresentado resultados HCV Ag-Ab reativos/indeterminados, com mediana DO/CO de 1,18 (P25-75: 0,91-1,44). Quando comparados, estes resultados mostraram-se diferentes ( $p < 0,0001$ ).

Setenta e um (30,0%) doadores dentre os 237 que retornaram à Fundação Hemominas para repetir o teste de triagem mostraram resultados negativos no teste HCV Ag-Ab após a re-testagem (Tabela V.4). Estes doadores foram considerados aptos sorológicos em 2ª amostra e não foram realizados novos testes.

**Tabela V.4 – Resultados da repetição do teste HCV Ag-Ab na 2ª amostra de 237 doadores inicialmente reativos/indeterminados e relação DO/CO**

	n (%)	DO/CO	Percentil 25	Percentil 75
HCV Ag-Ab Reativo	114 (48,1%)	3,31	1,81	9,31
HCV Ag-Ab Indeterminado	52 (21,9%)	0,88	0,84	1,01
HCV Ag-Ab Negativo	71 (30,0%)	£	£	£

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio Combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*;  
(£) Dados referentes à 2ª amostra não disponíveis. (HCV Ag-Ab Reativo/Indeterminado 1ª amostra: Relação DO/CO 1,12 (P25-75: 0,91-1,34))

A Tabela V.5 mostra detalhadamente os resultados do RIBA e as relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra nos Grupos 1, 3 e 5. Entre os 42 doadores (Grupo 1) que apresentaram

os três testes reativos/indeterminados na 1ª amostra (HCV Ag-Ab, HCV-Ab e HCV-Ag), 31 (73,8%) retornaram para a coleta da 2ª amostra. Todos os 31 (100%) doadores apresentaram RIBA positivo. Neste grupo, a mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab na 1ª amostra foi 11,32 (P25-75: 9,29-12,99). As relações DO/CO do teste HCV-Ab estão descritas na Tabela V.5.

Entre os 79 doadores (Grupo 3) que apresentaram pelo menos um teste reativo além do teste de triagem, 58 (73,4%) retornaram para coletar a 2ª amostra. Destes, 49 (84,5%) apresentaram RIBA positivo e, neste grupo, as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra foram 10,43 e 4.960, respectivamente. Dentre os 58, cinco (8,6%) doadores apresentaram RIBA indeterminado e, neste grupo, as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra foram 1,21 (P25-75: 1,06-4,31) e 2.536 (P25-75: 1.050-4.503), respectivamente. Quatro (6,9%) dos 58 doadores tiveram RIBA negativo, sendo a mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab, 2,23 (P25-75: 0,91-3,89) e 1,25 (P25-75: 1,02-1,98), respectivamente.

Dos 263 doadores classificados no Grupo 5, 108 (41,1%) realizaram o RIBA na 2ª amostra e, em 102 (94,4%), o resultado foi negativo. Neste subgrupo, as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra foram 1,42 (P25-75: 1,13-2,37) e

0,02 (P25-75: 0,01-0,04), respectivamente. Seis doadores apresentaram o RIBA indeterminado, e as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra foram 2,15 (P25-75: 0,87-2,28) e 0,01 (P25-75: 0,00-0,61), respectivamente.

**Tabela V.5 – Resultados do RIBA e medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra nos diferentes grupos**

Grupos	n (1ª amostra)	n (2ª amostra)	RIBA 3.0	HCV Ag-Ab DO/CO	HCV Ag-Ab P25-75 <sup>&amp;</sup>	HCV-Ab <sup>£</sup> DO/CO	HCV-Ab P25-75 <sup>&amp;</sup>
Grupo 1	42	31	POS	11,32	9,29-12,99	4.960	4.960-4.960
		0	IND	-		-	
		0	NEG	-		-	
Grupo 3	79	49	POS	10,43	2,24-12,52	4.960	4.960-4.960
		5 <sup>Ω</sup>	IND	1,21	1,06-4,31	2.536	1.050-4.503
		4 <sup>Ω</sup>	NEG	2,23	0,91-3,89	1,25	1,02-1,98
Grupo 5	263	0	POS	-		-	
		6	IND	2,15	0,87-2,28	0,01	0,00-0,61
		102	NEG	1,42	1,13-2,37	0,02	0,01-0,04

Grupo 1: HCV-Ab POS/IND e HCV-Ag POS

Grupo 3: HCV-Ab POS/IND ou HCV-Ag POS

Grupo 5: HCV-Ab NEG e HCV-Ag NEG

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*; **RIBA:** *Recombinant Immuno Blot Assay*.

(£) Relação DO/CO do HCV-Ab coletado na 1ª amostra

(Ω) HCV Ag Negativo

(&) Intervalo entre os Percentis 25 e 75

Cento e sessenta e seis doadores realizaram o teste confirmatório RIBA (Tabela V.6). Quarenta e nove (29,5%) apresentaram o RIBA positivo e, neste subgrupo, as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra foram 10,43 (P25-75: 6,33-12,52) e 4.960 (P25-75: 4.960-4.960), respectivamente. Em 106 (63,9%) doadores, o resultado foi negativo, e as medianas das relações DO/CO dos testes HCV Ag-Ab e HCV-Ab na 1ª amostra foram 1,42 (P25-75: 1,13-2,44) e 0,03 (P25-75: 0,01-0,04), respectivamente. Neste subgrupo, os resultados dos testes complementares HCV-Ab e HCV-Ag realizados na 1ª amostra foram não-reativos.

As medianas das relações DO/CO do teste HCV Ag-Ab dos grupos que apresentaram RIBA positivo e negativo foram diferentes ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela V.6 – Resultados do RIBA e medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab na 1ª amostra**

RIBA	n	HCV Ag-Ab DO/CO	HCV Ag-Ab (P25-75) &	HCV-Ab <sup>£</sup> DO/CO	HCV-Ab (P25-75) &
Positivo	49	10,43	6,33-12,52	4.960	4.960-4.960
Indeterminado	11	2,12	1,04-2,74	0,18	0,12-2563
Negativo	106	1,42	1,13-2,44	0,25	0,01-0,04

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*; **RIBA:** *Recombinant Immuno Blot Assay*.  
(£) Relação DO/CO do HCV-Ab coletado na 1ª amostra  
(&) Intervalo entre os Percentis 25 e 75

Nota: A diferença entre os grupos com RIBA positivo e negativo foi significativa ( $p < 0,0001$ ). Entre os grupos com RIBA negativo e indeterminado não houve diferença estatística.

Quatro doadores (3,8%) com RIBA negativo apresentaram resultados reativos/indeterminados para o HCV-Ab na 1ª amostra. A mediana das relações DO/CO do teste HCV-Ab foi 1,24 (P25-75: 1,02-1,98) neste grupo (Tabela V.7).

<b>Tabela V.7 – Relação DO/CO do HCV Ag-Ab e relação DO/CO HCV-Ab na 1ª amostra em doadores com RIBA negativo</b>				
Amostra	HCV Ag-Ab (1ª amostra)	HCV-Ab	HCV-Ag (pg/mL)	RIBA
34-2009/351-008	0,822	1,228	0,00	Negativo
65-2009/234-012	3,259	0,949	0,00	Negativo
58-2009/301-053	4,108	1,270	0,00	Negativo
46-2010/026-013	1,193	2,211	0,00	Negativo

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção de Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **RIBA:** *Recombinant Immuno Blot Assay*

Nota: Mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab dos 4 resultados com RIBA negativo: 2,23 e 1,25, respectivamente.

Onze (6,62%) doadores apresentaram resultado indeterminado no RIBA. Nestes, a mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab na 1ª amostra foi 2,12 (P25-75: 1,39-2,74). Os resultados dos testes complementares são mostrados na Tabela V.8. Entre os 11 resultados indeterminados, 5 (45,4%) apresentaram a banda c33c reativa, 3 (27,3%) a banda c100, 2 (18,2%) a banda c22p e um (9,1%) a banda NS5. Não houve relação entre o padrão das bandas e as relações DO/CO do HCV Ag-Ab e do HCV-Ab. Além disso, não houve diferença estatística no resultado da relação DO/CO do HCV Ag-Ab entre os doadores com RIBA indeterminado e negativo.

**Tabela V.8 – Relação DO/CO do HCV Ag-Ab e testes complementares realizados na 1ª amostra em doadores com RIBA indeterminado.**

Amostra	HCV Ag-Ab (1ª amostra)	HCV- Ab	HCV-Ag (pg/mL)	RIBA	Padrão RIBA
46-2010/160-033	5,109	4099	0,00	IND	c33c - 1+
01-2009/272-064	3,521	4908	0,00	IND	c33c - 1+
49-2010/216-002	2,561	0,012	0,00	IND	NS5 - 2+
65-2010/059-046	2,743	0,008	0,00	IND	c100 - 1+
01-2010/043-115	2,186	-0,003	0,00	IND	c100 - 1+
26-2010/175-064	2,118	0,184	0,00	IND	c33c - 1+
70-2010/089-017	1,209	1,096	0,00	IND	c22p - 1+
55-2009/202-003	1,077	1,327	0,00	IND	c33c - 3+
21-2010/016-092	1,039	2536	0,00	IND	c22p - 1+
67-2009/229-040	0,875	0,020	0,00	IND	c100 - 1+
52-2009/315-005	0,855	0,012	0,00	IND	c33c - 1+

**HCV:** Vírus da Hepatite C; **HCV-Ab:** Imunoensaio para detecção de Anticorpos Anti-HCV; **HCV-Ag:** Imunoensaio para detecção de Antígenos do HCV; **HCV Ag-Ab:** Imunoensaio combinado para detecção de Antígenos do HCV e Anticorpos Anti-HCV; **IND:** indeterminado, **DO/CO:** relação densidade óptica/cutoff; **RIBA:** *Recombinant Immuno Blot Assay*.

Entre os 341 resultados reativos/indeterminados no teste HCV Ag-Ab, 72 (21,1%) apresentaram relação DO/CO entre 0,8 e 0,99, abaixo do *valor de corte* estipulado pelo fabricante, 1,0 (Gráfico V.3). Todos apresentaram resultados não-reativos no teste para pesquisa de antígeno, HCV-Ag, e 71 (98,7%) foram não-reativos para o teste de 3ª geração, HCV-Ab. Um doador apresentou o teste HCV-Ab reativo, a relação DO/CO do seu teste foi 1,228 e o RIBA negativo.

Entre os 72 doadores com a relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab < 1,0, 51 (70,8%) retornaram para coletar a 2ª amostra e repetir os exames. Vinte e sete (52,9%) apresentaram relação

DO/CO  $\leq$  0,8 na re-testagem em 2ª amostra, e desta forma foram classificados como não-reativos. Vinte e quatro (47,1%) mantiveram a relação DO/CO  $>$  0,8. Destes, 22 (91,7%) tiveram RIBA negativo e as medianas das relações DO/CO do HCV Ag-Ab na 1ª amostra e do HCV-Ab foram 0,88 (P25-75: 0,86-0,94) e 0,02 (P25-75: 0,01-0,04), respectivamente. Dois doadores (2,8%) apresentaram resultado indeterminado no RIBA e os resultados dos testes complementares destes doadores foram não-reativos em ambos os testes

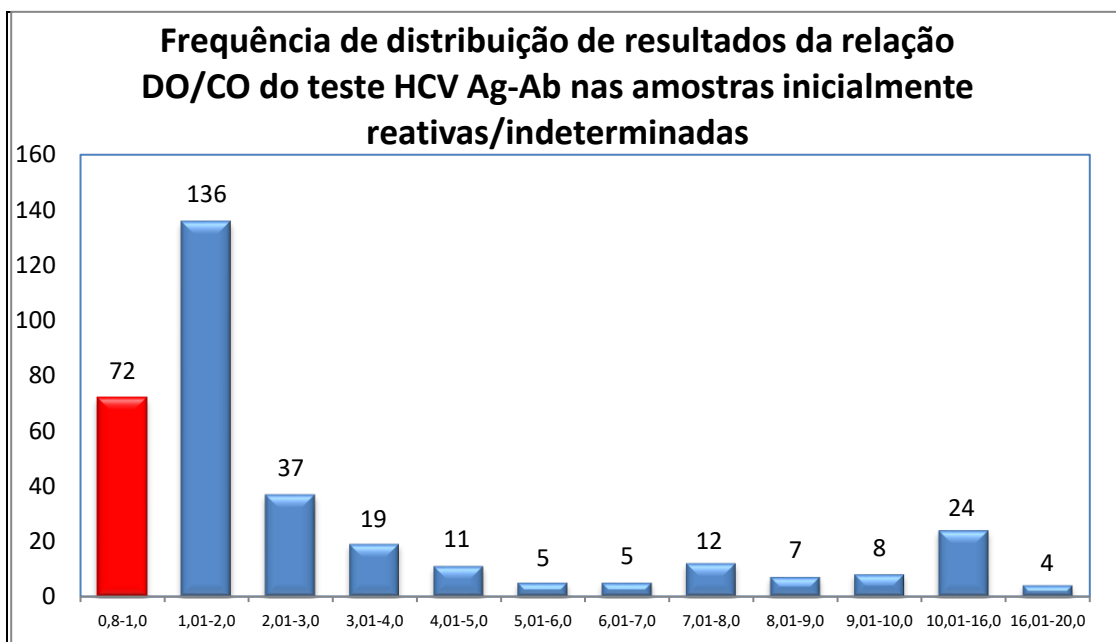


Gráfico V.3 – Frequência de distribuição de resultados da relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab. Em destaque (vermelho), doadores cujo resultado da relação DO/CO foi  $\geq$  0,8 e  $<$  1,0.

## VI. DISCUSSÃO

A segurança transfusional é um dos maiores desafios da hemoterapia. Seleção adequada de doadores, padronização das técnicas de coleta, produção e armazenamento, triagem de doenças infecciosas, ensaios de imuno-hematologia mais sensíveis e precisos e a inativação de patógenos são procedimentos que garantiram o aumento da segurança transfusional nas últimas décadas. Sistemas de hemovigilância que reduziram os incidentes transfusionais através de melhores práticas de suporte aos pacientes, bem como técnicas e processos mais modernos para prevenção de reações transfusionais imediatas são exemplos menos noticiados do aumento da segurança transfusional.

Sempre em destaque na literatura médica, o risco transfusional de transmissão de doenças infecciosas é responsável pela maior parte das publicações acadêmicas. O primeiro caso de transmissão de vírus através da transfusão sanguínea foi documentado em 1943.(64) A implementação de testes de triagem para infecções virais teve início em 1969, através do teste para detecção do antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B (HbsAg). Com o objetivo de reduzir o risco de HPT, foram introduzidos os testes para detecção de anticorpo contra o *core* do HBV (Anti-HBc) e a dosagem de alanina aminotransferase (ALT).(65) No final dos anos 80, a introdução de testes específicos para Hepatite C e para o HIV

permitiram a redução significativa do risco de infecção através da transfusão sanguínea.(66)

Desde o fim da década de 70 até os dias atuais, o risco de transmissão de HPT caiu vertiginosamente.(67) No início dos anos 80, a percepção de que a transfusão de hemocomponentes e hemoderivados era uma importante fonte de transmissão de infecções, especificamente para o HIV, colocou o foco nos riscos associados a esses procedimentos e levou a importantes modificações na regulação, fornecimento e testagem de hemocomponentes e hemoderivados.(68)

O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da introdução de uma técnica mais sensível para a triagem do HCV em doadores de sangue, que consiste na detecção simultânea de antígenos e anticorpos anti-HCV, frente aos testes que detectam somente anticorpos. Este estudo também pretendeu avaliar a redução na janela imunológica do HCV, visando aumentar a segurança transfusional em um contexto no qual a introdução de técnicas de triagem moleculares, consideradas como padrão ouro, não podem ser implementadas devido ao alto custo.

A utilização de técnicas de triagem de doadores de sangue cada vez mais onerosas pode ser uma barreira intransponível para muitos países em desenvolvimento. Foi estimado que, nos Estados Unidos, o custo da implementação da testagem molecular para HCV e

HIV em *minipools* foi de US\$ 1,5 a 4,3 milhões por ano de vida ajustado pela qualidade.(54)

Com o objetivo de avaliar se o teste combinado de antígeno e anticorpo seria capaz de detectar mais amostras reativas do que os testes que detectam apenas anticorpos, todas as amostras reativas/indeterminadas pelo teste de triagem combinado HCV Ag-Ab foram avaliadas usando dois diferentes imunoensaios: o primeiro capaz de detectar exclusivamente anticorpos anti-HCV e o segundo exclusivamente antígenos do HCV. Desta forma, seria possível determinar qual, antígeno ou anticorpo, foi responsável pela reatividade do teste de triagem. Vários estudos já avaliaram o desempenho do HCV Ag-Ab frente a painéis comerciais de soroconversão e amostras sabidamente positivas em pacientes com alta prevalência. (61,63,69,70) Estes estudos demonstraram um aumento significativo no número de amostras detectadas em relação aos testes de 3ª geração e aumento na capacidade do teste em detectar amostras positivas mais precocemente, reduzindo o período de janela. Foi estimada a redução do período de janela de 26,8 dias quando o teste de 3ª geração foi comparado ao teste de 4ª geração, HCV Ag-Ab.(62) Entretanto, não há relato da avaliação desta estratégia em uma grande rotina de banco de sangue.

Neste estudo, dos 348.626 candidatos à doação de sangue, 263.581 (75,6%) foram classificados como aptos clínicos, (71) dado

similar ao encontrado por Gonzalez e colaboradores (em publicação), (72) em que a aptidão clínica de três grandes Hemocentros brasileiros foi de 77,6%.

A triagem sorológica para o HCV utilizando o teste combinado HCV Ag-Ab detectou 341 (129/10<sup>5</sup>) doadores reativos/indeterminados. Um estudo conduzido pelo Grupo REDS (*Retrovirus Epidemiology Donor Study*) (36) demonstrou que a prevalência de infecção pelo HCV em doadores de 1<sup>a</sup> vez foi de 287/10<sup>5</sup> em São Paulo – SP, de 79/10<sup>5</sup> em Belo Horizonte – MG e 131/10<sup>5</sup> em Recife – PE. Entretanto, tais resultados não podem ser comparados diretamente com os encontrados no presente estudo, já que: 1) O Estudo REDS estudou apenas doadores de 1<sup>a</sup> vez, enquanto neste estudo foram coletados os dados tanto de doadores de 1<sup>a</sup> vez, quanto de doadores de repetição; 2) Na primeira fase do nosso estudo, os resultados não foram confirmados por metodologia mais específica (RIBA), ao contrário do Estudo REDS; 3) Quando são levados em consideração apenas os resultados com pelo menos um teste complementar reativo (HCV-Ab ou HCV-Ag), a reatividade em 1<sup>a</sup> amostra do presente trabalho é reduzida para 29/10<sup>5</sup> doadores; e 4) Na nossa experiência, a reatividade de doadores de 1<sup>a</sup> vez é quatro vezes maior do que a encontrada em doadores de repetição.

Quarenta e dois doadores (12,3%) entre os 341 reativos/indeterminados no HCV Ag-Ab apresentaram

simultaneamente resultados reativos para o teste HCV-Ab de 3ª geração e para o teste HCV-Ag. A mediana das relações DO/CO do teste de triagem HCV Ag-Ab foi 11,22 (P25-75: 8,25-13,05). A reatividade simultânea nos testes HCV-Ab e HCV-Ag sugere que o teste combinado HCV Ag-Ab é capaz de reagir em amostras que apresentam antígeno e anticorpo simultaneamente na amostra. Essa situação é de grande importância na triagem de doadores de sangue, pois a maioria dos pacientes com Hepatite C aguda ou crônica possuem antígeno e anticorpo circulantes por grande parte do curso da doença e apresentam pouca sintomatologia clínica. (33)

Trinta e seis doadores (10,6%) dentre os 341 reativos/indeterminados no teste HCV Ag-Ab apresentaram resultado reativo/indeterminado para o HCV-Ab, porém não-reativo para o HCV-Ag. A mediana das relações DO/CO do HCV Ag-Ab neste grupo foi 2,11 (P25-75: 1,35-6,75), sugerindo que o teste de triagem é capaz de detectar a presença de anticorpos na amostra mesmo na ausência de antígeno. A detecção de anticorpos para Hepatite C na triagem sorológica de doadores de sangue é de vital importância. No curso clínico da doença, existem pacientes que apresentam oscilação na carga viral podendo, por conseguinte, apresentar menor quantidade ou ausência de antígenos na amostra. (46,59)

Setenta e nove (23,2%) doadores apresentaram pelo menos um dos testes complementares, HCV-Ab ou HCV-Ag,

reativos/indeterminados. A relação DO/CO deste grupo teve mediana foi 8,32 (P25-75 2,13-11,71). A reatividade em duas metodologias diferentes é sugerida por alguns estudos como forte indicativo de um teste verdadeiramente positivo, encorajando a utilização de testes sequenciais para definição do perfil sorológico dos doadores. (73,74)

Neste estudo foi identificado um doador no período de janela imunológica para a detecção de anticorpos anti-HCV. Este doador apresentou reatividade para o HCV Ag-Ab e para o HCV-Ag, mas resultado não-reativo para o HCV-Ab. Estes achados sugerem que a introdução do teste HCV Ag-Ab é capaz de aumentar a detecção de amostras reativas em relação ao teste HCV-Ab aumentando, portanto, a segurança transfusional. Laperche e colaboradores compararam a sensibilidade dos testes de 3ª e 4ª geração e demonstraram que a introdução destes últimos pode reduzir o período de janela de 21,6 a 30,1 dias, com consequente diminuição no risco residual de 33 a 46% e aumento da segurança transfusional. (62) Somente a análise do HCV Ag-Ab frente ao padrão ouro para a triagem de doadores de sangue, HCV-NAT, será capaz de quantificar o verdadeiro impacto na redução do período de janela

A especificidade do teste HCV Ag-Ab foi de 99,95%, utilizando para a confirmação da verdadeira positividade dos resultados a reatividade de, pelo menos, um dos testes complementares. Esta especificidade foi semelhante àquela

encontrada nas avaliações de ensaios de 3ª e 4ª gerações para o HCV em outros estudos publicados.(61,70,75) Não foi possível verificar a sensibilidade do teste porque as amostras de todos os doadores não foram testadas com um teste padrão ouro. O baixo VPP encontrado, 37,5%, pode ser explicado pelo padrão da população de doadores. Esta população possui baixa prevalência da doença devido à seleção negativa para diminuir o risco de transmissão de doenças infecciosas. Da mesma forma, o VPN maior que 99,99% pode ser explicado pela baixa prevalência da doença na população de doadores de sangue, bem como pela alta especificidade do teste.

O nosso estudo sugere que a análise da relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab é capaz de identificar resultados verdadeiramente positivos. A análise da relação DO/CO na definição de estratégias específicas para o diagnóstico da Hepatite C já foi discutida na literatura e diversos estudos demonstram a importância da determinação de valores específicos para cada método. (60,76,77)

As amostras coletadas no momento da doação de sangue cujas relações DO/CO do HCV Ag-Ab foram superiores a 4,46 fazem parte do grupo de doadores que tiveram, pelo menos, mais um teste reativo. Quando estes doadores coletaram a 2ª amostra, a positividade para a Hepatite C foi confirmada pelo RIBA, metodologia aceita como padrão para confirmação de resultados de imunoenaios de triagem (60).

Valores mais elevados da relação DO/CO sugerem a presença de antígeno do HCV na amostra. Contreras e colaboradores descreveram achado semelhante em estudo publicado em 2010.(78) Valores da relação DO/CO mais próximos ao *cutoff* são sugestivos de resultados falso positivos. No presente estudo, amostras cujas relações DO/CO do HCV-Ag-Ab foram inferiores a 2,06 na 2ª amostra apresentaram resultado negativo no teste confirmatório, sugerindo serem resultados falso positivos e corroborando a utilização da relação DO/CO do HCV Ag-Ab para a interpretação dos resultados do teste de triagem. Esse achado é congruente com os descritos por Alter e colaboradores, que observaram resultados falso positivos em testes para detecção de anticorpos anti-HCV.(60)

A análise da relação DO/CO é importante na medida em que mais de 70% dos resultados inicialmente reativos no teste de triagem são falso positivos.

A relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab do doador que estava em janela imunológica para o HCV-Ab foi 9,81, resultado sugestivo de um teste verdadeiramente positivo. O resultado do teste para a detecção exclusiva do antígeno, HCV-Ag, foi 7,86 pg/mL. O doador não retornou para coletar a 2ª amostra para confirmação do resultado, apesar das cartas de convocação enviadas de acordo com o protocolo da Fundação Hemominas.

Foram encontrados 11 (6,63%) doadores com resultados indeterminados no RIBA entre os 166 doadores que retornaram para coletar a 2ª amostra, mantiveram o teste HCV Ag-Ab reativo/indeterminado e realizaram o teste confirmatório, RIBA. Não foi possível estabelecer nenhum padrão de reatividade entre os resultados dos testes de triagem e complementares e o padrão de bandas dos resultados do RIBA. Melve e colaboradores (79) encontraram uma associação entre os resultados indeterminados de RIBA e reatividade exclusiva na banda NS5, bem como reatividade contra o adenovírus. No presente estudo, não houve diferença entre as relações DO/CO do HCV Ag-Ab dos resultados RIBA indeterminado e RIBA negativo.

A triagem sorológica de doadores de sangue era regulamentada pela RDC 153 (71) que determina a realização de testes de alta sensibilidade para as doenças transmissíveis pelo sangue. Os doadores cujos resultados da triagem sorológica são repetidamente reativos devem ser convocados para repetir os testes de triagem em uma segunda amostra. Aqueles que mantiverem os resultados repetidamente reativos em 2ª amostra são considerados inaptos definitivos e ficam impedidos de doar sangue novamente, independente de seu diagnóstico definitivo. Com exceção da triagem para o HIV, para nenhuma outra doença há exigência de realização de testes confirmatórios. Os doadores inaptos sorológicos devem ser

encaminhados para centros de referência conveniados que ficam responsáveis pelo diagnóstico definitivo.

Um algoritmo para triagem dos doadores seguro, eficiente e capaz de auxiliar o encaminhamento dos inaptos sorológicos permitiria ao banco de sangue estabelecer condutas ágeis e padronizadas, sem o descarte desnecessário de hemocomponentes e principalmente, sem colocar em risco a segurança transfusional. Outro ponto importante a ser levado em consideração é o custo para a realização da triagem e do esclarecimento do perfil clínico e sorológico do doador.

A utilização de testes sequenciais para esclarecimento do perfil sorológico já foi descrita em diversos trabalhos.(80-83) Tal estratégia tem como objetivo aumentar a especificidade diagnóstica dos testes (84) de doadores repetidamente reativos em 1ª amostra, sem aumentar os custos do diagnóstico com a utilização de testes confirmatórios caros e trabalhosos.

A Fundação Hemominas utiliza um *valor de corte* para classificação de resultados reativos/indeterminados ( $\geq 0,8$ ) diferente do preconizado pelo fabricante do kit HCV Ag-Ab ( $\geq 1,0$ ). O propósito de se utilizar um *cutoff* menor seria aumentar a sensibilidade do kit, aumentando a área sob a curva ROC. No entanto, a eficácia desta estratégia não possui comprovação na literatura. Em nosso estudo, a

redução do valor do *cutoff* aumentou a incidência de resultados falso positivos, sem aumentar a segurança transfusional.

Com o objetivo de racionalizar a triagem sorológica de doadores de sangue para o HCV, este estudo propõe que os doadores repetidamente reativos na triagem sejam convocados para repetição do teste em uma nova amostra, com base nos critérios especificados pelo fabricante do kit e validados no presente estudo. Desta forma, só seriam considerados como reativos os testes cuja relação DO/CO fosse  $\geq 1,0$ . Os doadores em que a relação DO/CO fosse  $<1,0$  seriam classificados como não-reativos e, portanto, aptos sorológicos. Haveria uma redução de 21,1% no número de doadores classificados como inaptos sorológicos. A sensibilidade do teste não sofreria alteração, haveria impacto positivo na redução do número de resultados falso positivos e diminuição do número de hemocomponentes descartados.

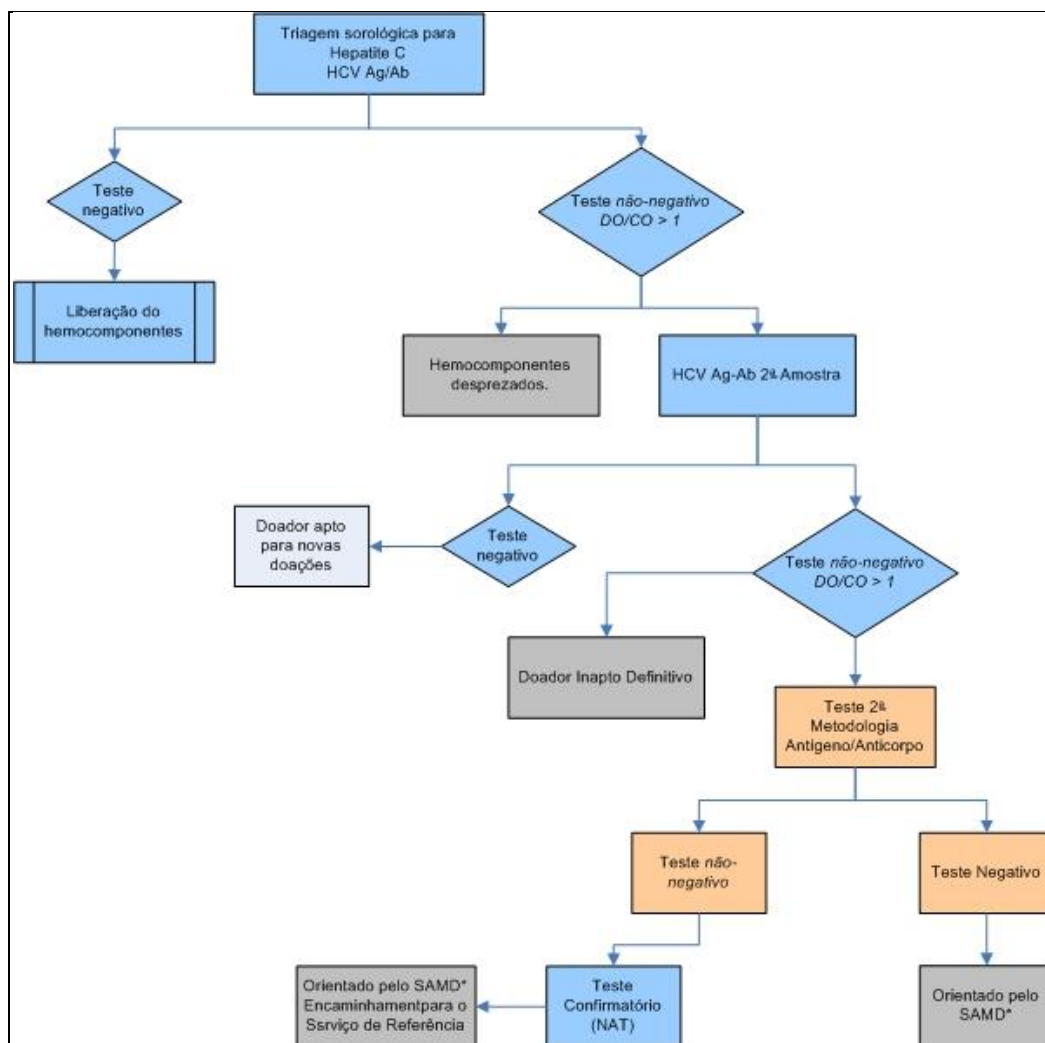
Para os testes de 2ª amostra, no novo algoritmo, propomos a realização da re-testagem com o mesmo ensaio de triagem, a utilização de uma segunda metodologia Ag-Ab (imunoensaio enzimático ou quimiluminescente) e a confirmação dos resultados repetidamente reativos através do NAT para HCV. Desta forma o teste confirmatório RIBA seria suspenso reduzindo sobremaneira os custos de confirmação do HCV. No ano de 2012, a Fundação Hemominas gastou aproximadamente R\$ 115.000,00 somente com a

realização do RIBA. A introdução da segunda metodologia Ag-Ab tem o objetivo aumentar a especificidade do algoritmo com custos infinitamente inferiores aos do RIBA.

Os doadores com resultados reativos no teste de triagem na 2ª amostra e não-reativos na 2ª metodologia, Imunoensaio Ag-Ab de metodologia ou fabricante diferentes seriam considerados como inaptos sorológico definitivos. Estes doadores não seriam reintegrados ao cadastro de doadores, pois o teste de triagem foi repetidamente reativo em duas amostras diferentes. Estes doadores seriam encaminhados para o Serviço de Atendimento Médico ao Doador para esclarecimento.(59,60)

A utilização do NAT como teste confirmatório teria a vantagem de gerar informações importantes para o acompanhamento clínico dos doadores inaptos sorológicos já que o teste molecular, considerado com diagnóstico definitivo para Hepatite C, é capaz de determinar a atividade da doença permitindo classificar o paciente como portador de hepatite crônica ou curado.(46,59,60) A utilização de um segundo imunoensaio no algoritmo poderia substituir a confirmação dos resultados através do RIBA, reduzindo substancialmente os custos da triagem sorológica e também agilizando o encaminhamento dos pacientes

Em um contexto em que os recursos são escassos e a introdução do NAT na triagem de todos os doadores seria inviável, mostramos, na Figura VI.1 a proposta de um novo algoritmo incorporando um segundo imunoenensaio combinado Ag-Ac e a confirmação daqueles testes repetidamente reativos apenas pelo NAT HCV.



**Figura VI.1** – Proposta de algoritmo para triagem sorológica da Hepatite C de doadores de sangue da Fundação Hemominas.

**Ag-Ab:** Antígeno e Anticorpo; **HCV:** Vírus da Hepatite C; **DO/CO:** relação densidade ótica/*cutoff*;  
**NAT:** Teste de Ácido Nucléico

\*Serviço de Atendimento Médico ao Doador

## VI. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que:

A utilização do teste combinado HCV Ag-Ab é de diminuir o período de janela e, desta forma, aumentar a segurança transfusional.

A avaliação da relação DO/CO do teste HCV Ag-Ab é capaz de prever resultados falso positivos e verdadeiro positivos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005, Vol. 5, pp. 558-67.
2. **OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde.** *Indicadores e Dados Básicos - IDB 2008 Brasil.* 2008.
3. **DATASUS.** [Online] 2011. [Citado em: 10 de November de 2012.] <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2009/d0114.def>.
4. **Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ.** The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. 2006, Vol. 144(10), pp. 705-14.
5. **Seeff, LB.** The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). 2009, Vol. 29(s1), pp. 89–99.
6. **Harvey, A.** Discovery of Non-A, Non-B Hepatitis and Identification of Its Etiology. *Am. J. Med.* 1999, Vol. 107, 6B, pp. 16-20.
7. **Seeff, LB.** Natural History of Hepatitis C. 1999, Vol. 107(6B), pp. 10S–15S.
8. **Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ.** The risk of transfusion-transmitted viral infections. 1996, Vol. 334, pp. 1685-90.
9. **Zou S, Dorsey KA, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY, Stramer SL.** Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. 2010, Vol. 50, pp. 1495-1504.
10. **Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* Nov de 2012. [Epub ahead of print].
11. **D, Lavanchy.** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011, Vol. 17, pp. 107-15.
12. **Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF.** Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int.* Jul de 2011, Vol. 31 Suppl 2, pp. 18-29.
13. **Campiotto, S.** Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. 2005, Vol. 38, pp. 41-49.
14. **Ministério da Saúde.** *Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais.* Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Brasília : s.n., 2012. 01.
15. **Focaccia R, Baraldo DC, Ferraz ML.** Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. Oct de 2004, Vol. 8(5), pp. 348-55.
16. **Rodrigues Neto J, Cubas MR, Kusma SZ, Olandoski M.** Prevalence of hepatitis C in adult users of the public health service of São José dos Pinhais - Paraná. 2012, Vol. vol.15 no.3, pp. 627-38.

17. **Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima ML, Alencar LC, Costa M, Dos Santos AA, Ximenes RA.** Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* Feb de 2013, Vol. 13, 1, p. 60.
18. Hepatitis C. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>. [Online] World Health Organization , Jul de 2012. [Citado em: 07 de Dec de 2012.]
19. **Pawlotsky, JM.** Diagnostic tests for hepatitis C. 1999, Vol. 31 Suppl 1, pp. 71-9.
20. **Ciccozzi M, Lo Presti A, Ciccaglione AR, Zehender G, Ciotti M.** Phylogeny and phylodynamic of Hepatitis C in Italy. *BMC Infect Dis.* 2012, Vol. 12, Suppl 2:S5.
21. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C Virus Infection. *The New England Journal of Medicine.* 2001, Vol. 345, pp. 41-52.
22. **Amon JJ, Garfein RS, Ahdieh-Grant L, Armstrong GL, Ouellet LJ, Latka MH, Vlahov D, Strathdee SA, Hudson SM, Kerndt P, Des Jarlais D, Williams IT.** Prevalence of hepatitis C virus infection among injection drug users in the United States, 1994-2004. 2008, Vol. 46(12), pp. 1852-8.
23. **Xia X, Luo J, Bai J, Yu R.** Epidemiology of hepatitis C virus infection among injection drug users in China: systematic review and meta-analysis. Oct de 2008, Vol. 122(10), pp. 990-1003.
24. **Thomas, SL.** A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. 1998, Vol. 27, pp. 108-17.
25. Incidence and characteristics of sexually transmitted acute hepatitis C virus infection among HIV-positive men who have sex with men in Copenhagen, Denmark during four years (2006-2009): a retrospective cohort study. *Scand J Infect Dis.* 43, Feb de 2011, Vol. 2, pp. 145-8.
26. **Alter, MJ.** HCV routes of transmission: what goes around comes around. 2011, Vol. 31(4), pp. 340-6.
27. **Houghton, M.** Discovery of the hepatitis C virus. *Liver International.* 2009, Vol. 29, s1, pp. 82-88.
28. **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244, Apr de 1989, Vol. 4902, pp. 359-62.
29. **Lindenbach BD, Rice CM.** Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005, Vol. 18;436(7053), pp. 933-8.
30. **Sabahi, A.** Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. *Virology.* 2009, Vol. 6, 117.
31. **Farquhar MJ, McKeating JA.** Primary hepatocytes as targets for Hepatitis C virus replication. Dec de 2008, Vol. 15(12), pp. 849-54.
32. **Hoofnagle, JH.** Course and Outcome of Hepatitis C. Nov de 2002, Vol. 36(5 Suppl 1), pp. S21-9.
33. **Boyer N, Marcellin P.** Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. 2000, Vol. 32 (1 Suppl), pp. 98-112.
34. **Tremolada F, Casarin C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G, Alberti A, Ruol A.** Antibody to Hepatitis C Virus in Post-Transfusion Hepatitis. 1991, Vol. 114 (4), pp. 277-81.

35. **Kupek, E.** Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. *Braz J Infect Dis.* 8, Jun 2004, Vol. 3, pp. 236-40.
36. **Almeida-Neto C, Sabino EC, Liu J, Blatyta PF.** Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion.* 2012, Vol. 52. [Epub ahead of print].
37. **Kleinman SH, Lelie N, Busch MP.** Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion.* 49, Oct de 2009, Vol. 11, pp. 2454-89.
38. **Dal Molin G, Tiribelli C, Campello C.** A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Ann Hepatol.* 2003, Vol. ;2(2), pp. 76-83.
39. **Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P.** T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology.* 1993, Vol. 104(2), pp. 580-7.
40. **Tokeshi S, Sata M, Hino T, Ide T, Noguchi S.** Evaluation of first- and second-generation assays for detection of antibody to hepatitis C virus in non-A, non-B chronic liver diseases--evaluation of 1st and 2nd-generation assays in NANBH. *Kurume Med J.* 1993, Vol. 40(1), pp. 27-32.
41. **Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Sánchez-Tapias JM, Gil MP, Costa J, Gelabert A, Rodés J, Castillo R.** Incidence of non-A, non-B hepatitis after screening blood donors for antibodies to hepatitis C virus and surrogate markers. *Ann Intern Med.* 15;115(8), Oct de 1991 , pp. 596-600.
42. **Bååth L, Widell A, Nordenfelt E.** A comparison between one first generation and three second generation anti-HCV ELISAs: an investigation in high- and low-risk subjects in correlation with recombinant immunoblot assay and polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* Dec de 1992, Vol. 1, 40(3), pp. 287-96.
43. **Molin, GDI e Tiribelli, C.** A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Annals of Hepatology.* 2003, Vol. 2, 2, pp. 76-83.
44. **Mathiesen UL, Karlsson E, Foberg U, Frydén A, Franzén L, Widell A, Bodemar G.** Also with a restrictive transfusion policy, screening with second-generation anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assay would have reduced post-transfusion hepatitis C after open-heart surgery. *Scand J Gastroenterol.* 28, Jul de 1993, Vol. 7, pp. 581-4.
45. **Huang YY, Yang SS, Wu CH, Shih WS, Huang CS, Chen PH, Lin YM, Shen CT, Chen DS.** Impact of screening blood donors for hepatitis C antibody on posttransfusion hepatitis: a prospective study with a second-generation anti-hepatitis C virus assay. *Transfusion.* 34, Aug de 1994, Vol. 8, pp. 661-5.
46. **Richter, SS.** Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol.* 40, Dec de 2002, Vol. 12, pp. 4407-12.
47. **Vrielink H, Zaaier HL, Reesink HW, van der Poel CL, Cuyppers HT, Lelie PN.** Sensitivity and specificity of three third-generation anti-hepatitis C virus ELISAs. *Vox Sang.* 69, 1995, Vol. 1.
48. **Tobler LH, Stramer SL, Lee SR, Masecar BL, Peterson JE, Davis EA, Andrews WE, Brodsky JP, Kleinman SH, Phelps BH, Busch MP.** Impact of HCV 3.0 EIA relative to HCV 2.0 EIA on blood-donor screening. *Transfusion.* Oct de 2003, Vol. 43, 10, pp. 1452-9.
49. **Sharma UK, Stramer SL, Wright DJ, Glynn SA, Hermansen S, Schreiber GB, Kleinman SH, Busch MP.** Impact of changes in viral marker screening assays. *Transfusion.* Feb de 2003, Vol. 43, 2, pp. 202-14.

50. **Vrielink H, Reesink HW, van den Burg PJ, Zaaier HL, Cuypers HT, Lelie PN, van der Poel CL.** Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion*. 37, Aug de 1997, Vol. 8, pp. 845-9.
51. **Lee SR, Wood CL, Lane MJ, Francis B, Gust C, Higgs CM, Nelles MJ, Polito A, DiNello R, Achord D.** Increased detection of hepatitis C virus infection in commercial plasma donors by a third-generation screening assay. *Transfusion*. 35, Oct de 1995, Vol. 10, pp. 845-9.
52. **Makris K, Kouvelis V, Drakopoulos I, Oikonomou E, Maniatis A.** Frequency and characteristics of post-transfusion hepatitis in Greece with emphasis on hepatitis C: comparing second- and third-generation assays. *Transfus Med*. Sep de 1995, Vol. 5, 3, pp. 213-24.
53. **Couroucé AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, Simon N.** Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion*. Sep de 1994, Vol. 34, 9, pp. 790-5.
54. **Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP.** Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med*. Aug de 2004, Vol. 19; 351(8), pp. 760-8.
55. **Alvarez do Barrio M, González Díez R, Hernández Sánchez JM, Oyonarte Gómez S.** Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. *Euro Surveill*. 2, FEB de 2005, Vol. 10, pp. 20-2.
56. **Pillonel J, Laperche S, Saura C, Desenclos JC, Couroucé AM.** Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000. *Transfusion*. 8, Aug de 2002, Vol. 42, pp. 980-8.
57. **Laperche, S.** Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill*. 2005;10(2):pii=516. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=516>. [Online] 2005.
58. **Beld, M, Penning, M e van Putten, M.** Quantitative antibody responses to structural (Core) and nonstructural (NS3, NS4, and NS5) hepatitis C virus proteins among seroconverting injecting drug users: impact of epitope variation and relationship to detection of HCV RNA in blood. *Hepatology*. 1999, Vol. 29(4), pp. 1288-98.
59. **Scott JD, Gretch DR.** Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*. 297, Feb de 2007, Vol. 7, pp. 724-32.
60. *Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus.* **Alter, MJ, Kuhnert, WL e Finelli, Lyn.** RR-3, s.l. : Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003, Vol. 52.
61. **Ansaldi F, Bruzzone B, Testino G, Bassetti M, Gasparini R, Crovari P, Icardi G.** Combination hepatitis C virus antigen and antibody immunoassay as a new tool for early diagnosis of infection. *J Viral Hepat*. Jan de 2006, Vol. 13, 1, pp. 5-10.
62. **Laperche S, Le Marrec N, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, Gallian P, Levayer T, Morel P, Simon N.** Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. *J Clin Microbiol*. Aug de 2005, Vol. 43, 8, pp. 3877-83.

63. **Laperche S, et al.** Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion*. 2005, Vol. 45, 12, pp. 1965-1972.
64. **Vamvakas EC, Tegtmeier GE.** Hepatitis viruses. [A. do livro] Barbara JAJ. *Tegtmeier*. 2008.
65. **Zou S, Stramer SL, Notari EP, Kuhns MC, Krysztof D, Musavi F, Fang CT, Dodd RY.** Current incidence and residual risk of hepatitis B infection among blood donors in the United States. *Transfusion*. 49, Aug de 2009, Vol. 8, pp. 1609-20.
66. **Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV.** Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. *Vox Sang*. 1, Jan de 2011, Vol. 100, pp. 92-8.
67. **Stein J, Besley J, Brook C, Hamill M, Klein E, Krewski D, Murphy G, Richardson M, Sirna J, Skinner M, Steiner R, van Aken P, Devine D.** Risk-based decision-making for blood safety: preliminary report of a consensus conference. *Vox Sang*. 4, Nov de 2011, Vol. 101, pp. 277-81.
68. **Watkins NA, Dobra S, Bennett P, Cairns J, Turner ML.** The management of blood safety in the presence of uncertain risk: a United kingdom perspective. *Transfus Med Rev*. 3, Jul de 2012, Vol. 26, pp. 238-51.
69. **Schnuriger A, Dominguez S, Valantin MA, Tubiana R, Duvivier C, Ghosn J, Simon A, Katlama C, Thibault V.** Early detection of hepatitis C virus infection by use of a new combined antigen-antibody detection assay: potential use for high-risk individuals. *J Clin Microbiol*. Apr 2006, Vol. 44, 4, pp. 1561-3.
70. **Alzahrani, AJ.** Simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibodies in Saudi drug users using a novel assay. *J Med Virol*. Apr de 2008, Vol. 80, 4, pp. 603-6.
71. **Saúde, Ministério da.** [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao\\_153\\_2004.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao_153_2004.pdf). *Portal Saúde*. [Online] [Citado em: 10 de 12 de 2012.]
72. **Gonçalez TT, Sabino EC, Schlumpf KS, Wright DJ, Mendrone A, Lopes M 1st, Leão S, Miranda C, Capuani L, Carneiro-Proietti AB, Basques F, Ferreira JE, Busch M, Custer B.** Analysis of donor deferral at three blood centers in Brazil. *Transfusion*. 2012. Epub ahead of print.
73. **Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D.** What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology*. Jun de 1998, Vol. 27, 6, pp. 1700-2.
74. **Vermeersch P, Van Ranst M, Lagrou K.** Validation of a strategy for HCV antibody testing with two enzyme immunoassays in a routine clinical laboratory. *J Clin Virol*. 4, Aug de 2008, Vol. 42, pp. 394-8.
75. **Zachary P, Ullmann M, Djeddi S, Meyer N, Wendling MJ, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Gut JP.** Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays under the conditions of a clinical virology laboratory. *J Clin Virol*. 2005, Vol. 34, 3, pp. 207-10.
76. **Lai KK, Jin M, Yuan S, Larson MF, Dominitz JA, Bankson DD.** Improved reflexive testing algorithm for hepatitis C infection using signal-to-cutoff ratios of a hepatitis C virus antibody assay. *Clin Chem*. 7, Jul de 2011, Vol. 57, pp. 1050-6.
77. **Stramer SL, Dodd RY, Brodsky JP.** The value of screening signal-to-cutoff ratios for hepatitis C virus antibody confirmation. *Transfusion*. 2012. Epub ahead of print.
78. **Contreras AM, Ochoa-Jiménez RJ, Celis A, Méndez C, Olivares L, Rebolledo CE, Hernandez-Lugo I, Aguirre-Zavala AI, Jiménez-Méndez R, Chung RT.** High antibody level: an accurate serologic marker of

viremia in asymptomatic people with hepatitis C infection. *Transfusion*. 6, Jun de 2010, Vol. 50, pp. 1335-43.

79. **Melve, GK, et al.** Evaluation of the persistence and characteristics of indeterminate reactivity against hepatitis C virus in blood donors. *Transfusion*. 2009, Vol. 49, pp. 2359-65.

80. *Improved efficiency of national HIV, HCV, and HTLV antibody testing algorithms based on sequential screening immunoassays.* **Seed CR, Margaritis AR, Bolton WV, Kiely P, Parker S, Piscitelli L.** 2, Feb de 2003, *Transfusion*, Vol. 43, pp. 226-34.

81. **Owen SM, Yang C, Spira T, Ou CY, Pau CP, Parekh BS, Candal D, Kuehl D, Kennedy MS, Rudolph D, Luo W, Delatorre N, Masciotra S, Kalish ML, Cowart F, Barnett T, Lal R, McDougal JS.** Alternative algorithms for human immunodeficiency virus infection diagnosis using tests that are licensed in the United States. *J Clin Microbiol*. 46, May de 2008, Vol. 5, pp. 1588-95.

82. **Vermeersch P, Van Ranst M, Lagrou K.** Validation of a strategy for HCV antibody testing with two enzyme immunoassays in a routine clinical laboratory. *J Clin Virol*. 42, 2008, Vol. 4, pp. 394-8.

83. **Allain JP, Kitchen A, Aloysius S, Reeves I, Petrik J, Barbara JA, Williamson LM.** Safety and efficacy of hepatitis C virus antibody screening of blood donors with two sequential screening assays. *Transfusion*. 5, May de 1996, pp. 401-5.

84. **Gordis, Leon.** Determinação da Validade e Confiabilidade de Testes de Diagnóstico e Rastreamento. *Epidemiologia*. 4a Edição. s.l. : Revinter Ltda, 20100.

## VII. ARTIGO CIENTÍFICO – ENVIADO

HCV Ag-Ab ASSAY: DOES IT STILL MAKE SENSE IN MOLECULAR ERA?

Fernando Valadares Basques<sup>1</sup>

Silvana Maria Eloi-Santos<sup>2</sup>

Suzane Pretti Figueiredo Neves<sup>2</sup>

Hemominas Foundation<sup>1</sup>

Medical Faculty-Federal University of Minas Gerais <sup>2</sup>

Fernando Valadares Basques

R. Grão Pará, 882 7º Andar

Belo Horizonte – MG

30150-340

BRAZIL

Phone: 553132807494

Fax: 553132484520

Mobile: 553193113600

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the manuscript submitted to TRANSFUSION.

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Minimizing the risk of transmission of viral infections through blood components still challenges blood banks. In developing countries, the major limitation for the implementation of new technologies is the cost. As an alternative to nucleic acid testing, the sensitivity improvement of an HCV antigen and antibody assay was evaluated for blood donors screening, when compared to an HCV antibody only.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** 263,581 blood donors' samples were tested by an HCV Ag-Ab assay. All reactive/indeterminate samples were retested using two different assays, HCV antibody only and HCV antigen only, to determine the presence of antibody or antigen, and to predict if HCV Ag-Ab was able to reduce the window period.

**RESULTS:** Among the 263,581 blood donors screened by the HCV Ag-Ab, 341 (0.13%) had reactive/indeterminate results. Out of them, 42 (12.3%) were reactive in all three tests and 36 (10.6%) had a reactive/indeterminate HCV antibody and a negative HCV antigen result. The specificity of HCV Ag-Ab was 99.90%. One donor, who was in window period for HCV antibody, had both HCV Ag-Ab and HCV antigen reactive results, and a nonreactive HCV antibody. The HCV Ag-Ab signal-to-cutoff (S/CO) ratio was able to predict the presence of the antigen and/or the antibody.

## **CONCLUSION:**

HCV Ag-Ab can be a powerful tool to reduce the residual risk of HCV blood transmission in the developing world, if the cost of NAT implementation cannot be feasible. In this context, the features and benefits of this test justify its introduction on a routine basis.

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of post transfusion hepatitis and is the main cause of chronic liver disease worldwide.<sup>(1)</sup> Moreover, hepatitis C is the most common reason for liver transplantation in developed countries.<sup>(2)</sup> HCV infects more than 120 million people all around the world and thus represents a viral pandemic.<sup>(3,4)</sup> Acute infection is rarely diagnosed and most patients have few or no symptoms in the first decade of disease.<sup>(5)</sup> In fact, development of chronic liver disease is the most common finding among individuals that have acquired the disease.<sup>(6)</sup> In the developed world, the primary mode of transmission for HCV is intravenous drug use, while in the developing countries, unsafe injection practices and transfusions of blood components are the leading causes.<sup>(7)</sup>

The risk of post-transfusion hepatitis C in the 70s and early 80s was estimated at 5 to 18% in the United States. In the 1980s, 7% to 12% of the recipients of blood products developed hepatitis, usually the non-A non-B type. Later on, antibodies to HCV were detected in most of the patients with post-transfusion hepatitis.<sup>(8)</sup> HCV antibody tests were introduced in the U.S. for blood donor screening in 1990 and, since then, the residual risk has been greatly reduced.<sup>(9)</sup> The risk of transmission of infectious diseases can be useful to evaluate the potential effect of new screening tests and to survey the safety of blood supply.<sup>(10)</sup> The window period, time between infection and detectable seroconversion, has enormous importance to estimate the residual risk of acquiring blood-borne infections. In 2008, the residual risk of HCV transmission among American donors was  $0.87/10^6$ <sup>(11)</sup> and, in Canadian Blood Services, it was  $0.19/10^6$  from 2001 to 2005.<sup>(12,13)</sup>

Tests that are more sensitive can greatly reduce the window period, as well as the residual risk. The U.S. HCV prevalence and incidence were  $163.4/10^5$  and  $5.14/10^5$  donations, respectively, in 2008.<sup>(11)</sup> In Brazil, the prevalence and incidence in 2003 were  $19/10^5$  and  $0.311/10^5$  donations, respectively.<sup>(14,15)</sup> In 2001, the residual risk of HCV was estimated to be 1 per 13,721 blood donations in the south of the country.<sup>(16)</sup> At that time, Brazilian blood banks did not screen donors using HCV combined Ag-Ab tests or NAT (nucleic acid testing). Hepatitis C virus NAT has been introduced in some high-income countries since 1999,<sup>(17)</sup> allowing a great reduction in the window period, despite the absence of anti-HCV antibody.

Since 1993, Hemominas Foundation, the largest Brazilian public transfusion network, started the screening of all donors for antibodies against HCV. In June 2009, routine screening of blood donations using a simultaneous antigen and antibody HCV assay (HCV Ag-Ab) was introduced. To evaluate the performance of this test as an alternative to NAT, all HCV reactive or indeterminate samples were retested using a 3<sup>rd</sup> generation HCV antibody (HCV Ab) assay and a specific HCV antigen (HCV Ag) assay.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 263,581 samples collected from 20 centers of Hemominas Foundation, Minas Gerais, Brazil, from August 2009 to July 2010, were analyzed. According to Brazilian regulations, all **DONATIONS ARE INDIVIDUALLY** tested for HIV (two different assays), Hepatitis B (HBsAg and anti-HBc IgG and IgM), Hepatitis C, HTLV I/II, Syphilis and Chagas Disease. The blood units are discarded if any of those tests is repeatedly reactive or indeterminate.

Samples that were reactive or indeterminate to HCV Ag-Ab were aliquoted. Signal-to-cutoff (S/CO) values between 0.8 and 1.2 were considered to be indeterminate and those higher than 1.2 were positive. The S/CO ratio was set to 0.8 to deferred donors. At the end of the collection period, these aliquots were retested with a 3<sup>rd</sup> generation HCV Ab assay (antibody only) and an HCV Ag assay (antigen only) in a single analytical run.

Simultaneous detection of HCV antigen and antibodies was performed using the *Abbott Murex HCV Ag-Ab combination* assay (Murex Biotech S.A, Kyalami, Republic of South Africa), which is an enzyme-linked immunosorbent assay based on a sandwich format. All tests were executed on the microplate processor Tecan Evolyzer 150 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland), exactly as standardized by the manufacturer. Donor serum and controls were incubated for 60 minutes to allow binding of the HCV core antigen (to anti-core monoclonal antibodies) and/or HCV antibodies (to recombinant and HCV NS3 region genome antigens). After washing, peroxidase labeled conjugate was added and the wells were incubated for 60 minutes. Unbound conjugate was washed and the substrate was incubated for 30 min. Thereafter, the reaction was stopped and the plate was read at 450 nm.

The 3<sup>rd</sup> generation HCV antibody, *ORTHO HCV Version 3.0 ELISA* Test System, (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, USA) is an enzyme-linked immunosorbent assay that uses recombinant HCV encoded antigens (derived both from a structural and a non-structural regions of the genome – c22-3, c200 and NS5) coated microwells. Controls and specimens were incubated for 60 minutes at 37°C. After washing, antibodies to human IgG conjugated to horseradish peroxidase were added and the plate was incubated for more 60 minutes. After one more wash step, the substrate was added, followed by hydrogen peroxide to stop the reaction.

Detection of HCV antigen was performed using the *ARCHITECT HCV Ag* (Abbott, Wiesbaden, Germany) a two-step immunoassay that uses chemiluminescent microparticle technology to quantify the HCV core Ag in human serum or plasma. The HCV Ag was detected in the presence or absence of anti-HCV antibodies, since samples were automatically treated to dissociate antigen/antibody complexes. The processing time was around 40 minutes.

All numeric calculations and statistical analysis were performed using the GraphPad Prism 5 software package (San Diego, CA, USA). As all data files assumed a non-Gaussian distribution, statistical comparisons were carried out using the non-parametric Mann Whitney test.

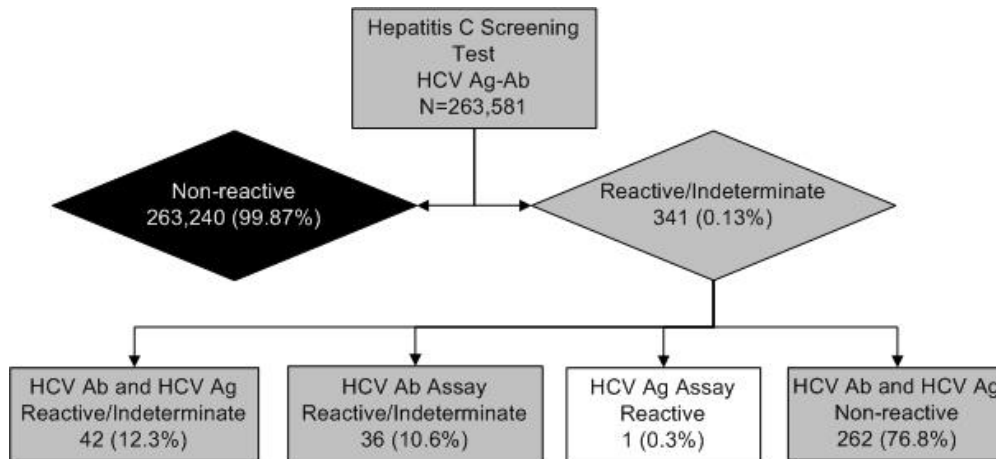


Figure 1: Study flow chart and results

## RESULTS

During the study period we had 263,581 blood donations at Hemominas Foundation, 81,976 (31.1%) of which from first time donors. Three hundred and forty one (0.13%) samples had HCV Ag-Ab repeatedly reactive/indeterminate results. Out of those, 42 (12.3%) had also a reactive/indeterminate HCV Ab and a reactive HCV Ag result, showing that these donors had both circulating antigen and antibody. The mean HCV Ag-Ac S/CO ratio was 10.73 [CI 95% 9.65-11.81]. Thirty-six HCV Ag-Ab reactive/indeterminate donors (10.6%) had antibodies present in their samples, but no antigen. The mean HCV Ag-Ac S/CO ratio was 4.46 [CI 95% 3.02-5.91]

Seventy-eight (22.9%) out of the 341 reactive/indeterminate donors had an HCV Ab reactive and a reactive or non-reactive HCV Ag result. This group showed a mean HCV Ag-Ac S/CO ratio of 7.84 [CI 95% 6.72-8.96]. Two hundred and sixty two donors (76.8%) were negative for both the HCV Ab and the HCV Ag assays. These samples had a mean HCV Ag-Ac S/CO ratio of 1.88 [CI 95% 1.68-2.07]. The specificity of HCV Ag-Ab was 99.90% when analyzing all donor samples. One donor was in the window period for HCV antibody, what was evidenced by positive HCV Ag-Ab and HCV Ag results, but a negative HCV Ab. The HCV Ag-Ab S/CO ratio was 9.81. The HCV Ag-Ab S/CO ratios are shown on Table 1.

## DISCUSSION

Standardization of donor selection, molecular screening tests, and blood pathogen inactivation are effective approaches to increase blood transfusion safety. Regardless of the cost, the implementation of new procedures to achieve this goal is still a challenge for developing countries, since building new laboratory facilities, hiring and training people can be insurmountable barriers. The cost of HIV-1 and HCV minipool NAT implementation in the United States was estimated at \$1.5 million to \$4.3 million per quality-adjusted year of life.<sup>(18)</sup>

Screening tests for HCV have been improved since the first assay was developed in 1989, with significant enhancement in tests sensitivity and specificity. The 1<sup>st</sup> generation anti-HCV test

contained a single HCV antigen derived from the nonstructural protein, NS4. The sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) were 85%, 89%, and 59%, respectively. <sup>(19)</sup> The HCV 2<sup>nd</sup> generation Ab test had an additional core antigen (structural protein) and another nonstructural protein, NS3. <sup>(1)</sup> In high- and low-risk subjects, the 2<sup>nd</sup> generation anti-HCV tests identified a higher number of anti-HCV-positive samples than the 1<sup>st</sup> generation test. <sup>(20)</sup> Moreover, the specificity was much higher. The window period was estimated at 16 and 10 weeks for the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation HCV Ab tests, respectively. <sup>(21)</sup>

The first HCV 3<sup>rd</sup> generation Ab test was licensed to screen donors in 1996, and contains an additional nonstructural protein, NS5, which significantly increases sensitivity and specificity. The estimated window period is 50.9 days when compared to the minipool HCV NAT, which has an infectious window period defined as 7.4 days. Besides, HCV 3<sup>rd</sup> generation Ab has a higher PPV when applied to HCV 2<sup>nd</sup> generation reactive donations. <sup>(16)</sup>

The HCV Ag assay is an alternative strategy to NAT. This test exhibits a good correlation with HCV-RNA levels in anti-HCV-negative patients and is able to identify samples from individuals in the early stage of infection. <sup>(22)</sup> The sensitivity and specificity vary from 96.4 to 98.3% and 99.9% to 100%, respectively. <sup>(23)</sup> In a study by Miedouge et al., HCV-RNA and HCV-Ag levels were significantly correlated in 92% of the samples. The sensitivity was 91.4% for the 93 HCV-RNA positive and anti-HCV antibody negative sera from patients and panels. <sup>(24)</sup> In addition, the reduction of the window period shown by the HCV Ag assay was comparable to that achieved using NAT in a study by Nübling and cols. <sup>(25)</sup>

The HCV Ag-Ab combines the detection of both HCV antigen and antibody in a single test, thus presenting a more rational approach to reduce the window period. It has an advantage over the 3<sup>rd</sup> generation Ab test, in that it detects HCV infection much earlier without the operational disadvantages of procedures such as HCV-RNA or antigen immunoassays or adding a supplemental test. <sup>(26)</sup> Therefore, its use can be a cost-effective strategy to blood banks that cannot afford more expensive technologies.

Since the prevalence of HCV infection is very low in the blood donor population, <sup>(14,16,27)</sup> the positive predictive value of a screening test is also very low. In this study, we observed a specificity of 99.90%. As shown by Contreras et al, even with a specificity of 99%, a considerable number of false positive results can be found and the test does not afford an acceptable positive predictive value. <sup>(28)</sup> The blood bank laboratory must have an algorithm to elucidate all positive and indeterminate results.

Tests with high sensitivity have made possible the identification of donors in the very early stages of the HCV infection. Low sensitive tests can miss a substantial proportion of infected persons and increase the residual risk of transfusion-transmitted infection. In low prevalence populations, like blood donors, the use of highly sensitive methods is mandatory. The present study evaluated an HCV Ag-Ab assay in order to determine its sensitivity improvement when compared to a 3<sup>rd</sup> generation Ab assay, as an alternative for the implementation of molecular screening tests. Our results demonstrated that the combined HCV Ag-Ab assay could detect more positive samples when compared to the HCV Ab 3<sup>rd</sup> generation. Similarly, Laperche et al. found that in anti-HCV negative samples collected in the pre-seroconversion phase, HCV Ag-Ab

was able to detect 70.5% of HCV RNA-positive samples, shortening the window period in 26,8 days.<sup>(29)</sup> Herein, we showed that among 263,581 blood units screened, only one was found to be in the window period. This sample was positive for HCV Ag-Ab and HCV Ag assays, but HCV Ab negative. Reduction of the window period for detection of potentially HCV infected blood donors represents an important goal in the transfusional setting. HCV Ag-Ab assay could be an answer for many developing countries, offering a great advantage over the currently used antibody screening tests. Very well standardized and showing high sensitivity and specificity, HCV Ag-Ab, the so-called 4<sup>th</sup> generation HCV, can detect HCV infection much earlier, reducing the window period without cost and operational disadvantages of NAT.

Finally, several studies have shown that the analysis of the S/CO ratio could help interpreting the results of HCV Ab immunoassays.<sup>(20,28,30)</sup> Our data suggest that the presence of the HCV antigen in a sample can be predicted by higher values of HCV Ag-Ab S/CO ratio. The highest HCV Ag-Ab S/CO ratios were observed in the group that had both antibody and antigen in the sample (10.73 [CI 95% 9.65-11.81]) as well as the sample that had only the antigen (9.81); intermediary values were observed in the group that had only antibodies (4.46 [CI 95% 2.97-5.96]); and low values in the group with neither antibody nor antigen (1.88 [CI 95% 1.68-2.07]). The S/CO ratio brings an important information without any additional cost and can assist to determine the best approach that enables a more rational use of time and resources.<sup>(20)</sup>

To our knowledge, this is the first study that evaluated the implementation of HCV 4<sup>th</sup> generation in a large blood bank service. In our experience, this assay could improve the safety of blood supplies in developing countries by decreasing the risk of transfusion-transmitted HCV infection.

## REFERENCES

1. **Pawlotsky JM.** Diagnostic tests for hepatitis C. 1999, Vol. 31 Suppl 1, pp. 71-9.
2. **Seeff LB.** Natural History of Hepatitis C. 1999, Vol. 107(6B), pp. 10S–15S.
3. **Lindenbach BD, Rice CM.** Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 18, Aug 2005, Vol. 436, 7053, pp. 933-8.
4. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C Virus Infection. *The New England Journal of Medicine.* 2001, Vol. 345, pp. 41-52.
5. **Harris HE, Ramsay ME, Andrews N, Eldridge KP.** Clinical course of hepatitis C virus during the first decade of infection: cohort study. *BMJ.* 7335, Feb 2002, Vol. 23, 324, pp. 450-3.
6. **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005, Vol. 5, pp. 558-67.
7. **Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M.** Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bull World Health Organ.* 10, 1999, Vol. 77, pp. 801-7.
8. **Tremolada F, Casarin C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G, Alberti A, Ruol A.** Antibody to Hepatitis C Virus in Post-Transfusion Hepatitis. 1991, Vol. 114 (4), pp. 277-81.

9. **Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr et al.** The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*. 1992, Vol. 327, 6, pp. 369-374.
10. **Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ.** The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. 1996, Vol. 334, 26, pp. 1685-90.
11. **Zou S, Dorsey KA, Notari EP, Foster GA, Krzyztof DE, Musavi F, et al** Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion*. 50, Jul 2010, Vol. 7, pp. 1495-504.
12. **O'Brien SF, Yi QL, Fan W, Scalia V, Kleinman SH, Vamvakas EC.** Current incidence and estimated residual risk of transfusion-transmitted infections in donations made to Canadian Blood Services. *Transfusion*. 47, 2007, Vol. 2, pp. 316-25.
13. **Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Pappalardo B, Kleinman SH and Group, NHLBI-REDS NAT Study.** A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*. Feb 2005, Vol. 45, 2, pp. 254-64.
14. **Nascimento MC, Mayaud P, Sabino EC, Torres KL, Franceschi S.** Prevalence of hepatitis B and C serological markers among first-time blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. *J Med Virol*. 80, Jan 2008, Vol. 1, pp. 53-7.
15. **Busch MP, Tobler LH, Tegtmeier G, Polito A, Quan S, Hirschler NV, Dockter J, Giachetti C, Mimms L.** Use of third-generation hepatitis C virus (HCV) enzyme immunoassay (EIA) to resolve second-generation HCV EIA-reactive and second-generation recombinant immunoblot assay-indeterminate blood samples: data to support current Food and Drug Administration gui. *Transfusion*. 40, 2000, Vol. 1, pp. 10-4.
16. **Kupek, E.** Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. *Braz J Infect Dis*. 8, Jun 2004, Vol. 3, pp. 236-40.
17. **Stramer, SL.** Current risks of transfusion-transmitted agents: a review. *Arch Pathol Lab Med*. May 2007, Vol. 5, 131, pp. 702-7.
18. **Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP.** Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med*. Aug 2004, Vol. 19; 351(8), pp. 760-8.
19. **Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Sánchez-Tapias JM, Gil MP, Costa J, Gelabert A, Rodés J, Castillo R.** Incidence of non-A, non-B hepatitis after screening blood donors for antibodies to hepatitis C virus and surrogate markers. *Ann Intern Med*. 15;115(8), Oct 1991 , pp. 596-600.
20. **Bååth L, Widell A, Nordenfelt E.** A comparison between one first generation and three second generation anti-HCV ELISAs: an investigation in high- and low-risk subjects in correlation with recombinant immunoblot assay and polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. Dec 1992, Vol. 40(3), pp. 287-96.
21. **Dal Molin G, Tiribelli C, Campello C.** A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Ann Hepatol*. 2003, Vol. ;2(2), pp. 76-83.

22. **Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Luigi C, Crovari P.** Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol.* 39, Sep 2001, Vol. 9, pp. 3110-4.
23. **Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, Uyar Y.** Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J Clin Microbiol.* 49, Dec 2011, Vol. 12, pp. 4089-93.
24. **Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J.** Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *J Clin Virol.* 48, May 2010, Vol. 1, pp. 18-21.
25. **Nübling CM, Unger G, Chudy M, Raia S, Löwer J.** Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion.* 42, Aug 2002, Vol. 8, pp. 1037-45.
26. **Laperche, S.** Antigen-antibody combination assays for blood donor screening: weighing the advantages and costs. *Transfusion.* 48, Apr 2008, Vol. 4, pp. 576-9.
27. **de Almeida-Neto C, Sabino EC, Liu J, Blatyta PF, Mendrone-Junior A, Salles NA, Leão SC, Wright DJ, Basques FV, Ferreira JE, Busch MP, Murphy EL and NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component.** Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion.* 6, Aug 2012. (Article first published online).
28. **Contreras AM, Ochoa-Jiménez RJ, Celis A, Méndez C, Olivares L, Rebolledo CE, Hernandez-Lugo I, Aguirre-Zavala AI, Jiménez-Méndez R, Chung RT.** High antibody level: an accurate serologic marker of viremia in asymptomatic people with hepatitis C infection. *Transfusion.* 50, Jun 2010, Vol. 6, pp. 1335-43.
29. **Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Le Marrec N, Girault A, Servant-Delmas A, Bouchardeau F, Deschaseaux M, Piquet Y.** Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion.* 45, Dec 2005, Vol. 12, pp. 1965-72.
30. **Alter, MJ, Kuhnert, WL and Finelli, Lyn.** Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2003, Vol. 52, RR-3